

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

Département de Génie des Procédés

## **THESE DE DOCTORAT**

en Génie des Procédés

Spécialité : Génie des Procédés pharmaceutiques

ÉVALUATION DES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DES MOLECULES BIOACTIVES EXTRAITES A  
PARTIR DE VEGETAUX EN VUE DE LA FORMULATION DE NANO/MICROPARTICULES POUR LA  
VECTORISATION DES MEDICAMENTS.

Par

**Yacine NAIT BACHIR**

devant le jury composé de :

A. Aouabed	Professeur	U. de Blida 1	Président
A. Hadj sadok	MCA	U. de Blida 1	Examineur
B. Bouzid	Professeur	U. de Blida 1	Examineur
K. Daoud	Professeur	USTHB	Examineur
A. Hadj-ziane	Professeur	U. de Blida 1	Directeur de thèse

Blida, Mai 2018

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1**

**Faculté de Technologie**

Département de Génie des Procédés

## **THESE DE DOCTORAT**

en Génie des Procédés

Spécialité : Génie des Procédés pharmaceutiques

ÉVALUATION DES ACTIVITES PHARMACOLOGIQUES DES MOLECULES BIOACTIVES EXTRAITES A  
PARTIR DE VEGETAUX EN VUE DE LA FORMULATION DE NANO/MICROPARTICULES POUR LA  
VECTORISATION DES MEDICAMENTS.

Par

**Yacine NAIT BACHIR**

devant le jury composé de :

A. Aouabed	Professeur	U. de Blida 1	Président
A. Hadj sadok	MCA	U. de Blida 1	Examineur
B. Bouzid	Professeur	U. de Blida 1	Examineur
K. Daoud	Professeur	USTHB	Examineur
A. Hadj-ziane	Professeur	U. de Blida 1	Directeur de thèse

Blida, Mai 2018

## RÉSUMÉ

Les molécules bioactives d'origine végétale occupent une place très importante dans le quotidien des patients atteints de diverses maladies. Toutefois, ces molécules présentent une grande instabilité et une efficacité thérapeutique susceptible d'être optimisée par l'amélioration de leur solubilité lors de leur délivrance. Les travaux présentés dans cette thèse visent à augmenter la stabilité physicochimique et les effets thérapeutiques de ces substances naturelles.

La réalisation d'une enquête ethnobotanique sur le traitement du diabète dans la région de la Mitidja nous a permis d'établir une liste de 27 plantes antidiabétiques. Sur la base de l'évaluation de l'activité antidiabétique in-vitro des extraits aqueux et ethanoliques pour les plantes récoltées, la plante ayant l'activité antidiabétique la plus importante (*Salvia officinalis*) a été sélectionnée.

L'optimisation des paramètres d'extraction des molécules bioactives non-volatiles de *Salvia officinalis* par Soxhlet a montré que l'éthanol est le solvant d'extraction le plus adéquat pour cette plante, nous avons pu atteindre un rendement maximal de 27.11%. L'extrait obtenu est principalement composé de polyphénols (174.32 mg GAE/g) et son analyse par HPLC a montré qu'il contient de la rutine (44.88%), la quercitrine (18.83%), l'acide rosmarinique (12.68%), l'acide caféique (6.36%) et l'acide ferulique (3.40%). L'extraction des molécules volatiles de *Salvia officinalis* réalisée par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement de 2.07 %. L'identification et la quantification de 48 composés qui correspondent à 97.27% de l'huile obtenue ont été réalisées par analyse CG/MS. Les composés majoritaires de cette huile essentielle sont l' $\alpha$ -Thujone (23.21%), le 1,8-Cineole (14.17%) et le Camphor (11.02).

Des systèmes nanoéponges à base de  $\beta$ -cyclodextrine et de naphthalène dicarboxylique ont mis en évidence des nanoémulsions stables contenant l'huile essentielle de sauge, la nanoémulsion contenant 5% d'huile essentielle a présenté une taille des particules de 143.2nm, un potentiel  $\zeta$  de 38.8mV, une viscosité de 0.89Pa.s et une turbidité de 0.14cm<sup>-1</sup>. L'activité antidiabétique in-vivo de cette huile ainsi que sa cinétique de dissolution in-vitro augmentent de manière significative après leur formulation.

La microencapsulation de l'extrait ethanolique de sauge dans une membrane de gélatine/pectine par coacervation complexe a été réalisée avec succès. Après optimisation du procédé, un taux d'encapsulation de 74.31 % a été obtenu et les microparticules obtenues ont

présenté un diamètre moyen de 51.43 $\mu$ m. La stabilisation de ces microcapsules dans les milieux aqueux et le maintien de leur dispersion homogène ont été réalisés en utilisant l'alginate de sodium comme agent stabilisant. Le système dispersé ainsi formulé a permis de préserver l'activité antioxydante de l'extrait encapsulé et d'augmenter son activité antidiabétique in-vivo.

La suspension à base de microcapsules contenant l'extrait de *Salvia officinalis* a permis d'augmenter les activités anti-inflammatoire, anti-ulcéreugénique et hépatonéphroprotectrices in-vivo de cet extrait, ces résultats ont montré que cette formulation antidiabétique assure également un effet protecteur sur les différents organes contre les principales complications du diabète qui sont les inflammations et le stress oxydatif.

Ces travaux ont confirmé que les nano/microsystèmes présentent une stratégie très efficace pour la délivrance (augmentation de l'efficacité pharmacologique) et la préservation (protection des pharmacophores) des molécules bioactives d'origine naturelle de manière simultanée.

## ABSTRACT

Bioactive molecules of plant origin play a very important role in the daily lives of patients with various diseases. However, these molecules exhibit high instability and therapeutic efficacy that can be optimized by improving their solubility during delivery. The work presented in this thesis aims to increase the physicochemical stability and the therapeutic effects of these natural substances. Conducting an ethnobotanical investigation into the treatment of diabetes in the Mitidja region allowed us to list 27 antidiabetic plants. Based on the evaluation of the in-vitro antidiabetic activity of the aqueous and ethanolic extracts for the harvested plants, the plant with the most important antidiabetic activity (*Salvia officinalis*) was selected. The optimization of extraction parameters of non-volatile bioactive molecules of *Salvia officinalis* by soxhlet showed that ethanol is the most suitable extraction solvent for this plant, we were able to reach a maximum yield of 27.11%. The extract obtained is mainly composed of polyphenols (174.32 mg GAE / g) and its analysis by HPLC showed that it contains rutin (44.88%), quercitrine (18.83%), rosmarinic acid (12.68%), caffeic acid (6.36%) and ferric acid (3.40%). The extraction of the volatile molecules of *Salvia officinalis* carried out by hydrodistillation that allowed obtaining a yield of 2.07%. The identification and quantification of 48 compounds which correspond to 97.27% of the obtained oil were carried out by GC/MS analysis. The major components of this essential oil are  $\alpha$ -Thujon (23.21%), 1,8-Cineol (14.17%) and Camphor (11.02). Nanosponge systems based on  $\beta$ -cyclodextrin and naphthalene dicarboxylic acid have evidenced stable nanoemulsions containing sage essential oil, the nanoemulsion containing 5% essential oil has a particle size of 143.2 nm, a  $\zeta$ -potential of 38.8mV, a viscosity of 0.89Pa.s and a turbidity of 0.14cm<sup>-1</sup>. The in-vivo anti-diabetic activity of this oil as well as its dissolution kinetics in vitro increase significantly after their formulation. Microencapsulation of the ethanolic sage extract in a gelatin/pectin membrane by complex coacervation was successfully performed. After optimization of the process, an encapsulation rate of 74.31% was obtained and the microparticles obtained had an average diameter of 51.43  $\mu$ m. The stabilization of these microcapsules in aqueous media and the maintenance of their homogeneous dispersion were carried out using sodium alginate as a stabilizing agent. The dispersed system formulated permitted to preserve the antioxidant activity of the encapsulated extract and to increase its antidiabetic activity in vivo.

This work has confirmed that nano/microsystems have a very efficient strategy for delivery (increase of pharmacological efficacy) and preservation (protection of pharmacophors) of bioactive molecules of natural origin simultaneously.

## ملخص

الجزئیات النشطة من أصل نباتي تلعب دورا هاما جدا في الحياة اليومية للمرضى الذين يعانون من أمراض مختلفة. ومع ذلك، فإن هذه الجزئیات تظهر عدم استقرار عالي و فعالية علاجية التي من الممكن أن تصبح امثل من خلال تحسين ذوبانهم أثناء تسليمهم. يهدف العمل المقدم في هذه أطروحة إلى زيادة الاستقرار الفيزيوكيميائي والتأثيرات العلاجية لهذه المواد الطبيعية.

إجراء تحقيق عرقي لعلاج مرض السكري في منطقة المتيجا قد أتاح لنا إدراج قائمة من 27 نبتة مضادة لمرض السكري. واستنادا إلى تقييم النشاط المضاد للسكر في المختبر للمستخلص المائي والإيثانولي للنباتات المحصودة، تم اختيار النبات الذي يحتوي على أهم نشاط مضاد للسكري (سالفيا أوفسيناليس).

وأظهرت الاستفادة المثلى من معاملات استخراج الجزئیات النشطة بيولوجيا غير المتطايرة من سالفيا أوفسيناليس بواسطة سوكسليت أن الإيثانول هو المذيب الأنسب لهذا النبات، تمكنا من الوصول إلى أقصى قدر من العائد وهو 27.11%. المستخلص الذي تم الحصول عليه يتكون أساسا من البوليفينول (174.32 mg GAE/g) وتحليله بإستعمال HPLC أظهر أنه يحتوي على الروتين (44.88%)، الكرسيتين (18.83%)، حمض روزمارينيك (12.68%)، حامض الكافيك (6.36%) وحامض الحديد (3.40%). استخراج الجزئیات المتطايرة من سالفيا أوفسيناليس بواسطة التقطير بالبخار جعلت من الممكن الحصول على 2.07% من العائد. تم تحديد وتقدير كمية 48 مركبة والتي تتوافق مع 97.27% من الزيت المستخلص التي تم الحصول عليه بواسطة تحليل GC/MS. المركبات الرئيسية في هذا الزيت العطري هي ألفاثوجون (23.21%)، 1،8-سينيول (14.17%) والكافور (11.02%).

نظم النانو-اسفنج على أساس  $\beta$ - سيكلودكسترين والنفثالين ديكاربوكسيليك أثبتت النانو-مستحلبات مستقرة تحتوي على الزيوت الأساسية، و النانو-مستحلب تحتوي على 5% من الزيت العطري، لديها حجم الجسيمات 143.2 نانومتر، جهد زيتا 38.8 mV، لزوجة 0.89 Pa.s و عكارة 10.14 cm. النشاط في الجسم الحي لمكافحة السكري لهذا الزيت العطري، في المختبر لديها زيادة كبيرة بعد صياغتها.

تم إجراء عملية تصغير دقيق لمستخلص الإيثانولي في غشاء الجيلاتين / البكتين بواسطة عملية التجميع المعقدة بنجاح. بعد تحسين العملية، تم الحصول على معدل التغليف من 74.31% والجسيمات الدقيقة التي تم الحصول عليها كان متوسط قطرها 51.43 ميكرون. تم تحقيق استقرار هذه الكبسولات في وسائل الإعلام المائية والحفاظ على تشتت متجانس بها باستخدام الجينات الصوديوم كعامل استقرار. وهكذا فإن النظام المشتت الذي تم صياغته جعل من الممكن الحفاظ على النشاط المضاد للأكسدة في المستخلص المغلف وزيادة نشاطه المضاد للسكري في الجسم الحي.

تطبيق يحتوي على كبسولات تحتوي على سالفيا أوفسيناليس زيادة أنشطة مضادة للالتهابات، ومكافحة أولسبروجينيك و الكبدية في الجسم الحي من هذا المستخلص، وقد أظهرت هذه النتائج أن هذه الصيغة يوفر أيضا تأثير المضادة للسكري و حامي ضد المضاعفات الرئيسية لمرض السكري التي هي الالتهابات والإجهاد التأكسدي.

وقد أكد هذا العمل أن نانو / مايكروسيستمز لديها استراتيجيات فعالة جدا للتسليم (زيادة الفعالية الدوائية) والحفاظ (حماية فارماكوفور) على جزئیات نشطة بيولوجيا من أصل طبيعي في وقت واحد.

# Remerciements

Mes remerciements les plus chaleureux vont à madame **HADJ ZIANE Amel**, professeur à l'USDB1 et ma directrice de thèse. Tout au long de ces trois années consécutives de travail acharné, madame HADJ ZIANE était présente par ses conseils scientifiques et son soutien moral ; sans sa confiance le présent travail n'aurait jamais vu le jour. Soyez assuré de mon attachement et de ma profonde gratitude.

Je remercie monsieur **AOUABED Ali**, professeur à l'USDB1 et doyen de la faculté de technologie, d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance.

Je remercie monsieur **BOUZID Bachir**, professeur à l'USDB1, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse en qualité d'examineur interne.

Je remercie monsieur **HADJ SADOK Abdelkader**, maître de conférences à l'USDB1, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance en qualité d'examineur. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour ses conseils et son soutien depuis la formation de graduation.

Je remercie monsieur **DAOUD Kamel**, professeur à l'USTHB, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance en qualité d'examineur externe. Je lui suis reconnaissant pour le soutien et la confiance qu'il m'a témoignés lors de mon initiation à la recherche dans le laboratoire des phénomènes de transfert.

Je remercie ma très chère amie et collaboratrice **MEDJKANE Meriem**, maître de conférences à l'Université Hassiba Benbouali de Chlef, d'avoir partagé avec moi la passion que nous avons pour la recherche scientifique.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser les analyses physicochimiques et biologiques qui sont impossible à réaliser au niveau de notre laboratoire, en m'accueillant dans les différentes institutions privées et étatiques (le groupe Saidal, le groupe El-kendi, l'URD, l'EMP, la police scientifique, le CRAPC, l'ENSV, l'USTHB et l'USDB1).

A titre plus personnel, Je remercie chaleureusement ma **famille** ainsi que mes **amis** pour leur aide, leur grande patience, leurs encouragements et la confiance qu'ils ont toujours eu en moi.

## TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	11
<b>1. LA PHYTOTHERAPIE, DE L'ETHNOPHARMACOLOGIE AUX NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES</b>	<b>14</b>
1.1. Introduction	14
1.2. Réalisation d'une enquête ethnobotanique	15
1.3. De la sélection de la plante à la confirmation de l'enquête ethnobotanique	16
1.4. Conclusion	30
<b>2. LES NANO/MICROSYSTEMES POUR L'ENCAPSULATION DES SUBSTANCES NATURELS</b>	<b>31</b>
2.1. La nano/micro-technologie un défi pour la science	31
2.2. Les Micro/nanosystèmes pour la vectorisation des médicaments	32
2.3. Effets des Micro/nanosystèmes sur les effets thérapeutiques d'un médicament	34
2.4. Élaboration et caractérisation de ces systèmes	34
2.5. Le passage du macroscopique au microscopique et les techniques de réduction de taille	51
<b>3. LE DIABETE, TRAITEMENT MEDICALE ET ALTERNATIVES</b>	<b>53</b>
3.1. Introduction	53
3.2. Le diabète, la maladie du siècle	53
3.3. L'épidémie mondiale du diabète	54
3.4. Physiopathologie du diabète	54
3.5. Traitement médicale et alternative du diabète	60
3.6. Conclusion	65
<b>4. SALVIA OFFICINALIS, BOTANIQUE, PHYTOCHIMIE ET BIOACTIVITE.</b>	<b>66</b>
4.1. Description botanique de <i>Salvia officinalis</i>	66
4.2. La Place de la sauge en phytothérapie	67
4.3. Composition chimique de <i>Salvia officinalis</i>	68
4.4. Pharmacologie de <i>Salvia officinalis</i>	70
<b>5. CHOIX DE LA PLANTE</b>	<b>73</b>
5.1. Introduction	73
5.2. Matériels et méthodes	73
5.3. Résultats et discussions	80
5.4. Conclusion	86
<b>6. ETUDE DE LA PLANTE</b>	<b>87</b>
6.1. Introduction	87
6.2. Matériel et methods	87
6.3. Résultats et discussion	95
6.4. Conclusion	106



<b>7. FORMULATION DE NANOSYSTEMES POUR LA DELIVRANCE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>SALVIA OFFICINALIS</i></b>	107
7.1. Introduction	107
7.2. Matériels et méthodes	108
7.3. Résultats et discussions	115
7.4. Conclusion	136
<b>8. FORMULATION DE MICROSYSTEMES POUR LA DELIVRANCE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE <i>SALVIA OFFICINALIS</i></b>	138
8.1. Introduction	138
8.2. Matériels et méthodes	139
8.3. Résultats et discussions	145
8.4. Conclusion	161
<b>9. EFFET DE LA FORMULATION SUR LE STRESS OXYDATIF ET L'INFLAMMATION</b>	162
9.1. Introduction	162
9.2. Matériels et méthodes	163
9.3. Résultats et discussions	169
9.4. Conclusion	178
CONCLUSION	179
APPENDICE A.	
APPENDICE B.	
APPENDICE C.	
REFERENCES	181

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.1</b>	Diagramme représentant les différentes étapes pour passer d'une enquête ethnobotanique à de nouvelles stratégies thérapeutiques.	5
<b>Figure 1.2</b>	Le schéma d'un montage d'hydrodistillation classique.	6
<b>Figure 1.3</b>	Le schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.	7
<b>Figure 1.4</b>	Schéma d'un extracteur Soxhlet.	8
<b>Figure 1.5</b>	Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation.	9
<b>Figure 1.5</b>	Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation.	10
<b>Tableau 1.1</b>	Les structures chimiques des différentes familles phytochimiques.	14
<b>Figure 2.1</b>	Morphologie des nanoparticules.	21
<b>Figure 2.2</b>	Microréacteurs et systèmes à libération déclenchée et prolongée.	22
<b>Figure 2.2</b>	Microréacteurs et systèmes à libération déclenchée et prolongée.	23
<b>Tableau 2.1</b>	Les trois grandes classes de procédés industriels de microencapsulation.	27
<b>Figure 2.4</b>	Comportement d'un coacervat vis-à-vis d'une phase liquide non miscible.	28
<b>Figure 2.5</b>	Schéma de principe du procédé de microencapsulation par coacervation complexe.	29
<b>Tableau 2.2</b>	Comparaison entre la chimie moléculaire et la chimie supramoléculaire.	32
<b>Figure 2.6</b>	Calix[4]arène avec des substituants para-tert-butyle.	33
<b>Figure 2.7</b>	Structures des Q5, Q6, et Q7.	34
<b>Figure 2.8</b>	Deux structures correspondant à dibenzo 18-crown-6	34
<b>Figure 2.9</b>	Structure cristalline d'un rotaxane avec un cyclobis (paraquat-p-phénylène) macrocycle.	35
<b>Tableau 2.3</b>	Caractéristiques des cyclodextrines naturelles	35
<b>Figure 2.10</b>	Structure de l' $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ cyclodextrines.	36
<b>Figure 2.11</b>	Cyclodextrins structure and inclusion complexe formation.	37
<b>Figure 3.1</b>	Carte mondiale du diabète.	43
<b>Figure 3.2</b>	Régulation de la glycémie par les hormones pancréatiques.	48
<b>Figure 3.3</b>	régulation de l'activité endocrine pancréatique.	49
<b>Tableau 3.1</b>	Effets des principaux médicaments antidiabétiques.	51
<b>Figure 4.1</b>	Aspect morphologique de <i>Salvia officinalis</i> (au stade de flauréson).	56
<b>Figure 4.2</b>	Les feuilles <i>Salvia officinalis</i> .	56
<b>Tableau 4.1</b>	Le classement systématique de la sauge.	57
<b>Tableau 4.2</b>	Phytochimie des composés non-volatils de <i>Salvia officinalis</i> .	59
<b>Tableau 4.3</b>	Les activités pharmacologiques de <i>Salvia officinalis</i> .	61
<b>Figure 5.1</b>	Cartographie de la plaine de la Mitidja et ses environs.	64
<b>Tableau 5.1</b>	Résultats de l'enquête ethnopharmacologique.	71
<b>Tableau 5.2</b>	Résultats du screening phytochimique.	74

<b>Tableau 5.3</b>	Résultats des rendements des dosages de polyphénols totaux.	75
<b>Figure 6.1</b>	Position géographique de Roudah, Ouled Sidi Brahim, Bouira, Algérie.	78
<b>Figure 6.2</b>	Photographie de <i>Salvia officinalis</i> (à gauche), photographie du montage Soxhlet utilisé (à droite).	79
<b>Tableau 6.1</b>	Caractéristiques des solvants utilisés.	79
<b>Tableau 6.2</b>	Matrices des expériences.	80
<b>Tableau 6.3</b>	Procédure expérimentale de l'activité antidiabétique in-vivo.	84
<b>Tableau 6.4</b>	Matrice des réponses.	86
<b>Figure 6.3</b>	Histogrammes représentant les effets des facteurs sur les réponses.	87
<b>Figure 6.4</b>	Les contours représentant les prédictions des réponses dans les domaines étudiés.	87
<b>Figure 6.5</b>	Les histogrammes représentant les valeurs de $R^2$ et $Q^2$ .	88
<b>Tableau 6.5</b>	Les modèles mathématiques.	89
<b>Figure 6.6</b>	Le chromatogramme HPLC de l'extrait de <i>Salvia officinalis</i> .	91
<b>Figure 6.7</b>	Le chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> .	92
<b>Tableau 6.6</b>	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> .	93
<b>Tableau 6.7</b>	Évolution des glycémies des animaux durant toute la période du traitement.	94
<b>Tableau 6.8</b>	Évolution des poids corporels des animaux durant toute la période du traitement.	94
<b>Tableau 6.9</b>	Les paramètres biochimiques des animaux après 28 jours de traitement.	95
<b>Figure 7.1</b>	La réaction de synthèse des nanoéponges.	99
<b>Tableau 7.1</b>	Matrice expérimentale pour la préparation des nanoéponges.	100
<b>Tableau 7.2</b>	Composition des nanoémulsions SEO-NE.	101
<b>Tableau 7.3</b>	Conception expérimental de l'activité antidiabétique in-vivo.	104
<b>Tableau 7.4</b>	Matrice des facteurs et des réponses.	105
<b>Figure 7.2</b>	(A) contours et (B) surface de réponses permettant de prédire les rendements de la réaction ; (C) les coefficients $R^2$ et $Q^2$ ; (D) effet des facteurs sur le rendement.	106
<b>Figure 7.3</b>	Spectres FT-IR de la BCD (1), NDCA (2) et BCD-NDCA-NSs (3).	108
<b>Figure 7.4</b>	Microphotographies obtenues par MEB, (A) la BCD et (B) les NSS.	109
<b>Figure 7.5</b>	Diffractogrammes DRX des la BCD (B) et des NSS (A).	109
<b>Tableau 7.1</b>	Les caractéristiques physicochimiques des nanoémulsions préparées.	110
<b>Figure 7.6</b>	Évolution de la taille des particules durant le stockage.	111
<b>Figure 7.7</b>	Évolution du potentiel zêta durant le stockage.	113
<b>Figure 7.8</b>	Évolution de la viscosité durant le stockage.	115
<b>Figure 7.9</b>	Évolution de la turbidité durant le stockage.	116
<b>Figure 7.10</b>	Évolution de la teneur en huile essentielle durant le stockage.	118
<b>Figure 7.11</b>	Comportement de SEO dans les NEs par l'équation Avrami durant le stockage pour les NE1 (A) et NE2 (B).	120
<b>Figure 7.12</b>	Étude de la cinétique de dissolution in-vitro.	121
<b>Figure 7.13</b>	Structure des cavités internes et externes des nanoéponges contenant l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> .	122
<b>Figure 7.14</b>	Évolution de la glycémie chez les rats des différents lots.	123
<b>Tableau 7.6</b>	Les caractéristiques pharmacologiques des différentes formulations.	125
<b>Figure 15</b>	Les microphotographies des coupes histologiques des pancréas.	126
<b>Tableau 8.1</b>	Matrice des expériences.	130
<b>Table 8.2</b>	Composition des formulations.	132
<b>Tableau 8.3</b>	Procédure expérimentale de l'activité antidiabétique in-vivo.	134

<b>Tableau 8.4</b>	Les taux d'encapsulation et les diamètres moyens pour les microparticules obtenues.	135
<b>Figure 8.1</b>	(A) Effets des facteurs et leurs interactions sur le taux d'encapsulation, (B) Histogrammes des coefficients de corrélation et de prédiction.	136
<b>Figure 8.2</b>	Surfaces des réponses représentant les prédictions du taux d'encapsulation dans le procédé étudié.	137
<b>Figure 8.3</b>	(A) Photographie des formulations obtenues avant l'étape de filtration des microcapsules et (B) Microphotographies des microcapsules.	139
<b>Tableau 8.5</b>	Les caractéristiques physico-chimiques des suspensions préparées.	140
<b>Table 8.6</b>	Activité antioxydante des suspensions préparées et de leurs différents constituants.	141
<b>Figure 8.4</b>	Evolution des diamètres moyens des microcapsules au cours du stockage.	142
<b>Figure 8.5</b>	Evolution du potentiel zêta des suspensions au cours du stockage.	143
<b>Figure 8.6</b>	Evolution de la viscosité des suspensions au cours du stockage.	144
<b>Figure 8.7</b>	Photographies des suspensions montrant l'évolution du phénomène de sédimentation.	145
<b>Figure 8.8</b>	Evolution des volumes de sédimentations des suspensions au cours du stockage.	146
<b>Figure 8.9</b>	Evolution de la redispersibilité des suspensions au cours du stockage.	146
<b>Figure 8.10</b>	Mécanismes de stabilisation proposés pour chaque agent dispersant.	147
<b>Figure 8.11</b>	Evolution de la dégradation de l'activité antioxydante des suspensions et de l'extrait de sauge libre au cours du stockage.	148
<b>Tableau 8.7</b>	Les valeurs des constantes « K » et des temps de demie vie « t <sub>1/2</sub> » pour les suspensions et l'extrait libre.	149
<b>Figure 8.12</b>	Evolution de la glycémie chez les rats des différents lots.	149
<b>Tableau 8.9</b>	Les caractéristiques pharmacologiques des différentes formulations.	150
<b>Tableau 9.1</b>	Procédure expérimentale de l'étude de l'activité anti-inflammatoire.	153
<b>Tableau 9.2</b>	Procédure expérimentale de l'activité anti-ulcéreugénique in-vivo.	155
<b>Tableau 9.3</b>	Procédure expérimentale de l'étude de l'activité hépatonéphroprotectrice.	158
<b>Figure 9.1</b>	(A) Histogrammes représentant les pourcentages d'augmentation de l'œdème de la patte pour chaque groupe, (B) Histogrammes représentant les pourcentages d'inhibition de l'œdème de la patte pour chaque groupe.	160
<b>Figure 9.2</b>	Photographies des structures macroscopiques (A) et microscopiques (B) des différents estomacs.	161
<b>Tableau 9.3</b>	Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des ulcères.	162
<b>Figure 9.3</b>	Evolution de l'activité inhibitrice de l'H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase en fonction de la concentration pour les traitements.	162
<b>Figure 9.4</b>	Mécanisme d'action des microcapsules bioadhésive contenant l'extrait de <i>Salvia officinalis</i> pour le traitement de l'ulcère.	164
<b>Figure 9.5</b>	Variation des taux d'ALT et d'AST chez les souris des 3 groupes.	165
<b>Figure 9.6</b>	Variation des taux d'MDA et de Tglu chez les souris des 3 groupes.	166
<b>Figure 9.7</b>	Photographies des foies et des reins pour les différents lots.	167

## INTRODUCTION

Depuis toujours, l'Homme s'est intéressé aux plantes en raison des vertus médicinales de leurs métabolites secondaires [1]. Ces derniers renferment plusieurs familles de molécules non-volatiles comme les polyphénols, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes ou encore des molécules volatiles comme les huiles essentielles [1,2]. La « phytothérapie » est un mot qui vient du grec "φυτό" qui signifie plante et "θεραπεία" qui signifie soigner, c'est une médecine fondée sur l'utilisation des extraits de plantes et les principes actifs d'origine végétale pour le traitement des maladies. Selon l'OMS, elle est considérée comme une médecine traditionnelle et non conventionnelle à cause de l'absence des études cliniques systématiques [3]. Toutefois, les produits finis à base de plantes sont soumis à une autorisation de mise sur le marché (AMM) et les préparations magistrales de plantes sont soumises à la réglementation sur les matières premières à usage pharmaceutique (MPUP).

De nos jours, ces molécules bioactives sont des remèdes de choix par les consommateurs en raison de deux facteurs principaux, le premier est la crainte des nombreux effets secondaires des médicaments synthétiques [4], le deuxième est la confiance que ces produits naturels inspirent aux patients de par leur origine [5]. De ce fait, les quantités de production de ces molécules augmentent de plus en plus, ce qui a suscité l'intérêt des laboratoires de recherches et des industriels. Toutefois, ces produits présentent deux inconvénients majeurs, le premier est leur durée de conservation très courte (les délais entre les dates de production et de péremptions sont très proches), le deuxième est leur packaging qui est très coûteux (utilisation des matières isolantes qui peuvent coûter encore plus cher que le médicament lui-même dans certains cas). Afin de proposer une solution pour la résolution du problème d'instabilité des molécules bioactives d'origine naturelle, les chercheurs ont tenté plusieurs approches mais toutes ces dernières sont orientées soit sur les matériaux d'emballage ou sur la mise au point de gélules et de capsules molles ayant des propriétés isolantes [6].

L'utilisation de ces substances xénobiotiques naturelles par les cliniciens et les pharmacologues a montré que l'efficacité de ces molécules est étroitement liée au système de délivrance car ces dernières sont un mélange de molécules ayant de différentes propriétés physicochimiques [7]. De récentes études [8-10] ont montré que l'utilisation de nano/microsystèmes pour la délivrance de ces extraits naturels peut améliorer leur dissolution in-vitro, leur biodisponibilité in-vivo et donc leurs effets pharmacologiques.

Le nombre de groupes pharmaceutiques multinationaux travaillant sur le développement de médicaments naturels à usage humain et vétérinaire est très important. Le but principal de ces laboratoires de recherche et développement est de remédier aux problèmes d'instabilité physicochimique de ces molécules bioactives et de mettre au point des formes pharmaceutiques adéquates pour assurer la délivrance de ces produits à valeur ajoutée en toute sécurité et en optimisant leurs effets thérapeutiques.

Dans ce contexte, l'axe original développé dans cette présente étude est de contribuer à remédier aux problèmes d'instabilité physicochimique et d'optimiser les propriétés thérapeutiques de ces molécules de manière simultanée. A cet effet, de nouvelles formulations basées sur la mise au point de nano/Microsystèmes sont proposées. Ces derniers manifestent double effet de stabilisation/délivrance pour ces substances naturelles. Nous avons choisis une stratégie basée sur l'utilisation de ces systèmes pour remédier aux problèmes rencontrés car c'est la seule manière qui permet d'agir à l'échelle moléculaire et donc remédier à ces problèmes de la manière la plus efficace qui soit.

Les procédés permettant l'élaboration des nano/Microsystèmes sont très difficiles à maîtriser vue la taille et la nature des produits qui en résultent. De plus, la bibliographie traitant la préparation et la caractérisation des ces systèmes reste très limitée. C'est pour cette raison que les résultats attendus sont d'un très grand intérêt académique dans le domaine de la nano/microtechnologie et des applications dans le domaine pharmaceutique et biopharmaceutique.

Le présent manuscrit comporte neuf chapitres, dont quatre concernent une synthèse bibliographique, le travail expérimental est détaillé dans le reste des chapitres.

La synthèse bibliographique est divisée en quatre parties, dans la première, les différentes étapes pour la mise au point d'un nouveau médicament d'origine naturelle sont décrites, en passant par la réalisation d'une enquête ethnobotanique, la sélection de la plante, l'extraction et la caractérisation des principes actifs, l'étude pharmaco-toxicologique et enfin l'étude clinique. La deuxième partie est dédiée au diabète, qui est la pathologie visée dans notre travail. La troisième partie regroupe les différentes techniques de préparation et de caractérisation des nano/microsystèmes. La quatrième partie est un état de l'art sur la plante utilisée, elle comporte la botanique, la phytochimie et les activités biologiques de *Salvia officinalis*.

Les expérimentations réalisées tout au long de cette thèse de doctorat sont réparties en cinq parties principales, la première partie est le choix de la plante à étudier à travers une enquête ethnopharmacologique réalisée dans la région de la Mitidja, la deuxième partie est l'étude de la plante choisie qui est la sauge (*Salvia officinalis*), la troisième partie est la formulation de nanosystèmes pour la stabilisation/délivrance simultanée de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* et l'amélioration de son activité antidiabétique, la quatrième partie est la formulation de microsystèmes pour la stabilisation/délivrance simultanée de l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis* et l'amélioration de son activité antidiabétique, la sixième et dernière partie est l'étude de l'effet de la formulation sur le stress oxydatif et sur l'inflammation qui sont considérés comme étant les deux complications majeures du diabète.

Enfin, cette thèse est achevée par une conclusion générale qui met en relief les différents résultats clés auxquels on a abouti avec des recommandations et des perspectives pour la poursuite et la continuité de la recherche dans cet axe.

# CHAPITRE 1

## LA PHYTOTHERAPIE, DE L'ETHNOPHARMACOLOGIE AUX NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES

### 1.1. Introduction

Depuis son existence, l'Homme a été confronté aux maladies et aux problèmes de santé, grâce à son instinct de survie, il a utilisé tous ce qui il y a autour de lui pour remédier à ses problèmes (des parties de plantes, des tissus d'animaux, des substances organiques, des substances minérales ...).

Avec les avancés technologiques, le contrôle de la production de ces principes actifs à partir de végétaux, d'animaux ou mêmes de microorganismes est devenu possible et susceptible d'être optimisé par l'amélioration des procédés d'extractions [11] et le génie génétique [12,13].

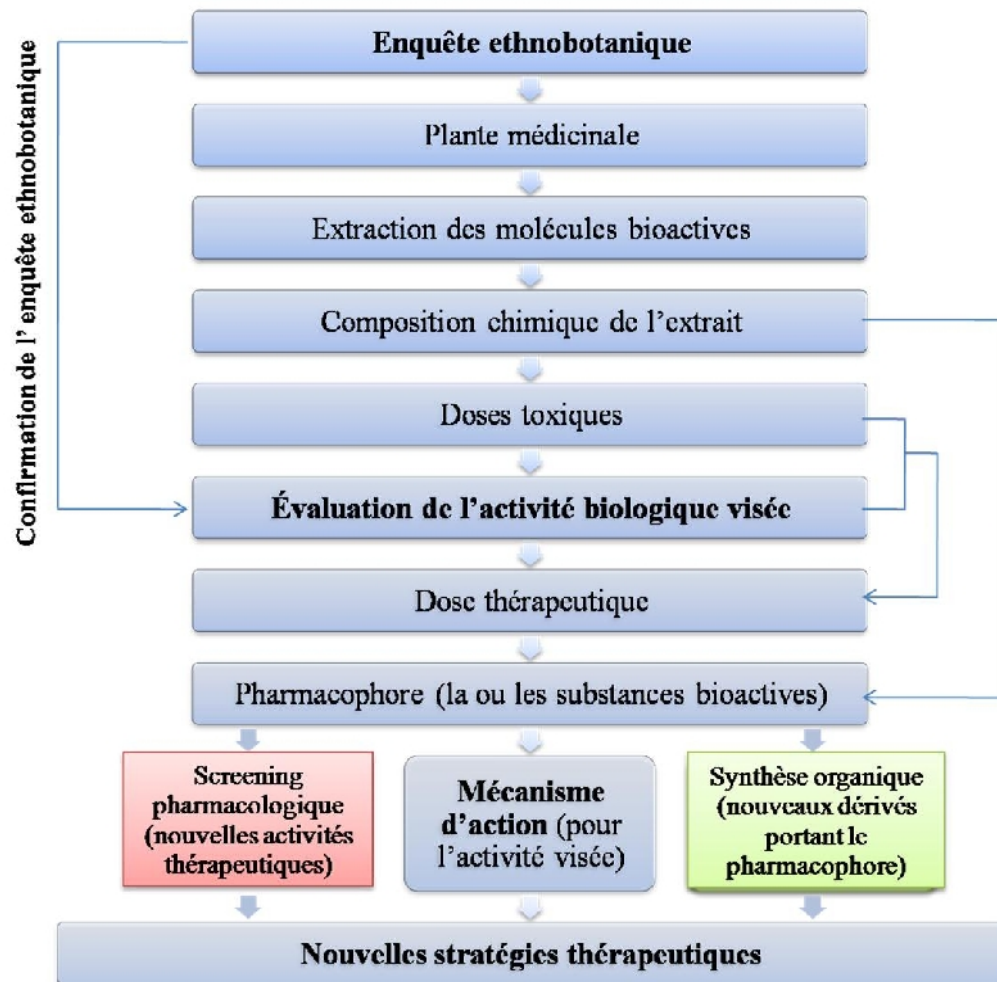
L'ethnopharmacologie peut être définie par l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale, et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier les états des organismes vivants, à des fins thérapeutiques, curatives, préventives, ou diagnostics. Actuellement, il est connu que 80 % de la population mondiale se soigne en faisant appel aux ressources des flores et des pharmacopées locales [4]; ceci par choix, mais trop souvent faute d'avoir accès aux avantages de la médecine moderne.

Dans les pays du Sud où la situation sanitaire est déplorable, il existe des connaissances, un système de soins traditionnels alliés à une riche pharmacopée végétale, et des savoir-faire, menés cependant sur la voie de l'érosion. Dans un souci d'autonomie des communautés et dans le cadre d'un développement durable et intégré, l'ethnopharmacologie appliquée tente de valoriser au mieux les pharmacopées locales suivant le schéma 1.1.

La valorisation des pharmacopées locales et des enquêtes ethnopharmacologiques est un axe de recherche pluridisciplinaire mettant en jeu la botanique, la biologie, la pharmacie, la médecine, la chimie et l'ingénierie. Le but final entre la combinaison de toutes ces sciences est la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des maladies humaines et animales, nous avons résumé les différentes étapes de ce processus dans le schéma 1.1. Ce chapitre est dédié à la description et à l'explication de ces différentes étapes par la synthèse des procédés d'extractions, des techniques d'analyses physico-



chimiques et des études toxico-pharmacologique des substances bioactives d'origine végétale.



**Figure 1.1 :** Diagramme représentant les différentes étapes pour passer d'une enquête ethnobotanique à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

## 1.2. Réalisation d'une enquête ethnobotanique

La réalisation d'une enquête ethnobotanique passe par 4 étapes principales :

- 1- Le choix de la thématique à étudier.
- 2- Le choix de la zone d'étude.
- 3- La préparation du questionnaire.
- 4- Le traitement des résultats obtenus.

### 1.3. De la sélection de la plante à la confirmation de l'enquête ethnobotanique

#### 1.3.1. Extraction des molécules bioactives

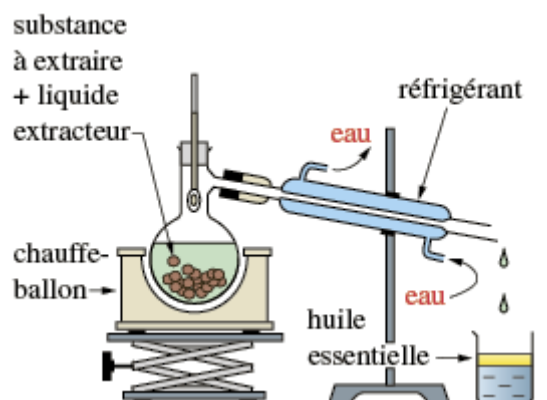
Les procédés d'extraction des molécules bioactives peuvent être classés en utilisant plusieurs critères [14] comme les phases intervenant dans le système (extraction solide-liquide, liquide-liquide ou solide-solide), l'avancé technologique (méthodes conventionnelles ou non-conventionnelles) ou encore selon le type des produits extraits (méthodes d'extraction des composés volatils et les méthodes d'extraction des composés non-volatils). C'est cette dernière classification qui va être utilisée dans notre présente étude.

##### 1.3.1.1. Procédés d'extractions des composés volatiles (procédés conventionnels)

L'extraction des composés volatiles (huile essentielle ou essence végétale) à partir de matières végétales peut être réalisée par extraction mécanique ou expression à froid [15], entraînement à la vapeur d'eau [16,17], hydrodistillation [18] ou encore l'extraction par solvant organique non aqueux volatile (hexane, éther...) [16]. Ces techniques conventionnelles peuvent être assistées par de nouvelles technologies comme les ultrasons [19], les micro-ondes [20] ou encore les fluides supercritiques [16,21,22].

##### 1.3.1.1.1. L'hydrodistillation

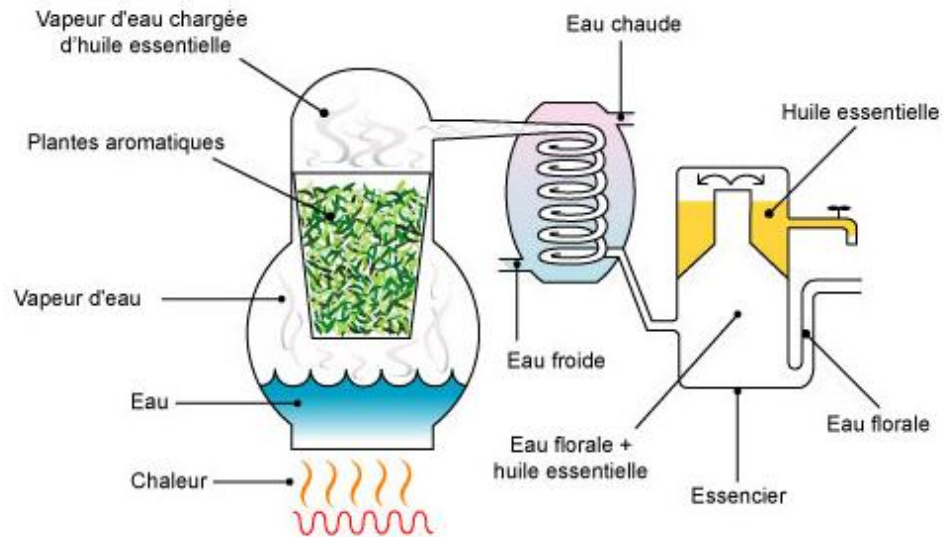
La plante aromatique en contact avec l'eau bouillante est chauffée, l'huile essentielle est ensuite évaporée et transportée par la vapeur d'eau puis distillée avec elle. La figure 1.2 ci-dessous illustre le schéma d'un montage d'hydrodistillation classique.



**Figure 1.2 :** Le schéma d'un montage d'hydrodistillation classique.

### 1.3.1.1.2. L'entraînement à la vapeur d'eau

Un flux de vapeur d'eau est injecté au contact de la plante aromatique contenant l'huile essentielle. Cette dernière est chauffée par la vapeur d'eau puis distillée avec elle. La figure 1.3 ci-dessous montre le schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.



**Figure 1.3 :** Le schéma d'un montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

### 1.3.1.2. Procédés d'extractions des composés non-volatiles (procédés conventionnels)

L'extraction des composés non-volatiles se fait par solvant (eau, solutions aqueuses, solvants organiques ...) par chauffage (infusion ou décoction) ou à froid (macération). Ces différentes techniques peuvent aussi être assistées par de nouvelles technologies comme les ultrasons [19], les micro-ondes [23] ou encore les fluides supercritiques [22].

#### Macération

Elle consiste à mettre la matière végétale dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou un solvant organique (macération huileuse, alcoolique ...), pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle est utilisée pour empêcher l'extraction des constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude [24] ou encore pour l'extraction des composés thermosensibles susceptibles d'être dégradés lors du chauffage [25,26].

### Infusion

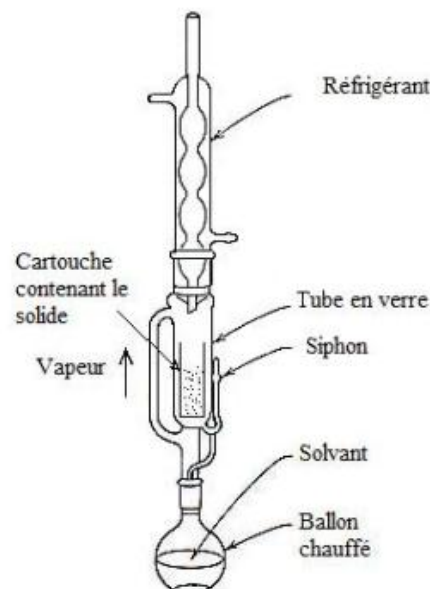
Elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties de plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales ; En d'autres termes, c'est une macération à chaud sans porter le système (matière végétale + eau chaude) à ébullition [26].

### Décoction

Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 min, pour extraire les principes actifs [26].

#### d. Extraction par Soxhlet

L'extraction par Soxhlet consiste en une série d'infusions réalisées par la régénération du même solvant de manière continue (le solvant s'évapore du ballon, se condense pour remplir le tube en verre qui contient la matière végétale, puis il redescend dans le ballon grâce au siphon), d'où l'augmentation du rendement et la rapidité de l'opération [27]. Le schéma d'un extracteur Soxhlet est donné dans la figure 1.4.



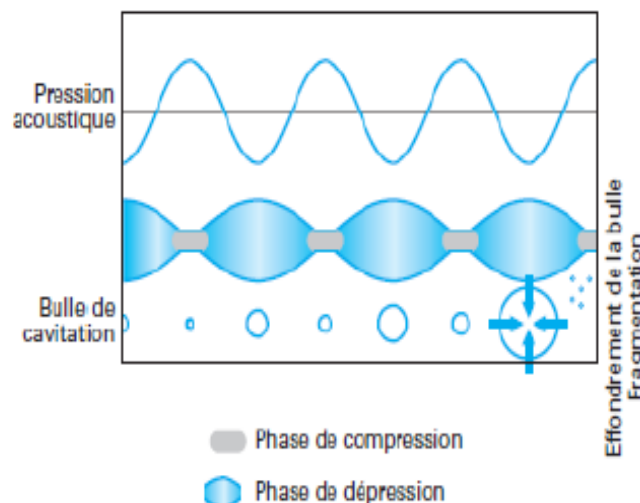
**Figure 1.4** : Schéma d'un extracteur Soxhlet.

### 1.3.1.3. Les procédés d'extractions innovants

#### L'extraction assistée par ultrasons

Méthode simple, efficace et peu coûteuse. Par rapport à une extraction classique, elle offre une augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Elle est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par sonication permet d'utiliser une large gamme de solvants afin d'obtenir différents composés naturels. Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale.

Les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression). Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction, la distance entre les molécules est augmentée et au-dessus d'une certaine distance, des bulles de cavitations vont se former [28]. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression (figure 1.5). La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie.



**Figure 1.5 :** Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation.

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide (figure 1.6), elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide.



**Figure 1.6** : Évolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide.

L'UAE est une technique utilisable avec n'importe quel type de solvant et simple à mettre en place. En effet, l'extraction peut être réalisée de manière très simple en utilisant un bain à ultrasons ce qui permet d'effectuer plusieurs extractions simultanément ou via une sonde ultrasonore. De plus, l'effet mécanique des ultra-sons sur la matrice végétale induit une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, ce qui améliore ainsi le transfert de masse et augmente le rendement et la cinétique d'extraction. Cependant une dispersion non homogène de la phase solide peut contribuer à l'atténuation des ondes ultrasons, et la zone qui les subit est alors restreinte à une zone localisée près de l'émetteur ce qui peut réduire le rendement d'extraction [28,29].

Cette technique consiste à soumettre la matière première et le solvant à l'action des ultrasons. Elle permet, en utilisant une technique simple avec une durée d'extraction souvent réduite. L'extraction par solvant assistée par ultrasons consiste à traiter sous ultrasons un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant comme l'hexane ou l'éthanol. Les ultrasons permettent d'accélérer l'extraction et de réduire le ratio solvant/charge. Un paramétrage adapté (puissance, cavitation, température, agitation) conduit, pour des durées d'extraction sous ultrasons de l'ordre de quelques minutes, à des rendements obtenus en quelques heures par des protocoles conventionnels. Cette mise en œuvre extrêmement courte préserve les composés les plus thermolabiles (acides gras polyinsaturés, caroténoïdes, polyphénols, arômes, alcaloïdes) des réactions de dégradation traditionnelles [19,30].

### L'extraction assistée par micro-ondes

Elle utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas coûteuse et elle est considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement haute (100-150°C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants. Les autres inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extrait [23,31].

### L'extraction avec des fluides supercritiques ou supercritiques

Cette technologie considérée « verte » est très attractive et performante. Ses avantages sont une durée d'extraction plus courte, une sélectivité élevée et la facilité d'éliminer le solvant après l'extraction par simple décompression du système d'extraction [22,32,33]. Exemples d'applications : extraction de principes actifs à partir de plantes médicinales [34], décaféination du café [35], délipidation d'aliments [36], purification de principes actifs [37], élimination de solvants résiduels [38] et extraction/traitement d'arômes, de colorants et d'agents de texture [39].

### L'extraction accélérée par solvants

Technique brevetée de la société DIONEX qui utilise les solvants conventionnels à des températures comprises entre 50 et 200°C et des pressions élevées comprises entre 100 et 150 bar. La pression exercée est assez élevée pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée. Pendant l'ASE (Accelerated Solvent Extraction), le solvant reste toujours en dessous de ses conditions critiques [40,41]. Ses avantages comparés aux techniques conventionnelles consistent à éviter les échauffements locaux et la consommation de plus petites quantités de solvant (comparé à l'extraction par Soxhlet et par batch avec agitation). Ses inconvénients sont liés à son coût élevé et surtout à sa non sélectivité, ce qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits. Les températures opératoires élevées peuvent aussi mener à une dégradation des solutés thermolabiles.

#### 1.3.1.4. Les facteurs influençant le transfert de matière lors de l'extraction

Les phénomènes de transfert de soluté dans le solide, en l'occurrence la matière végétale, sont affectés par plusieurs facteurs caractérisant la matière solide, le soluté et le solvant, ainsi que par les conditions opératoires.

##### Influence du solide

La taille et la structure de l'échantillon présentent un rôle important dans l'extraction. Plus la matière est finement divisée, plus la surface d'échange est grande, rendant ainsi le contact solide-liquide meilleur [42]. C'est pourquoi l'extraction des matières végétales est toujours précédée du broyage. Cependant, ce dernier poussé peut dégrader les principes actifs sous l'effet de la chaleur dégagée par les frottements. Les particules trop petites peuvent aussi engendrer des problèmes d'imperméabilité du lit de filtration.

##### Influence du soluté

Le soluté à extraire influence la diffusion de par sa structure moléculaire, sa taille, sa localisation, sa répartition et ses liaisons dans la matière végétale avec d'autres composés [43]. La vitesse de diffusion est inversement proportionnelle à la taille des particules du soluté, elle diminue quand la taille de ces dernières augmente. Par exemple, les vitesses d'extraction des composants hydrosolubles sont dans l'ordre croissant suivant : acides acétiques > sucre > phénol > pectines.

##### Influence du solvant

Les solvants souvent utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane), le CO<sub>2</sub> supercritique. Comme dans le cas du soluté, la taille des molécules de solvant exerce une influence sur la diffusion. Il est également question de sélectivité, afin d'extraire le maximum de soluté et le minimum des autres constituants du cytoplasme et plus généralement de la matière végétale. Car il va falloir ensuite séparer le soluté des autres molécules extraites. Le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion dans le solvant, l'agitation et la séparation mécanique [43-45].

Le choix du solvant se fait selon plusieurs critères [45] :

- la solubilité des composants spécifiques dans le solvant.



- la régénération du solvant si celui-ci doit être réemployé. Il ne doit pas former d'azéotrope avec un des composés qu'il solubilise et sa chaleur latente doit être faible.
- la tension interfaciale et la viscosité, car le solvant doit correctement mouiller la matrice solide.
- idéalement il doit être non toxique, stable, non réactif, non inflammable, inoffensif pour l'environnement et peu coûteux.

#### Influence de la température d'extraction

La température d'extraction a aussi une très grande importance dans le processus d'extraction. Une augmentation de la température favorise la solubilité et la diffusivité du soluté et réduit sa viscosité et celle du solvant. Mais elle peut entraîner une diminution de sélectivité suite à la perméabilité des parois cellulaires par dénaturation. Elle peut également dénaturer le produit à extraire comme elle augmente le risque de perte en solvant [46].

#### Temps de contact liquide-solide ou temps d'extraction

Le temps est un autre paramètre qui doit être pris en considération dans l'extraction de la matière végétale. Généralement, l'augmentation du temps de contact augmente le rendement du produit extrait souvent 15-20 minutes sont suffisantes. Parfois, il est nécessaire d'aller jusqu'à 60 minutes. Il faut noter cependant qu'un temps prolongé peut causer la dégradation des extraits [43].

#### Influence de l'humidité

En règle générale, les matières végétales sont séchées pour faciliter leur conditionnement et surtout leur stockage. Un surplus d'humidité peut donc détériorer le substrat. De plus, lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide [47].

#### Influence de l'agitation


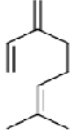
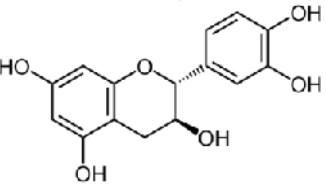
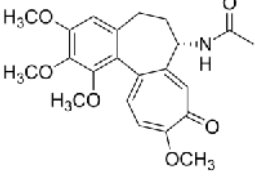
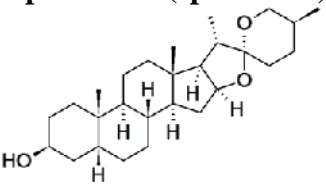
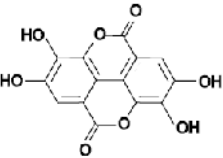
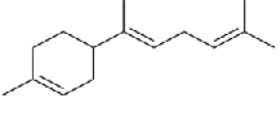
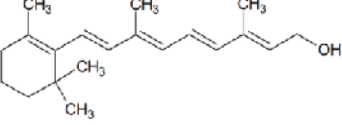
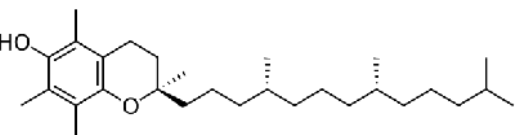
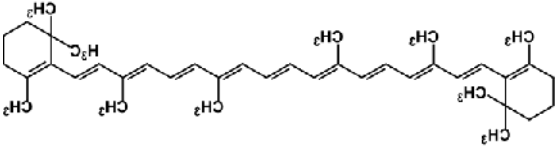
Une agitation mécanique des particules dans le solvant permet le maintien en suspension de celles-ci et l'homogénéisation du milieu. Elle a donc une grande influence sur le transfert de matière à l'interface solide-liquide [43].

### 1.3.2. Composition chimique des extraits

#### 1.3.2.1. La phytochimie et les principaux métabolites secondaires des végétaux

La phytochimie (chimie des végétaux) est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyse, de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. En dehors des métabolites primaires (lipides, glucides et protéines), les métabolites secondaires sont ceux qui représentent le plus grand intérêt biologique (utilisés dans tous les domaines) et économique (présent en très faible quantité et très difficile à obtenir). Les principales familles chimiques des métabolites secondaires du règne végétal sont les phénols, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponosides et les terpènes (les composés des huiles essentielles). Le tableau 1.1 ci dessous représente les structures chimiques des différentes familles phytochimiques.

**Tableau 1.1** : Les structures chimiques des différentes familles phytochimiques.

<p style="text-align: center;"><b>Phénols (hydroquinone)</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>terpènes (myrcène)</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>Flavonoïdes (catéchine)</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Alcaloïdes (Colchicine)</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>Saponosides (spirostane)</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Tanins (Ellagique)</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>Sesquiterpènes (Bisabolène)</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Diterpènes (vitamine A)</b></p> 
<p style="text-align: center;"><b>Triterpènes (vitamine E)</b></p> 	<p style="text-align: center;"><b>Tetraterpènes (β-carotène)</b></p> 

### Les phénols

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, ce sont des dérivés de l'acide benzoïque et l'aide cinnamique. Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence d'au moins deux groupes phénoliques associés en structures plus ou moins complexes [48], généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes.

### Les tanins

Les tanins sont des substances végétales de la famille des polyphénols, le plus souvent hydrosolubles, qui possèdent la capacité de précipiter les protéines, alcaloïdes et polysaccharides, à partir de leur solution aqueuse [49-51].

Les tanins sont des composés non azotés, soluble dans l'eau, l'alcool, l'acétone, peu soluble dans l'éther, de saveur astringente et ayant la propriété commune de tanner la peau. Leur poids moléculaire varie de 500 à 3000 K Da. Dans les plantes, les tanins existent à l'état de complexes, les tannoïdes; certains combinés à des sucres sont dénommés tanosides.

### Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux. Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très répandues chez les végétaux. On les trouve dissoutes dans les vacuoles à l'état d'hétérosides presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs des fruits et parfois des feuilles [52].

### Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances azotées d'origine biologique et le plus souvent végétale (ils sont rares dans le règne animal). Ils renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'azote, et le plus souvent, en plus de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre). Les alcaloïdes sont donc des produits aminés naturels qui ont des effets physiologiques sur l'organisme humain [53].

### Les saponosides

Les saponines sont généralement connus comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui existent principalement dans le règne végétal. Le nom «saponine» est dérivé du mot latin «sapo» qui signifie «savon». En effet, les molécules de saponines dans l'eau forment une solution moussante [54].

### Les terpènes (les composés des huiles essentielles)

Une huile essentielle est un mélange de molécules variées, comprenant en particulier des terpènes (hydrocarbures non aromatiques), c'est-à-dire dérivés de l'isoprène et non du benzène, et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones et ester).

Le nombre des composants isolés au sein des huiles essentielles est d'environ un millier et il en reste encore beaucoup à découvrir [55-59]. Ces constituants sont surtout des carbures terpéniques et leurs dérivés d'oxydation, des dérivés aromatiques et des dérivés divers provenant de glucosides.

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou non (acyclique, monocyclique, bicyclique ou tricyclique). Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ). Ils comprennent:

- Les monoterpènes. ( $C_{10}$ ).
- Les sesquiterpènes. ( $C_{15}$ ).
- Les diterpènes. ( $C_{20}$ ).
- Les triterpènes. ( $C_{30}$ ).
- Les tetraterpènes. ( $C_{40}$ ).
- Les polyterpènes. ( $> C_{40}$ ).

#### 1.3.2.2. Détermination de la composition chimique d'un extrait de plante

La détermination de la composition chimique qualitative et quantitative peut être évaluée par des dosages physicochimiques comme le dosage des polyphénols par le réactif de Folin-Ciocalteu [60], le dosage des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium [61] ou encore le dosage des tanins par la précipitation à la caséine [62]. Mais les techniques chromatographiques analytiques restent les plus précises soit par l'utilisation des standards

dans des équipements de chromatographie analytique simple (HPLC ou CPG) ou encore par l'utilisation de techniques analytiques très avancées comme le couplage chromatographie-spectrométrie de masse (GC/MS et la LC/MS/MS).

#### GC/MS pour les composés volatils

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon d'huile essentielle, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des différents composés constituant cette huile en fonction de leur rapport masse sur charge ce qui offre une grande précision à cet équipement d'où la détection des composés en très petites quantités, même à l'état de traces [63].

#### LC/MS/MS pour les composés non-volatils

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. Une unité LC-MS-MS est composée de deux blocs principaux : un chromatographe en phase liquide muni d'un détecteur de spectromètre de masse. Au contraire du couplage simple, le couplage LC/MC/MC double permet l'identification après une comparaison à la base de données déjà existante mais aussi d'obtenir le spectre de masse exact des molécules analysées [64].

#### 1.3.2.3. Isolation, purification et résolution structurale d'une molécule à partir d'un extrait

Après l'analyse qualitative et quantitative des extraits de plantes, une étude plus approfondie peut être réalisée pour l'isolation de chaque molécule contenue dans l'extrait (par chromatographie préparative), sa purification (par une installation chromatographique de purification) et la détermination de sa structure chimique d'une manière précise et irrévocable (par RMN et DRX-MC).

#### La chromatographie préparative

La chromatographie préparative est une technique utilisée pour purifier et récupérer des échantillons, que ce soit après une synthèse organique ou une étape d'extraction. Les échantillons récupérés seront ensuite identifiés par des méthodes d'analyse telles que la

RMN ou la spectrométrie de masse. Ils pourront aussi être utilisés pour des applications telles que des tests cliniques dans le cas de principes actifs de médicaments [65].

### La résolution structurale par RMN ou DRX-MC

La spectroscopie RMN est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Elle est basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire [66,67]. Elle est utilisée pour la détermination des structures des molécules organiques. La diffraction des rayons X sur monocristal (DRX-MC) est une technique utilisée pour la détermination structurale des molécules ayant des structures très complexes et n'ayant pas pu être résolues par RMN en étudiant les mailles de ces dernières [68].

### 1.3.3. Caractérisation pharmaco-toxicologique des molécules bioactives

#### 1.3.3.1. Étude de la toxicité aiguë, subaiguë et chronique

##### La toxicité aiguë

Est la toxicité induite par l'administration d'une dose unique et massive d'un produit toxique, décrite comme la dose qui risque à 50 % de tuer un être vivant [69]. Elle est parfois notée LD50.

##### Toxicité subaiguë

Toxicité réitérée pendant au maximum 28 jours. L'intoxication subaiguë correspond à des expositions fréquentes et répétées sur une période de plusieurs jours ou semaines pour que les symptômes d'intoxication apparaissent.

##### Toxicité subchronique

Toxicité réitérée pendant plus de 28 jours et moins de 90 jours.

##### Toxicité chronique

Toxicité réitérée pendant plus de 90 jours. Dans le cas d'une intoxication chronique, les expositions sont répétées sur de longues périodes, la manifestation de l'intoxication dépend soit du poison qui s'accumule, soit des effets engendrés qui s'additionnent.

### 1.3.3.2. Confirmation de l'activité biologique visée et détermination de la dose thérapeutique

Après l'étude toxicologique, l'activité biologique est évaluée pour les molécules bioactives. La méthodologie entreprise pour ces études doit obligatoirement être décrite dans le « drugs discovery » qui est une base de données regroupant tous les protocoles de l'expérimentation in-vivo et in-vitro pour évaluer les activités biologiques [70-72].

Lors des études pharmacologiques, l'effet de dose doit obligatoirement être étudié (toutes les doses testés doivent être inférieur a la dose toxique préalablement estimée), a l'issu des études la dose thérapeutique optimale est déterminée.

### 1.3.3.3. Détermination de la relation pharmacophore-activité biologique

Le mécanisme d'action est déterminé en deux étapes :

- La modélisation moléculaire en utilisant des logiciels informatiques [73-77].
- L'évaluation des activités pharmacologiques in-vitro et/ou in-vivo (des activités qui n'existent pas forcément dans la bibliographie mais qui sont spécialement conçus par les cliniciens pour évaluer les molécules bioactives en questions, une confirmation expérimentale de la théorie (obtenu par l'outil informatique) [70,71].

Dans le cas ou l'interaction pharmacophore-récepteur est révélée pour la première fois il s'agit de « nouvelle stratégie thérapeutique ». Cette interaction vas aboutir a une nouvelle classe ou une nouvelle génération de médicaments.

### 1.3.3.4. Nouvelles activités pharmacologiques pour les pharmacophores (Le criblage pharmacologique)

L'expression de criblage ou criblage à haut débit désigne dans le domaine de la pharmacologie, de la biochimie, de la génomique et de la protéomique, les techniques visant à étudier et à identifier dans les chimiothèques et ciblothèques, des molécules aux propriétés nouvelles, biologiquement actives [78].

L'expression haut débit évoque ici l'utilisation de la robotique, de l'informatique et de la bio-informatique pour accélérer la phase de test des molécules. En vue du processus de production des médicaments, le criblage à haut débit s'appuie sur la bio-informatique, la génomique, la protéomique, la robotique, et parfois les nanotechnologies.

#### 1.3.3.5. Synthèse de nouveaux dérivés portant les pharmacophores

La synthèse de nouveaux dérivés portant le site actif découvert est l'une des missions principales des chimistes spécialistes en synthèse organique de molécules bioactives. Cette synthèse est basée sur le greffage de nouveaux groupements chimiques permettant d'augmenter l'efficacité thérapeutique de la molécule bioactive initiale [79].

Cette stratégie a longtemps été adaptée par les grands laboratoires pharmaceutiques avant de breveter la molécule bioactive en question pour vérifier la structure chimique permettant l'effet thérapeutique optimal.

L'un des exemples les plus importants dans le domaine pharmaceutique est la metformine, après la découverte de cette dernière par le laboratoire pharmaceutique allemand Merk, elle a été transformée en chlorhydrate de metformine pour augmenter son efficacité thérapeutique en augmentant sa solubilité (le sel de metformine est complètement soluble comparé à la molécule organique de base) [80].

#### 1.4. Conclusion

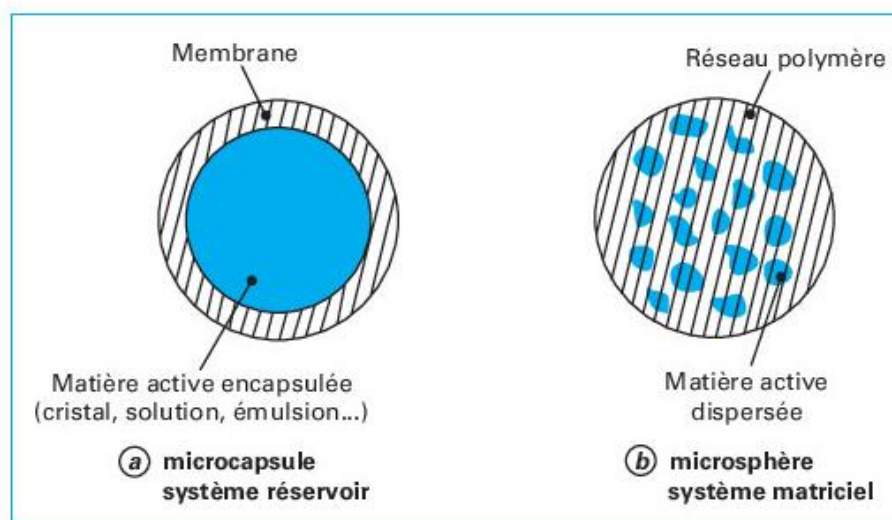
Les plantes ont toujours été, et resteront, la plus grande source de médicaments dans notre planète. L'identification de nouvelles plantes suite aux enquêtes ethnobotaniques nous confirme cette richesse. L'extraction et la caractérisation de ces molécules bioactives est aussi en évolution continue pour améliorer les procédés d'extraction et découvrir de nouveaux pharmacophores.



## CHAPITRE 2

LES NANO/MICROSYSTEMES POUR L'ENCAPSULATION DES SUBSTANCES  
NATURELLES2.1. La nano/micro-technologie un défi pour la science

La nanotechnologie regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de nanoparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active [81]. Les nanoparticules présentent une taille comprise entre 1nm et 1 µm et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active [82]. Les matières actives sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes ou encore des cellules [82-86]. Les matériaux enrobants sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides. Les nanoparticules obtenues présentent deux types de morphologies, soit une nano/microcapsule, c'est-à-dire une particule réservoir constituée d'un cœur de matière active liquide (plus ou moins visqueux) ou solide, entouré d'une membrane solide continue de matériau enrobant (figure 2.1); soit une nano/microsphère, une particule constituée d'un réseau macromoléculaire ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve finement dispersée la matière active, à l'état de molécules, de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions (figure 2.1) [86].

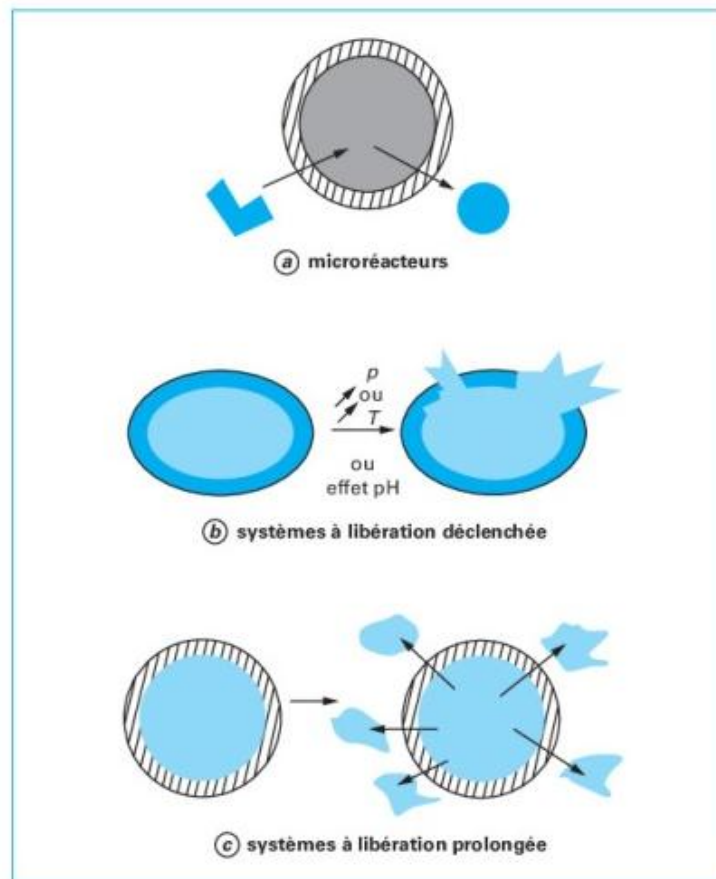


**Figure 2.1** : Morphologie des nanoparticules [86].

Sur le plan industriel, la nanoencapsulation est mise en œuvre pour remplir les objectifs suivants : assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation, réaliser une mise en forme adaptée, améliorer la présentation d'un produit, masquer un goût ou une odeur, modifier et maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir, par exemple un effet prolongé ou déclenché.

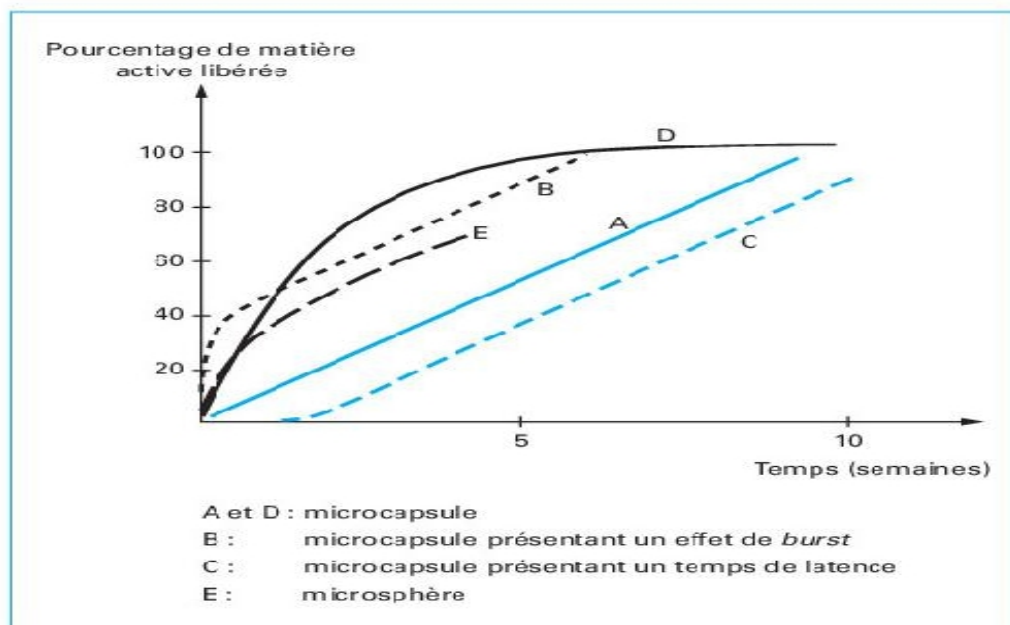
## 2.2. Les Micro/nanosystèmes pour la vectorisation des médicaments

Lorsque l'on considère les interactions matière active/milieu extérieur, les microparticules peuvent être classées en deux catégories, celles qui ne doivent pas libérer leur contenu telles que les microréacteurs contenant des enzymes ou des bactéries, et celles qui sont formulées de façon à libérer la matière active encapsulée [86,87]. Dans ce dernier cas, il faut distinguer les systèmes à libération déclenchée des systèmes à libération prolongée (figure 2.2).



**Figure 2.2 :** Microréacteurs et systèmes à libération déclenchée et prolongée [86].

- Les systèmes à libération déclenchée sont généralement des microcapsules formées d'une membrane étanche, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique) ou par fusion sous l'effet de la température.
- Les systèmes à libération prolongée se distinguent les uns des autres par les mécanismes de libération mis en jeu (diffusion passive, dégradation/dissolution du matériau enrobant, échange d'ions...) et par leur structure (microcapsule ou microsphère) qui va directement influencer sur la cinétique de libération résultante [86]. Ainsi, pour des microparticules libérant leur contenu selon un mécanisme de diffusion passive à travers le matériau enrobant (lois de Fick), les profils de libération peuvent être très différents (figure 2.3).



**Figure 2.3 :** Profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules [86].

À partir de microcapsules, on peut obtenir des cinétiques de libération d'ordre 0 (profil A) ou d'ordre 1 (profil D), en fonction de la solubilité dans l'eau de la matière active.

Les cinétiques d'ordre 0 peuvent être modifiées dans leur phase initiale : soit la vitesse de libération est exagérément marquée en raison de la présence d'un excès de matière active dans la membrane (profil B), soit un temps de latence qui précède la libération ; temps nécessaire par exemple pour que le principe actif diffuse à travers la membrane avant d'atteindre le milieu extérieur (profil C).

A partir de microsphères, le phénomène de diffusion de la molécule active à travers une matrice est décrit par une cinétique qui obéit à la loi d'Higuchi (profil E). Dans sa forme simplifiée (modèle planaire), la loi d'Higuchi montre que la quantité libérée de matière active est directement proportionnelle à la racine carrée du temps.

### 2.3. Effets des Micro/nanosystèmes sur les effets thérapeutiques d'un médicament

Les Micro/nanosystèmes influencent la libération et la cinétique de dissolutions in-vitro donc influence inévitablement la biodisponibilité in-vivo des médicaments. Cette logique a été démontrée dans plusieurs études ; l'augmentation de l'activité antidiabétique du glimepiride après son encapsulation dans les cyclodextrines [88], amélioration de l'activité anti-inflammatoire du piroxicam après encapsulation dans des microsphères de polycarbonates [89], augmentation de l'activité hypocholestérolémiante de l'atorvastatine après sa nanoencapsulation [90] ou encore l'augmentation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles sous forme de nanoencapsules [91].

### 2.4. Élaboration et caractérisation de ces systèmes

Les micro/nanosystèmes sont de nouveaux systèmes particuliers de délivrance de médicaments, sphériques et de tailles variables allant de 10 nm à 1mm, et pouvant, de par leur taille et leur structure, améliorer l'administration des principes actifs [92]. Les objectifs recherchés lors de la préparation de microparticules sont à la fois de disperser, de protéger, ou de stabiliser une matière active au sein d'un support tout en contrôlant sa libération [93]. Ceux des formes vectorisées telles que les nanoparticules et les liposomes incluent en plus la capacité de délivrer la molécule active plus spécifiquement au niveau du site d'action, indépendamment de ses propriétés physiques [94]. Le principe actif associé sera principalement libéré par diffusion et/ou dégradation du matériau support, de façon contrôlée et prédéterminée par les propriétés physico-chimiques des particules et leur procédé de fabrication [95].

Les microparticules présentent de nombreux avantages comme systèmes de libération de principes actifs, tels que la biocompatibilité [96], la biodégradabilité [97], la stabilité physicochimique [98], le faible coût de fabrication [99], une capacité de charge importante de principes actifs aussi bien lipophiles, hydrophiles, et macromoléculaires comme l'insuline

[100-102], et un contrôle précis de la libération des principes actifs incorporés [103]. L'utilisation des microparticules est aussi très diversifiée, telle qu'une utilisation par voie sous-cutanée [104], topique [105], orale [106], intramusculaire [107] ou pulmonaire [108].

Les microparticules sont préparées avec ou sans solvant organique, à chaud ou à basse température. Le développement des microparticules peut être limité par l'instabilité physique de certains lipides et par le manque de contrôle de libération du principe actif encapsulé. En fait, le tensioactif adsorbé en surface des microparticules ce qui permet de les stabiliser, et le plus souvent est une libération prématurée d'une partie du principe actif encapsulé.

Le poids et la forme d'une microparticule ont également une grande importance, car ils modifient sa cinétique environnementale (déposition plus rapide pour les particules plus lourdes), son intégration dans le métabolisme des organismes et ses impacts sanitaires.

#### 2.4.1. Caractéristiques générales

##### Structure et taille

Les microparticules sont composées d'un matériau enrobant constitué de polymères synthétiques ou naturels ou encore de lipides et d'une manière active. Elles présentent une taille comprise entre 1 et 1000  $\mu\text{m}$ . Leur distribution granulométrique est de type Gaussien, varie avec le procédé de fabrication choisi et est déterminée par granulométrie à variation de résistance électrique ou diffraction laser [109]. La morphologie des microparticules peut être observée par microscopie optique ou électronique.

Les polymères formant le matériau enrobant peuvent être d'origine naturelle (gélatine, chitine, alginate de sodium, agarose...), héli synthétique (dérivés de la cellulose ...) ou synthétique comme les copolymères des acides lactiques et glycolique couramment utilisés. Selon le domaine d'application des microparticules, des propriétés de biocompatibilité et/ ou de biodégradabilité seront requises. Les lipides (acides gras, glycérides, cholestérol) seront plutôt utilisés sous forme solide, de même que les cires naturelles ou minérales. D'autres matériaux tels que des stabilisants (tensioactifs, dispersants, anti-mottant) ou des cryoprotecteurs peuvent être ajoutés à la formulation des microparticules. L'ensemble des composés va intervenir dans le profil de libération de la matière active.

### Encapsulation et libération

Les microparticules contiennent de manière très variable entre 1 et 90% en masse de matière active. Les taux d'encapsulation déterminés par HPLC ou spectrométrie sont généralement plus élevés au sein des réservoirs formés par des microcapsules.

Différents facteurs physico-chimiques tels que la charge électrique de surface, la mouillabilité, la porosité et le degré de gonflement des microparticules, ainsi que les polymères utilisés (caractérisés par analyse calorimétrique différentielle ou chromatographie d'exclusion stérique) peuvent influencer la libération du principe actif encapsulé. L'état physique de ce dernier est également un facteur à prendre en considération.

En effet, une dispersion moléculaire de matière active encapsulée ne se libère pas de la même manière que des cristaux et n'aura plus la même stabilité au sein du système.

Certaines particules fabriquées pour l'encapsulation de cellules, d'enzymes ou de bactéries sont destinées à garder leur contenu [110]. D'autres doivent les libérer de manière brutale comme dans le domaine des autocopiants en papeterie, par exemple.

#### 2.4.2. Les différents types de microparticules

Les procédés de microencapsulation permettent de préparer des microparticules de deux types (figure 2.1) [86]:

- Les microcapsules, la particule réservoir est constituée d'un cœur de matière active liquide (plus ou moins visqueux) ou solide, entourée d'une écorce solide continue de matériau enrobant. Les microcapsules ne sont pas nécessairement sphériques ;
- Les microsphères, un réseau macromoléculaire ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve la matière active finement dispersée, à l'état de molécules, de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions.

#### 2.4.3. Les différents procédés de microencapsulation

Avant de procéder à une microencapsulation, il faut tenir compte de [86] :

- la taille moyenne et la largeur de la distribution granulométrique.

- la teneur en matière active ou taux d'encapsulation.
- la forme finale: dispersion de microparticules en phase aqueuse ou en phase solvant, poudre sèche.
- les contraintes de stabilité au cours du stockage et au cours de la mise en œuvre.
- la durée de conservation sans libération de matière active, ainsi que le milieu dans lequel les particules seront conservées.
- les conditions de libération et la cinétique de libération. Si l'on souhaite une libération déclenchée, il devra en particulier être précisé quel est le paramètre de déclenchement: pression ou cisaillement mécanique, variation de température, variation de pH, dégradation enzymatique. Pour une libération prolongée, la durée souhaitée de la période de libération sera une des données du problème.
- les contraintes réglementaires liées au domaine d'application et au mode d'administration qui sont prescrites dans les réglementations nationales et internationales (Pharmacopée Européenne ou USP par exemple, pour le domaine de la pharmacie).

Les choix du procédé et de la formulation déterminent les caractéristiques finales de microparticules. Les différents procédés de microencapsulation sont donnés dans le tableau 2.1.

**Tableau I.1** : Les trois grandes classes de procédés industriels de microencapsulation [86].

Procédés physico-chimiques	Procédés mécaniques	Procédés chimiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Séparation de phases ou coacervation (simple ou complexe).</li> <li>- Évaporation – Extraction de solvant.</li> <li>- Gélification thermique d'émulsions (ou <i>hot melt</i>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nébulisation/séchage (<i>spray-drying</i>).</li> <li>- Gélification ou congélation de gouttes.</li> <li>- Enrobage en lit fluidisé (<i>spray-coating</i>).</li> <li>- Extrusion/sphéronisation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Polycondensation interfaciale.</li> <li>- Polymérisation interfaciale.</li> <li>- Polymérisation en milieu dispersé (émulsion, miniémulsion, microsuspension...) par voie radicalaire ou anionique.</li> </ul>

### 2.4.3.1. Procédés physico-chimiques

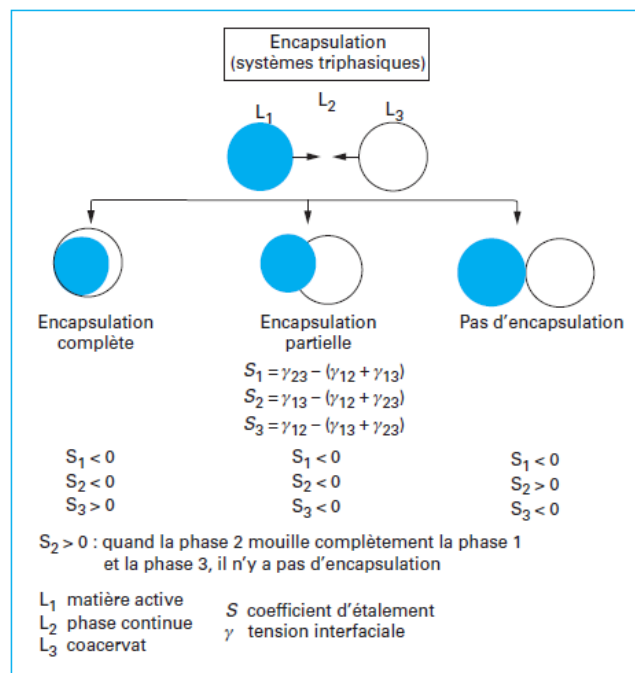
#### Procédé basé sur la séparation de phase

La coacervation est le phénomène de désolvation des macromolécules, conduisant à une séparation de phases au sein d'une solution. A l'issue de la coacervation, deux phases sont présentes dans le milieu :

- le coacervat : riche en polymère et pauvre en solvant.
- le surnageant : pauvre en polymère et riche en solvant.

Si une matière active est dispersée dans ce milieu, sous forme de gouttelettes par exemple, le coacervat formé pourra l'encapsuler si les conditions d'étalement des phases sont respectées.

La figure 2.4 représente trois situations possibles: cas où une encapsulation complète aura lieu, partielle, ou pas d'encapsulation, (l'encapsulation est complète si le coacervat mouille spontanément la surface de la matière active, c'est-à-dire lorsque  $S_3 > 0$ ,  $S_2 < 0$  et  $S_1 < 0$ ).



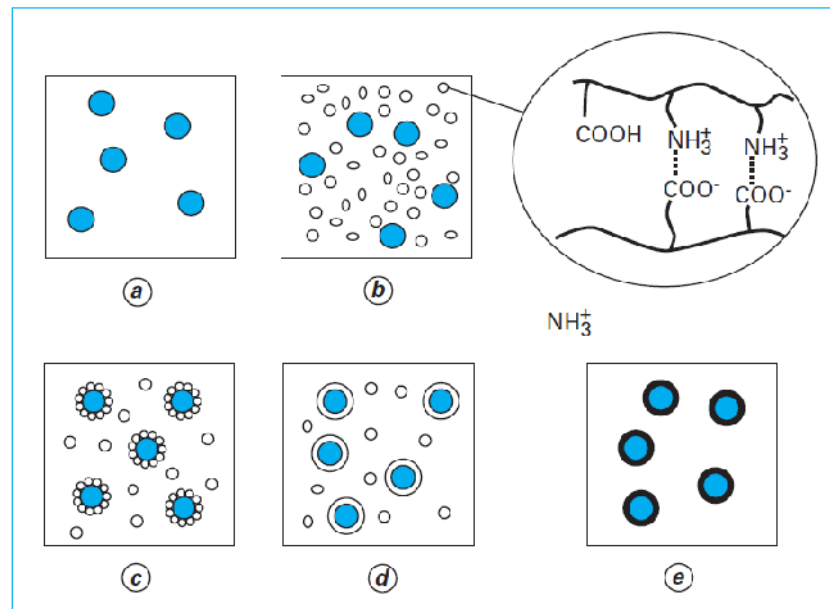
**Figure 2.4 :** Comportement d'un coacervat vis-à-vis d'une phase liquide non miscible [86].



### Microencapsulation par coacervation complexe

La coacervation complexe est une désolvatation simultanée de deux polyélectrolytes hydrosolubles portant des charges opposées en provoquant une modification de pH du milieu aqueux. En effet, la structure du coacervat est complexe puisqu'elle comporte deux polymères.

Le procédé de microencapsulation par coacervation complexe se déroule de la façon suivante (figure 2.5) :



**Figure 2.5** : Schéma de principe du procédé de microencapsulation par coacervation complexe [86].

- Dans un premier temps, le produit à encapsuler (sous forme liquide ou solide) est dispersé dans une solution aqueuse contenant les deux polymères (phase a).
- Dans un deuxième temps, la coacervation est induite par un ajustement du pH de la solution, de façon que les charges positives du premier polymère équilibrent les charges négatives du second (phase b). L'attraction électrostatique des deux polyélectrolytes provoque l'apparition d'un coacervat mixte.

- Dans un troisième temps, les gouttelettes de coacervat formé viennent s'adsorber (phase c) à la surface de la matière active à encapsuler et former un enrobage continu (phase d). Finalement, cet enrobage est consolidé par réticulation (phase e) des macromolécules constitutives du coacervat.

Les polycations qui sont généralement utilisés sont la gélatine [111-113] de haut point isoélectrique et le chitosane [114-117] avec un important degré de déacétylation. Les polyanions les plus utilisés sont la gomme arabique [118], les alginates [119], les carraghénanes [120] et la pectine [121]. Les particules obtenues sont des microcapsules et les taux d'encapsulation peuvent atteindre les 80% [122].

#### Microencapsulation par coacervation simple

La coacervation simple se rapporte aux procédés faisant intervenir la désolvatation d'un seul polymère par l'un des facteurs suivants : abaissement de température, addition d'un nonsolvant, addition d'électrolytes, addition d'un deuxième polymère incompatible. Ce phénomène peut se dérouler en milieu aqueux ou organique. Les étapes du procédé sont en tous points identiques à celles décrites pour la coacervation complexe [86].

#### Procédés d'évaporation et d'extraction de solvant

La méthode de microencapsulation par évaporation de solvant repose sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion sous agitation. Les étapes sont résumées comme suit: Initialement, le matériau d'enrobage, généralement un polymère hydrophobe, est dissous dans un solvant organique volatil. La molécule active à encapsuler est alors soit dissoute, soit dispersée dans la solution organique [123].

#### 2.4.3.2. Procédés mécaniques

##### Procédé de nébulisation/séchage

Le procédé de nébulisation/séchage est un procédé continu en une seule étape qui permet de transformer une formulation liquide initiale en une forme microparticulaire sèche [124].

### Procédé d'enrobage en lit fluidisé

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé s'applique exclusivement à des matières actives constituées de particules solides (granulés et cristaux). Des matières actives liquides peuvent néanmoins être encapsulées après absorption par des supports particuliers poreux. Le procédé permet de réaliser un enrobage continu de particules qui conduit donc à la production de microcapsules [125].

#### 2.4.3.3. Procédés chimiques

##### Polycondensation interfaciale

La polycondensation interfaciale est un procédé qui permet de préparer in situ une membrane polymère à la surface de gouttelettes d'émulsion, grâce à une réaction chimique entre deux monomères bien choisis, la réaction se déroulant à l'interface entre la phase dispersée et la phase dispersante. La méthode s'applique à des solutions de matières actives, aussi bien organiques qu'aqueuses, ou à des matières actives liquides [126].

##### Autres procédés chimiques

Les autres procédés chimiques de microencapsulation sont des procédés basés sur la polymérisation radicalaire ou anionique en milieu dispersé. Il s'agit des procédés de polymérisation en : émulsion [127], microsuspension [128], dispersion [129], miniémulsion [130] et microémulsion [131].

#### 2.4.4. L'encapsulation moléculaire et les complexes d'inclusions

Le mode d'administration d'un médicament joue très souvent un rôle déterminant dans l'expression de l'activité pharmacologique. L'encapsulation du principe actif dans une molécule hôte constitue une des approches les plus récentes et les plus prometteuses du transport des médicaments [132-134].

##### 2.4.4.1. La chimie supramoléculaire

La chimie supramoléculaire est une branche de la chimie qui repose sur les liaisons non-covalentes ou faibles entre différentes molécules, les différences entre la chimie moléculaire et supramoléculaire sont données dans le tableau 2.2. Son objectif est de comprendre ou de construire des édifices de taille nanométrique. Le principe est d'utiliser des briques moléculaires qui, une fois mélangées en solution, dans des conditions contrôlées, s'autoassemblent pour donner des édifices plus complexes. L'étude des interactions non-covalentes et des relations entre fonction et structure sont à la base de la compréhension des systèmes biologiques. Le monde biologique est souvent une source d'inspiration dans la modélisation d'assemblages supramoléculaires.

**Tableau 2.2** : Comparaison entre la chimie moléculaire et la chimie supramoléculaire.

<b>Chimie</b>	<b>Moléculaire</b>	<b>Supramoléculaire</b>
Interaction	Intramoléculaire (entre atomes)	Intermoléculaire (entre molécules)
Liaison chimique	Covalente	Non covalente
Produit de préparation	Molécule	Supermolécule (complexe)
Processus de préparation	Synthèse	Complexation

#### 2.4.4.2. Les interactions dans chimie supramoléculaire

Les interactions à la base de la chimie supramoléculaire peuvent être des interactions :

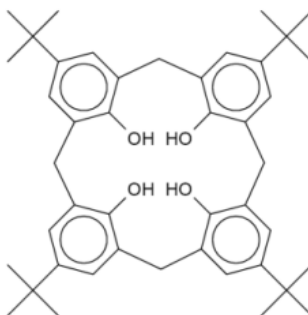
- de van der Waals. De 0,1 à 1 kcal/mol, elles sont non directionnelles et augmentent avec la surface de contact.
- de type liaison hydrogène. De 1 à 10 kcal/mol, cette liaison est directionnelle et sa force dépend de la distance entre les sites donneur et accepteur.
- aromatiques (recouvrement  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -cation,  $\pi$ -liaison H). Ce sont des interactions non covalentes dues au recouvrement des orbitales p de cycles aromatiques avec d'autres cycles aromatiques, des orbitales p ou f de cations métalliques ou avec l'orbitale moléculaire d'un électron porté par un hétéroatome plus électronégatif (O, N, S, etc.).

- coulombiennes (ion/ion, ion/dipôle), dipolaire (dipôle/dipôle), par polarisation (ion/molécule polarisée). De 15 à 50 kcal/mol, ces interactions électrostatiques sont non directionnelles et dépendent de la distance entre les deux entités.
- de coordination métal/ligand. De 50 à 80 kcal/mol, la directionnalité de la liaison dépend de la nature du métal et des autres constituants de sa sphère de coordination.
- ou encore le résultat d'un effet hydrophobe.

#### 2.4.4.3. Les principaux écrans moléculaires

##### Calixarène

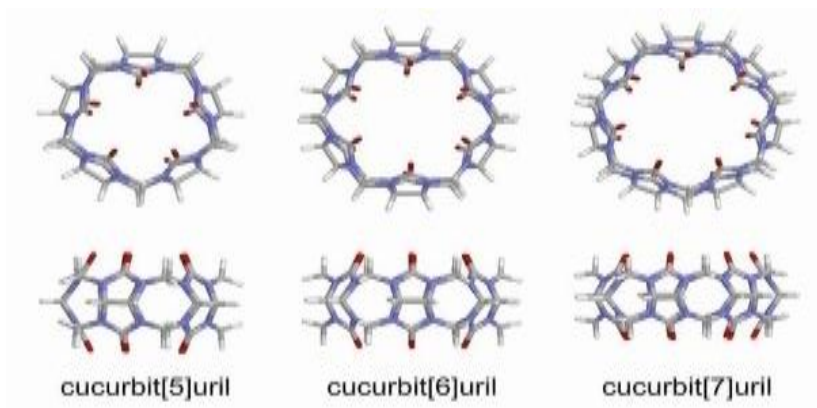
Un calixarène est un macrocycle issu de la réaction d'un phénol et d'un aldéhyde. Les calixarènes ont des cavités hydrophobiques qui peuvent inclure des petites molécules ou des ions. Les plus couramment rencontrés sont les calixarènes à 4, 5, 6 et 8 unités phénols. La cavité ainsi formée permet de complexer des ions ou des petites molécules (figure 2.6) [135]. On peut accéder à des calixarènes hydrosolubles en ajoutant des motifs ioniques par exemple.



**Figure 2.6 :** Calix[4]arène avec des substituants para-tert-butyle.

##### Cucurbiturile

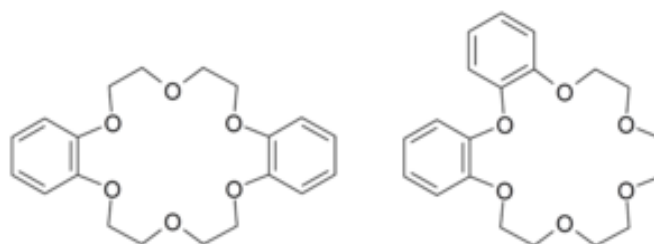
Les cucurbituriles sont des molécules macrocycliques formées d'unités glycolurile [=C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>=]. Les atomes d'oxygène de la molécule sont orientés vers le centre de la molécule, formant ainsi une cavité partiellement fermée. Le nom « cucurbiturile » dérive de la ressemblance de la molécule avec une citrouille (famille des cucurbitacées) [136]. Les cucurbituriles sont couramment nommés cucurbit[n]uril, où n représente le nombre d'unités glycolurile. Deux abréviations couramment employées sont CB[n], ou CBn (figure 2.7) [137].



**Figure 2.7:** Structures des Q5, Q6, et Q7.

### Éther couronne

Les éthers couronnes sont des composés chimiques hétérocycliques qui, dans leurs formes les plus simples, sont des oligomères cycliques d'oxyde d'éthylène. L'unité de répétition essentielle de tout éther couronne est le groupe éthylèneoxy-, soit  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ , qui se répète deux fois dans le dioxane et six fois dans le 18-couronne-6 (ou encore 18-C-6). Le cycle à neuf éléments 1, 4,7-trioxonane (9-couronne-3) est parfois appelé couronne et peut interagir avec les cations. Les macrocycles de type  $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$  dans lesquels  $n \geq 4$  sont généralement référés comme éthers couronnes plutôt que sous leurs noms systématiques. Ceci est dû au fait que les structures moléculaires formées lorsque les hétérocycles sont liés à des cations ressemblent à une couronne posée sur une tête (figure 2.8) [138].

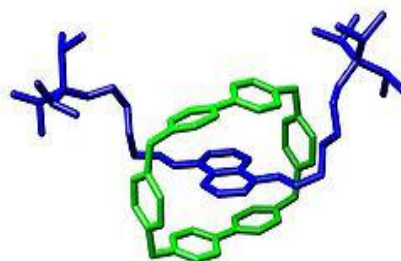


**Figure 2.8:** Deux structures correspondant à dibenzo 18-crown-6

### Rotaxane

Un rotaxane est une molécule constituée d'un macrocycle lié mécaniquement à un fragment moléculaire linéaire qui le traverse de part en part. Le nom est dérivé du latin rota signifiant

roue et du mot axe. Les deux constituants d'un rotaxane sont cinétiquement piégés par des "bouchons" aux extrémités de l'axe, plus gros que le diamètre interne du cycle. Ainsi les deux composants du rotaxane ne peuvent se dissocier sans rupture d'une liaison covalente, car cette dissociation nécessiterait de trop grandes distorsions des liaisons du cycle (figure 2.9).



**Figure 2.9:** Structure cristalline d'un rotaxane avec un cyclobis (paraquat-p-phénylène) macrocycle [139].

### Cyclodextrine

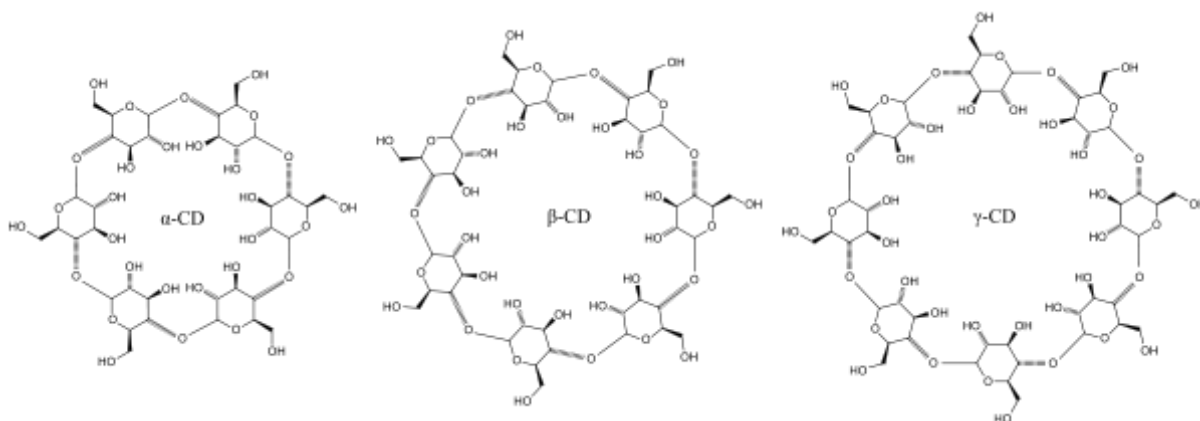
Une cyclodextrine ou cycloamylose est une molécule-cage d'origine naturelle qui permet d'encapsuler diverses molécules [140]. Les cyclodextrines ont aujourd'hui d'innombrables applications industrielles, et on les retrouve dans une multitude de produits courants. Elles sont aussi l'objet de très nombreuses recherches scientifiques.

**Tableau 2.3 :** Caractéristiques des cyclodextrines naturelles

	<b><math>\alpha</math>-cyclodextrine</b>	<b><math>\beta</math>-cyclodextrine</b>	<b><math>\gamma</math>-cyclodextrine</b>
<b>Numéro CAS</b>	10016-20-3	7585-39-9	17465-86-0
<b>Formule brute</b>	$C_{36}H_{60}O_{30}$ 972,845106 g·mol <sup>-1</sup>	$C_{42}H_{70}O_{35}$ 1 134,985957 g·mol <sup>-1</sup>	$C_{48}H_{80}O_{40}$ 1 297,126808 g·mol <sup>-1</sup>
<b>Taille de la cavité</b>	0,45 nm <sup>3</sup>	0,70 nm <sup>3</sup>	0,85 nm <sup>3</sup>

Les cyclodextrines sont une famille d'oligosaccharides cycliques composés de sous-unités glucopyranose liées en  $\alpha$ -(1,4). Ces produits naturels résultant de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*, ont été découverts en 1891 par Villiers. Trois familles sont principalement utilisées ou étudiées les  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -cyclodextrines (figure 2.10)

formées de 6, 7 ou 8 sous-unités (des familles de plusieurs dizaines de sous-unités ont été synthétisées dans des buts de recherche). Ces dernières années ont vu l'explosion du nombre de recherches concernant cette famille de composés chimiques. Les caractéristiques des cyclodextrines naturelles sont données dans le tableau 2.3.



**Figure 2.10** : Structure de l' $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  cyclodextrines.

De nombreux dérivés peuvent être obtenus à partir des cyclodextrines naturelles : les groupements hydroxyles des unités glucopyranose peuvent être aminés, estérifiés ou étherifiés. La synthèse de ces dérivés a souvent pour but d'améliorer la solubilité. Parmi les cyclodextrines les plus étudiées on trouve la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ CD, naturelle dite "native"), l'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (HPCD) [141] et la Randomly-methylated- $\beta$ -cyclodextrine (Rame $\beta$ -CD) [142]. Les molécules chimiquement modifiées ont des masses molaires moyennes correspondant à des indices molaires de substitution.

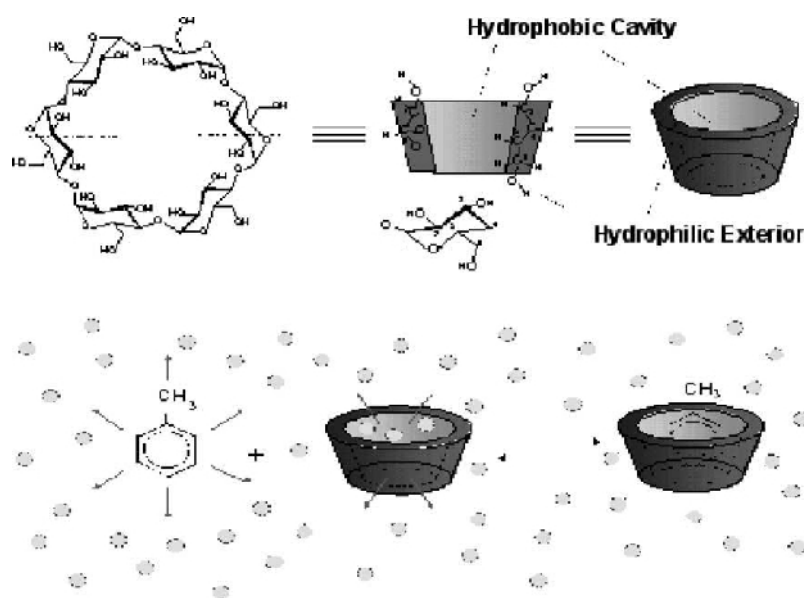
#### 2.4.4.4. Le mécanisme de formation des complexes d'inclusions

##### Mécanisme

La caractéristique la plus notable de cyclodextrines est leur capacité à former des complexes d'inclusion solides (complexes hôte-invité) avec une très large gamme de composés solides, liquides et gazeux par une complexation moléculaire [143]. Dans ces complexes (figure 2.11), une molécule hôte est maintenue dans la cavité de la cyclodextrine. La formation du complexe est un ajustement tridimensionnel entre la cavité d'accueil et la molécule hôte [144]. La lipophilie de la cavité des molécules de cyclodextrine fournit un microenvironnement dans



lequel des groupements non polaires de taille appropriée peuvent entrer pour former des complexes d'inclusion [145]. Pas de liaisons covalentes sont cassées ou formées au cours de la formation du complexe d'inclusion [146]. La principale force motrice de la formation du complexe est la libération de riches enthalpies des molécules d'eau à partir de la cavité.



**Figure 2.11** : Cyclodextrins structure and inclusion complexe formation.

Les molécules d'eau sont déplacées par un invité plus hydrophobe molécules présentes dans la solution pour atteindre une apolaire-apolaire association et une diminution de la tension de cycle cyclodextrine résultant dans un état plus stable d'énergie inférieure [147].

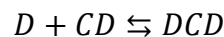
#### Les facteurs variant la capacité des cyclodextrines pour former un complexe d'inclusion

Le premier facteur est stérique et dépend de la taille relative de la cyclodextrine à la taille de la molécule hôte ou certains groupes fonctionnels clés au sein de l'invité. Si le client est de mauvaise taille, elle ne rentre pas correctement dans la cyclodextrine cavité. Le deuxième facteur est les interactions thermodynamiques entre les différents composants du système (cyclodextrine, invité, solvant). Pour un complexe en forme, il doit y avoir une force motrice énergétique nette favorable qui tire l'invité dans la cyclodextrine.

c. interactions favorables qui aident à déplacer l'équilibre à former le complexe d'inclusion

- Le déplacement des molécules d'eau polaires de la cavité de la cyclodextrine apolaire.
- L'augmentation du nombre de liaisons hydrogènes formées en tant que eau déplacée retourne à la grande piscine.
- Une réduction des interactions répulsives entre l'invité hydrophobe et l'environnement aqueux.
- Une augmentation des interactions hydrophobes que l'invité s'insère dans la cavité de la cyclodextrine apolaire.

La constante de stabilité ( $K_c$ ) est mieux exprimée en indiquant le ratio stœchiométrique du complexe. Il peut être écrit [148,149]:



$$K_c = \frac{[DCD]}{[D][CD]}$$

La constante de dissociation peut aussi être définie par:

$$K_d = \frac{[a - mx]^m [b - nx]^n}{[x]} = \frac{1}{K_c}$$

$$K_{1:1} = \frac{\text{slope}}{S_0(1 - \text{slope})}$$

L'enthalpie de formation du complexe d'inclusion est calculée par la relation suivante [150]:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln(K_{1:1})$$

2.4.4.5. Techniques de complexations

Co-précipitation

Cette méthode est la méthode la plus largement utilisée dans le laboratoire. La Cyclodextrine est dissoute dans l'eau. On ajoute l'invité, tout en agitant la solution de cyclodextrine. La concentration de cyclodextrine dans l'eau ne doit pas dépasser 20% environ. Le précipité peut

être recueilli par décantation, centrifugation ou filtration. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans les grandes quantités d'eau qui doivent être utilisées en raison de la faible solubilité de la cyclodextrine, le temps et l'énergie pour le chauffage et le refroidissement peuvent devenir très coûteux [151].

#### Complexations de lisier

Il n'est pas nécessaire de dissoudre la cyclodextrine complètement pour former un complexe. La cyclodextrine peut être ajoutée à l'eau avec des taux élevés 50-60% de matière sèche. La phase aqueuse sera saturée avec de la cyclodextrine en solution. Les molécules clientes se complexent avec la cyclodextrine en solution et quand le complexe de cyclodextrine sature la phase aqueuse, il se cristallise ou se précipite hors de la phase aqueuse. La cyclodextrine en cristaux se dissout et continue à saturer la phase aqueuse pour former le complexe qui peut être recueilli de la même manière qu'avec la coprécipitation [152].

#### Coller complexations, ou malaxage

Il s'agit d'une variante de la méthode de boue. Seule une petite quantité d'eau est ajoutée pour former une pâte, qui est mélangée avec la cyclodextrine en utilisant un mortier et un pilon, ou à l'aide d'un malaxeur. Le complexe résultant peut être séché directement ou lavé avec une petite quantité d'eau et récupéré par filtration ou centrifugation [153].

#### Mouiller le mélange et le chauffer

Cette méthode utilise peu ou pas l'eau. La quantité de l'eau peut varier en fonction de la quantité d'eau d'hydratation de la cyclodextrine. L'invité est ajouté à un maximum de 20 à 25% sur une base sèche. Cette quantité d'eau se trouve généralement dans un gâteau de filtration à partir des procédés de co-précipitation ou en suspension. L'invité et la cyclodextrine sont bien mélangés et placés dans un conteneur scellé. Le récipient scellé et son contenu sont chauffés à environ 100 °C puis le contenu est récupéré et séché. La quantité d'eau ajoutée, le degré de mélange et le temps de chauffage doivent être optimisés pour chaque client [154].

### Extrusion

L'extrusion est une variante de la méthode de chauffage et de mélange c'est un système continu. La cyclodextrine, l'invité et l'eau peuvent être pré mélangés. Le degré de mélange, la quantité de chauffage et le temps peuvent être contrôlés dans le fût de l'extrudeuse. En fonction de la quantité de l'eau, le complexe extrudé peut être séché comme il se refroidit ou il peut être placé dans une étuve pour sécher [155].

### Mélange à sec

Certains clients peuvent être complexés en ajoutant simplement l'invité a la cyclodextrine et de les mélanger ensemble. Cela fonctionne mieux avec des huiles ou des invités liquides. Le temps de mélange nécessaire est variable et dépend de l'invité. En règle générale, ce procédé est effectué à température ambiante [156].

#### 2.4.4.6. Le séchage des complexes

Les complexes peuvent être séchés dans un four, séchoir à lit fluidisé ou d'un autre séchoir. Des précautions doivent être prises pour que le complexe ne soit pas détruit au cours du processus de séchage [157].

### Produits hautement volatils

Pour les clients ayant des températures d'ébullition inférieures à 100 °C, une température inférieure doit être utilisée au cours du séchage.

### séchage par atomisation

Les complexes peuvent également être séchés par pulvérisation. Les précipitations doivent être contrôlées afin d'éviter que les particules deviennent trop grosses et bloque l'atomiseur ou une buse de pulvérisation.

### Faible température de séchage

Un dessiccateur ou lyophilisateur peut être utilisé à des complexes à sec. La basse température minimise la perte des clients volatils. La lyophilisation est particulièrement utile pour les clients labiles et les complexes solubles.

## 2.5. Le passage du macroscopique au microscopique et les techniques de réduction de taille

Lors de l'élaboration des nano/microsystèmes le passage par des techniques d'homogénéisation et de réduction de taille est obligatoire. Tous ces procédés sont basés sur l'application de forces extérieures sur les particules de grandes tailles a fin de réduire leur taille, ajuster leur géométrie et d'homogénéiser leurs propriétés structurales (diamètre moyen, indice de polydispersité et nature de la surface).

### 2.5.1. Les ultrasons

Les suspensions des Nano/microparticules en cours de formation peuvent être traitées par les ultrasons pour permettre de réduire la taille des particules, A cet effet deux types de systèmes peuvent être utilisés : les bains ou les sondes ultrasons. Selon les études préalablement réalisés, les sondes sont plus efficaces que les bains pour réduire la taille des nano/microparticules en suspensions [158].

### 2.5.2. La nano/microfluidisation

Cette technique permet d'obtenir des particules de tailles homogènes et surtout atteindre des taux d'encapsulations très importants. Les fluides (contenant la substance à encapsuler et les agents d'enrobage) sont séparés en deux canaux qui se rejoignent au bout d'une chambre d'interaction à des vitesses très importantes (utilisation de pompes) et sous de fortes pressions, le diamètre des particules obtenues correspond principalement à la taille des canaux utilisés et de la plateforme nano/microfluidique utilisée [159-162].

### 2.5.3. L'extrusion

Ces procédés très coûteux font appel à l'utilisation de filtres constitués de plusieurs membranes de diamètres de ports bien définis, les suspensions de nano/microparticules sont filtrés en plusieurs passages sur des membranes sous une pression d'azote [163].

### 2.5.4. Effet de la réduction de taille sur le rendement

Dans la plupart des procédés utilisés pour l'élaboration des nano/microparticules, l'utilisation des techniques de réduction de taille est automatiquement accompagnée par une diminution du

rendement. Cette diminution est tout simplement due à la faible capacité volumique des petites particules [164,165].

#### 2.5.5. Intérêt de la réduction de taille dans le domaine biologique

La taille des particules est extrêmement importante lors de la délivrance et/ou la véctorisation des molécules biologiquement actives. Une taille plus petite permet une plus grande interaction avec les organes et les tissus vivants, une plus grande pénétration cellulaire et donc un effet thérapeutique plus important [166-170].

## CHAPITRE 3

### LE DIABETE, TRAITEMENT MEDICALE ET ALTERNATIVES

#### 3.1. Introduction

Le diabète désigne abusivement le diabète sucré, un groupe de maladies métaboliques dans lesquelles le patient à un taux de sucre dans le sang élevé s'il ne gère pas correctement son traitement [171]. Ce chapitre sera consacré à la description de cette maladie et des molécules antidiabétiques existantes.

#### 3.2. Le diabète, la maladie du siècle

Le terme diabète peut désigner un groupe de maladies très hétérogènes qui n'ont comme symptôme commun que l'augmentation de la production d'urine accompagnée le plus souvent par une soif excessive [172].

Le diabète sucré est un dysfonctionnement du système de régulation de la glycémie, qui peut avoir des causes diverses (sécrétion d'insuline, réponse à l'insuline, cellules du pancréas, etc.) et présente plusieurs formes, qui ont toutes en commun des urines abondantes (polyurie). Le mot « diabète » vient du grec ancien dia-baïno, qui signifie « passer au travers » (traverser) [173].

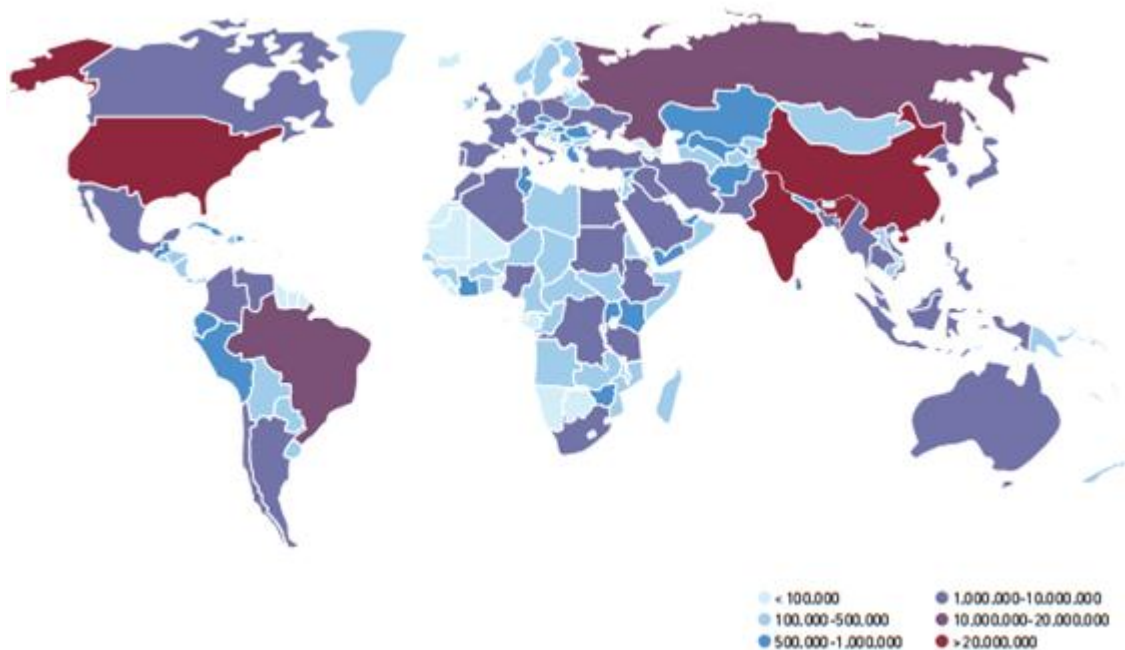


Figure 3.1 : Carte mondiale du diabète.

L'épidémie de diabète mondiale prend des proportions pandémiques (figure 3.1). On assiste actuellement à une explosion des coûts de contrôle et de traitement de la maladie et de ses complications, tandis que les pertes de productivité affectent l'économie mondiale. Les méthodes actuelles de surveillance n'aident pas les diabétiques à contrôler efficacement la maladie [174].

### 3.3. L'épidémie mondiale du diabète

En 2013 l'OMS a recensé [175]:

- 300 millions de malades dans le monde. Ce chiffre devrait doubler d'ici 2030.
- Coût mondial du diabète : 232 milliards de dollars.
- 5ème cause majeure de décès aux États-Unis et 4ème cause de décès dans le monde.

### 3.4. Physiopathologie du diabète

#### 3.4.1. Les types de diabète et symptomatologie

On regroupait autrefois sous le terme de diabète tous les états pathologiques aigus ou chroniques en rapport avec un trouble de la glucorégulation. Actuellement, on a renoncé à donner une définition du diabète et on décrit plutôt ses symptômes et ses complications:

En l'absence de traitement, le diabète sucré se reconnaît par l'élévation chronique de la concentration de glucose dans le sang. Celle-ci s'accompagne parfois des symptômes suivants: polyphagie, polydipsie, polyurie, perte de poids et troubles de la conscience aboutissant à un coma mortel [176].

Le plus souvent, les symptômes sont beaucoup moins sévères et il n'y a pas de troubles de la conscience. Pendant plusieurs années, la maladie s'installe et est asymptomatique.

Différents mécanismes peuvent induire l'état diabétique, l'hyperglycémie et les autres anomalies biochimiques résultent d'un déficit de production d'insuline ou d'une diminution de son action. La sévérité des symptômes dépend fortement du degré d'insuffisance d'activité de l'insuline [177].



### 3.4.2. Évolution du diabète et complications

- développer des lésions progressives des capillaires de la rétine, des reins (chez 40 % des diabétiques), des membres inférieurs.
- causer ou favoriser des lésions au niveau cérébral et des nerfs périphériques.
- aggraver les lésions d'athérosclérose au niveau du coeur, des jambes et du cerveau.
- induire la formation de dépôts amyloïdes pancréatiques.

### 3.4.3. Les points communs à toutes les formes cliniques du diabète sucré

- une hyperglycémie plus ou moins marquée, qui définit l'affection
- une atteinte primaire ou secondaire des cellules B pancréatiques
- une sécrétion d'insuline minimale ou nulle exigeant la prescription de cette hormone dans le cas d'un diabète de type 1 (diabète insulino-dépendant)
- une sécrétion d'insuline insuffisante, voire normale, transitoirement surabondante, mais surtout inefficace rendant l'insulinothérapie inutile (dans un premier temps) dans le cas d'un diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant.)

En 1985, l'OMS a établi une classification du diabète sucré et des catégories apparentées d'intolérance au glucose selon 5 types [178]:

Le diabète insulino-dépendant.

Le diabète non insulino-dépendant.

Le diabète gestationnel qui concerne 1 à 14 % des femmes enceintes.

Les diabètes "secondaires".

L'intolérance au glucose.

### 3.4.4. Le diabète de type I

Il s'agit d'une maladie auto-immune: l'organisme fabrique des anticorps dirigés contre ses propres cellules. Ici, il y a dégradation immunologique des cellules B du pancréas.

Il se caractérise, en plus d'une hyperglycémie, par une hypo-insulinémie due à une destruction de la plus grande partie des cellules B sécrétrices d'insuline. Cette auto-immunité est favorisée par les antigènes existant à la surface de certaines cellules lymphoïdes et par les antigènes présents sur la surface de toutes les cellules possédant un noyau. Ces antigènes constituent donc des substances de détection immunologique du diabète insulino-dépendant.

Il existe d'autres marqueurs immunologiques, notamment les anticorps anticellules d'îlots de Langerhans que l'on trouve chez 50 à 100 % des sujets ayant un diabète insulino-dépendant récent [179]. Ces anticorps sont de 3 types: cytoplasmiques, dirigés contre des antigènes de surface et cytotoxiques. Des études plus récentes ont permis de détecter des anticorps anti-récepteurs de l'insuline ainsi que des anticorps anti-insuline.

#### 3.4.5. Le diabète de type II

La pathogenèse du diabète non insulino-dépendant reste encore sujette à controverse et demeure mal comprise. Reprenant les travaux réalisés ces dernières années, certains chercheurs en sont venus à considérer le diabète NID comme étant essentiellement une maladie des cellules B pancréatiques. Pour d'autres c'est le phénomène d'insulinorésistance qui semble préexistant dans cette pathologie, ainsi que l'atteste l'étude de certains modèles animaux.

La pathologie diabétique de type 2 se caractérise principalement par une glycémie élevée alors que l'insulinémie est normale ou élevée. Cette hyperglycémie exerce un effet toxique sur [180]:

- les cellules B pancréatiques
- les hépatocytes dont la production glucosée est perturbée
- les tissus périphériques (consommation glucosée anormale)

Pour bien comprendre la gravité du diabète, il faut avoir présent à l'esprit que le glucose, très abondant dans l'organisme, n'est pas un produit neutre. Trop abondant, il va exercer des effets délétères:

- physiques, en accroissant la viscosité du sang, ce qui endommage les vaisseaux

- physiologiques, en modifiant les sécrétions pancréatiques (c'est là l'origine de la plupart des effets métaboliques de cette pathologie)
- chimiques, en formant des liaisons entre les acides aminés des protéines (l'hémoglobine, par exemple, subit une glycosylation): ces phénomènes sont impliqués dans les complications du diabète NID

A l'état normal, l'insulino-sécrétion se fait selon 2 phases après injection intraveineuse d'une surcharge glucosée:

- une première phase précoce dépendante de la quantité de glucose injectée
- une seconde phase tardive dépendante de la durée et de l'importance de l'élévation de la glycémie.

Chez les sujets présentant un diabète non insulino-dépendant, le 1° pic précoce de sécrétion d'insuline est réduit alors que le 2° pic, tardif, n'est diminué que lorsque la glycémie dépasse un certain seuil.

#### 3.4.6. Régulation de la glycémie

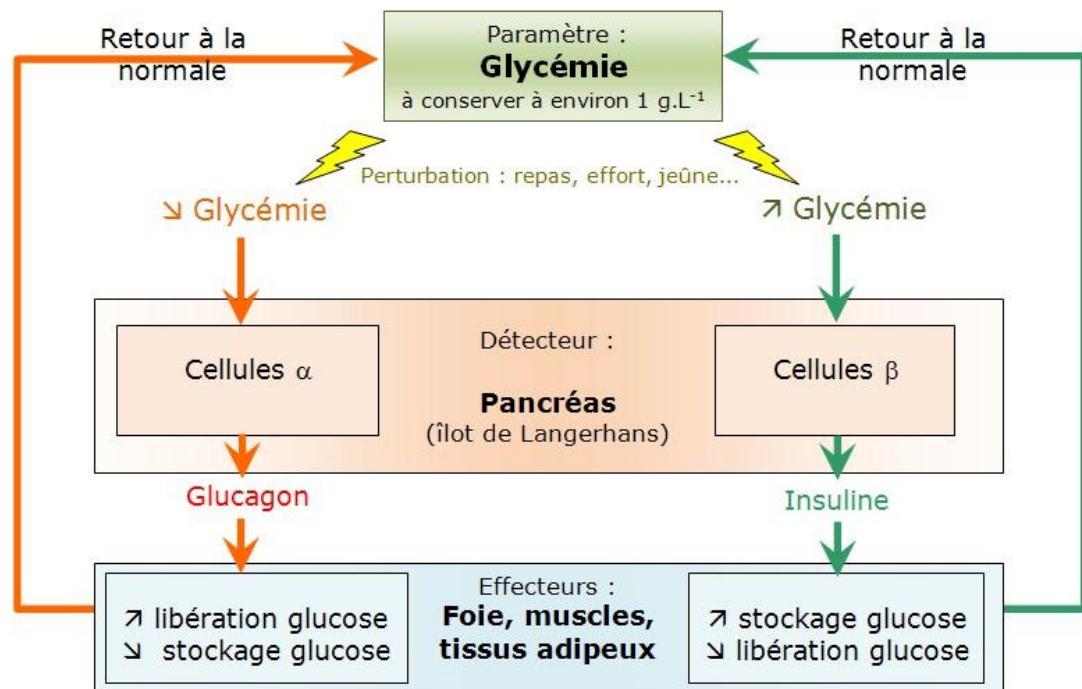
Bien que les apports de glucose soient très variables dans le temps, la glycémie reste toujours comprise, chez l'être humain sain à jeun, entre 4,5 et 6,5 mmol/l. Cette régulation est assurée par les sécrétions endocrines du pancréas qui pénètrent dans le flux sanguin par la veine mésentérique. La figure 3.2 illustre le mécanisme de régulation.

Les principales hormones d'origine pancréatique sont au nombre de trois:

- l'insuline: synthétisée par les cellules B, qui est une hormone hypoglycémiante.
- le glucagon: synthétisée par les cellules A, est une hormone hyperglycémiante. C'est un facteur antagoniste de l'insuline. Il agit en stimulant la glycogénolyse hépatique. On parle alors d'hormone du jeûne.
- la somatostatine: synthétisée par les cellules D, qui est aussi une hormone hyperglycémiante.

Ces hormones n'agissent pas seulement sur le métabolisme glucidique mais exercent également une profonde influence sur le métabolisme des lipides et des protides. Une

perturbation majeure de leur production ou de leur équilibre dynamique, telle que le DNID, va donc avoir des retentissements très généraux et concernent l'ensemble du métabolisme.



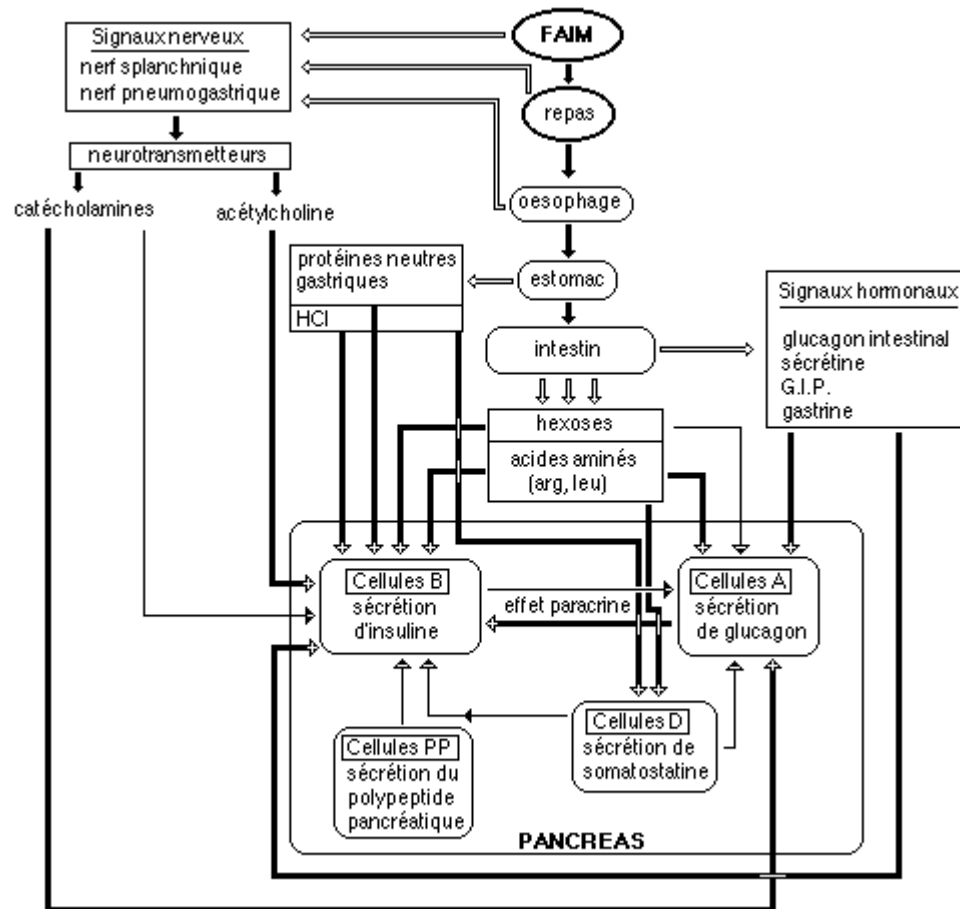
**Figure 3.2** : Régulation de la glycémie par les hormones pancréatiques.

La régulation de la glycémie commence déjà dès que de la nourriture est vue, caractérisant un réflexe conditionné. En effet, des influx nerveux d'origine cervicale mais également oesophagienne (associés à la déglutition) stimulent la libération de l'insuline par les cellules B grâce aux terminaisons issues du nerf pneumogastrique droit libérant de l'acétylcholine. Le pancréas est ainsi prévenu par avance de l'arrivée imminente de nourriture dans le duodénum (figure 3.3).

Au niveau stomacal, une molécule cosécrétée avec l'insuline, l'IAPP, ralentit le passage de la nourriture entre l'estomac et l'intestin. De ce fait, si l'organisme est nourri "en continu" avec pour conséquence une insulïnémie assez élevée, les aliments subissent une rétention gastrique qui empêche l'arrivée d'une trop grande quantité de glucose dans l'intestin.

Dès que le contenu stomacal pénètre dans le duodénum, celui-ci envoie de nombreux signaux hormonaux qui prennent leur origine dans les cellules endocrines de la paroi intestinale. Certaines hormones de l'intestin, comme la somatostatine, inhibent la sécrétion

stomacale, d'autres, telles que la sécrétine, l'entéroglucagon ou la gastrine, stimulent les sécrétions endocrines pancréatiques. Le GIP cumule ces deux effets.



**Figure 3.3 :** régulation de l'activité endocrine pancréatique.

Le glucose du chyle est activement absorbé en même temps que les ions sodium au niveau des microvillosités des entérocytes. Une perméase permet ensuite le rejet du glucose absorbé au pôle basal de ces cellules, accompagnée d'un rejet actif d'ion sodium et d'une entrée de potassium dans la cellule.

Ce sont les oses comme le glucose, mais aussi le fructose, le ribose, le galactose et le mannose qui stimulent fortement la sécrétion et la libération d'insuline par les cellules B (Le foie transformant in vivo fructose et galactose en glucose). Les acides aminés issus de la digestion des protéines stimulent eux aussi la production de cette hormone. Simultanément, l'insuline produite inhibe localement (effet paracrine) la production du glucagon. On retrouve donc dans la veine porte une forte concentration en glucose et en insuline.

Chronologiquement, le premier effet de l'insuline va être de favoriser au niveau hépatique la transformation du glucose sanguin en glycogène mis en réserve dans les hépatocytes. Après le foie, l'insuline va agir sur les cellules musculaires qui vont capter le glucose sanguin et le transformer, elles aussi, en glycogène. Les adipocytes, à leur tour, verront leur capture du glucose ainsi que sa transformation en triglycérides stimulée par l'insuline.

### 3.5. Traitement médicale et alternative du diabète

Le traitement de cette pathologie a pour objectif de ramener la glycémie à une valeur normale et de lutter contre la morbidité induite principalement par les atteintes cardiovasculaires consécutives au diabète. On cherche donc à rétablir une glycémie à jeun inférieure à 1,20 g/l et une hémoglobine glycosylée inférieure à 7 % (testés tous les 2 à 4 mois) [181].

Pour ce faire, on suit généralement après diagnostic le schéma suivant [182]:

- Pendant 3 mois, le malade modifie son comportement alimentaire en utilisant un régime à basse calorie comportant 40 à 50 % de glucides, 10 à 20 % de protides et des lipides insaturés comme l'huile d'olive. Il doit également pratiquer des exercices physiques réguliers. Ce simple comportement de "bon sens" peut permettre de régulariser son taux de glucose sanguin. C'est également la seule méthode "préventive" de lutte contre le DNID.
- Si la glycémie n'est pas revenue à des valeurs acceptables, on utilise des molécules à effet antidiabétique, souvent associées entre elles. Les associations moléculaires utilisées diffèrent selon la présence ou l'absence d'obésité. On se base sur l'utilisation d'une ou plusieurs molécules utilisées dans l'ordre suivant:
  - Avec obésité: acarbose + biguanides + sulfamides (cet ensemble est préférable à l'insuline).
  - Poids normal: acarbose + sulfamide (éventuellement acarbose + insuline au coucher)

L'usage de l'insuline est considéré comme une solution définitive et l'hormone n'est prescrite qu'en présence d'amaigrissement ou d'acétose.

- Si le traitement ne se révèle pas assez efficace, on est contraint d'utiliser de l'insuline malgré ses effets secondaires indésirables (essentiellement une forte prise de poids), que l'on essaie de diminuer avec un régime alimentaire strict.

### 3.5.1. Une pharmacopée variée et en constante expansion

Il existe de nombreuses substances qui ont un effet antidiabétique. Actuellement, on recherche de nouvelles molécules qui minimisent les effets secondaires ou présentent une plus grande facilité d'utilisation, ainsi que de nouvelles méthodes de lutte contre l'hyperglycémie. Avant de les examiner en détail, voici leurs effets principaux dans le tableau 3.1. Un tableau récapitulatif de tous les traitements existants est donné dans l'appendice 1.

**Tableau 3.1** : Effets des principaux médicaments antidiabétiques.

<b>Molécules</b>	<b>principaux effets</b>
acarbose	ralentit l'absorption des glucides dans le tube digestif
metformine	inhibe la surproduction hépatique de glucose
sulfonylurées	stimule l'insulinosécrétion
troglitazone	réduit l'insulinorésistance des muscles squelettiques.

### 3.5.2. Les traitements actuels

#### 3.5.2.1. L'acarbose

Cette molécule agit en amont des autres; elle diminue et ralentit l'absorption intestinale des nutriments, principalement les hydrates de carbone, ce qui étale dans le temps l'arrivée de ceux-ci dans le sang et régularise "mécaniquement" la glycémie qui, variant moins, peut être plus efficacement contrôlée [183]. Une autre molécule actuellement à l'étude, le bézafibrate, possède un mode d'action similaire et améliore la glycémie et la lipidémie des sujets diabétiques. C'est un inhibiteur de la glucosidase

#### 3.5.2.2. Les biguanides

Leur effet hypoglycémiant est connu depuis longtemps, mais ils ne sont utilisés dans le traitement du diabète que depuis les années 1960 [184]. Parmi les 300 biguanides connus, seuls deux sont actuellement utilisés dans la thérapeutique humaine:

- la metformine (N1,N2 di-méthyl-biguanide) principalement utilisée, indiquée notamment chez les obèses en raison de son faible risque d'induire une acidose lactique.
- la buformine (butyl-biguanide)

L'origine de l'effet hypoglycémiant des biguanides n'est pas entièrement connu. On a pu mettre en évidence, pour la metformine, les effets suivants:

- augmentation du nombre des récepteurs à l'insuline et de l'affinité insuline-récepteur
- augmentation de l'utilisation du glucose par les cellules musculaires, adipeuses et hépatiques par réduction du métabolisme oxydatif du glucose et intensification de la glycolyse
- inhibition du transport du glucose au niveau des entérocytes par action sur les mitochondries de ces cellules.
- diminution de l'absorption intestinale des acides aminés
- réduction de la néoglucogénèse hépatique à partir du lactate, du pyruvate et des acides aminés, favorisant la glycogénolyse
- augmentation in vitro de l'insulinosécrétion en réponse au glucose
- absence d'effet sur le niveau d'insuline circulante.

Les biguanides exercent également leurs effets sur le métabolisme lipidique. Ainsi, la metformine réduit l'augmentation de la lipémie consécutive à un régime riche en cholestérol.

Cet effet peut être causé par une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol et, dans une moindre mesure, des triglycérides. La metformine agit également au niveau de la synthèse des lipides au niveau hépatique, intestinal et aortique. Elle diminue la synthèse des triglycérides et des phospholipides au niveau hépatique, ce qui supprime les surcharges lipidiques induites par un régime enrichi en lipides.

### 3.5.2.3. Les sulfonylurée (sulfamides)

Cette famille réunit des molécules qui possèdent la même structure de base (sulfonylurée dont les deux radicaux hydrophobes sont variables) [185]. Les plus utilisées sont: le gliclazide (Diamicron ®), le glibenclamide (Daonil ®), le tolbutamide (Dolipol ®), le glipizide, le carbutamide et le chlorpropamide.

Elles exercent leurs effets au niveau pancréatique, hépatique et musculaire et influent également sur le métabolisme lipidique.



Au niveau pancréatique, elles se fixent sur un récepteur spécifique, ce qui inhibe le fonctionnement de canaux potassiques. Ceci provoque une dépolarisation membranaire qui produit un afflux de calcium dans le cytoplasme et déclenche l'insulinosécrétion. Les sulfamides stimulent donc la libération de l'insuline déjà synthétisée. La sensibilité des cellules B au glucose est également augmentée par ces molécules. Ainsi, le gliclazide augmente la sécrétion insulinique consécutive à un stimulus glucosé.

Au niveau hépatique, après 3 à 6 mois d'utilisation, les sulfamides exercent les actions suivantes:

- inhibition de la néoglucogénèse et de la glycogénolyse induite par le glucagon.
- augmentation de la synthèse du glycogène
- augmentation de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production de glucose

Au niveau musculaire, les sulfamides augmentent l'effet stimulant de l'insuline sur la glycogène synthase.

#### 3.5.2.4. Substances anti-obésité

Le benfluorex ®, un hypolipémiant, présente aussi des effets antidiabétiques.

La fenfluramine est une substance anti-obésité, mais son administration chronique chez des souris obèses hyperinsuliniques provoque une diminution de la glycémie et du niveau basal de l'insuline. A faible dose, elle améliore la tolérance au glucose et provoque une diminution de la glycémie et de l'insulinémie.

Des substances comme l'orlistat ® ou l'Orliatort ® qui sont des inhibiteurs de la lipase au niveau gastro-intestinal peuvent également améliorer le contrôle de la glycémie chez le diabétique. La sibutramine, inhibant la réassimilation de la noradrénaline, améliore également le contrôle de la glycémie chez le diabétique. Ces molécules peuvent être utilisées en association avec d'autres composés possédant une activité antidiabétique plus spécifique.

#### 3.5.2.5. Le vanadium et les peroxovanadates

Cet oligo-élément et certains de ses dérivés présentent des propriétés antidiabétiques dont les causes sont mal connues [186]. Ce sont des inhibiteurs non spécifiques des

phosphatases. *In vitro*, ils stimulent le transport du glucose ainsi que l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline. Pour cela, ils s'opposent à la phosphorylation de la sérine et de la thréonine kinase au niveau du récepteur lui-même et de ses substrats IRS. Les essais réalisés *in vivo* tendent à montrer que l'utilisation de ces molécules est contrebalancée par leurs effets toxiques éventuels.

#### 3.5.2.6. Les inhibiteurs de l'aglycosidase

Ils agissent sur les entérocytes de l'intestin grêle en ralentissant la digestion et l'absorption des glucides [187]. Ainsi, le miglitol ® provoque une diminution de la glycémie postprandiale chez les patients atteints de DNID.

- Les inhibiteurs de l'oxydation des acides gras (méthylpalmoxyrate par exemple) augmentent l'utilisation périphérique du glucose et possèdent donc des effets hypoglycémiant indépendants de l'action insulinique.
- Les dérivés de la phényl-alanine diminuent la glycémie post-prandiale chez le rat. Ils augmentent la sécrétion insulinique en réponse au glucose mais agissent aussi par des mécanismes extra-pancréatiques.

#### 3.5.2.7. Les thiazolidine-diones

Il s'agit d'une classe de molécules qui ont pour effet de normaliser les niveaux plasmatiques de glucose [188]. Elles ont été testées sur plusieurs modèles d'animaux atteints de diabète NID. Leur action porte sur l'insulinorésistance, bien que les mécanismes moléculaires mis en jeu restent à ce jour peu connus. Elles agissent selon deux voies [189]:

- en augmentant l'affinité des tissus périphériques pour l'insuline. Elles stimulent en effet la transcription de gènes insulinosensibles qui provoquent la synthèse de transporteurs du glucose ou bien d'enzymes qui activent la lipogenèse au niveau adipocytaire. Pour cela, elles activent le PPAR $\gamma$ , impliqué dans le métabolisme des lipides, qui agit au niveau nucléaire en synergie avec le récepteur rétinol X.
- en protégeant les cellules B des dommages induits par une accumulation de triglycérides intracellulaires (lipotoxicité).

Certains de ces produits sont encore à l'échelle expérimentale. Les tests cliniques ayant cependant débuté pour de nombreux composés [190].

### 3.6. Conclusion

Au terme de cette revue bibliographique de la thérapeutique disponible ou à l'étude, il est important de souligner que l'état général des malades peut être fortement amélioré en instaurant une meilleure hygiène de vie. Au delà de leurs vertus curatives certaines, l'amélioration et l'adaptation du régime alimentaire ainsi que l'exercice physique régulier constituent à ce jour la seule voie permettant probablement d'éviter l'installation de l'état diabétique. De plus, le traitement efficace et précoce du diabète permettrait une forte réduction des maladies connexes constituant ses complications, ce qui reviendrait à traiter en une fois par l'amont des pathologies aussi variées que l'insuffisance rénale, la cécité ou l'athérosclérose; toutes maladies dont la morbidité reste, à ce jour, élevée.

Trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques et formulations pharmaceutiques pour la maladie du siècle bouleversera le marché économique des antidiabétiques et prolongera des millions de vies humaines.

## CHAPITRE 4

*SALVIA OFFICINALIS*, BOTANIQUE, PHYTOCHIMIE ET BIOACTIVITE4.1. Description botanique de *Salvia officinalis*

La sauge officinale est un sous arbruste aromatique persistant, très ramifié touffu atteignant 70 à 80 cm de hauteur, dans son habitat naturel, de port étalé à dressé, devenant ligneux à la base.

Les fleurs sont odorantes, mellifères, regroupées par 4 à 12 en une inflorescence située à l'extrémité des rameaux et constituent une cyme unipare, elles sont zygomorphes, faiblement pédicellées (figure 4.1), et les feuilles sont gris-verdâtres feutrées de 3 à 8 cm de long et 3 à 4 cm de large (figure 4.2) [191].



**Figure 4.1** : Aspect morphologique de *Salvia officinalis* (au stade de flauréson).



**Figure 4.2** : Les feuilles *Salvia officinalis*.

Le classement systématique de la sauge est donné dans le tableau 4.1 [192]:

**Tableau 4.1** : Le classement systématique de la sauge.

Règne	plante
Embranchement	spermaphytes
Sous embranchement	angiospermes
Classe	dicotylédones
Ordre	lamiales
Famille	labiacées
Genre	salvia
Espèce	<i>Salvia officinalis</i> L

#### 4.2. La Place de la sauge en phytothérapie

La sauge est l'une des plantes les plus utilisées, vu ses propriétés importantes ; elle est considérée comme un stimulant pour les gens anémiques, aussi pour les personnes stressées et déprimées, et conseillée pour les étudiants en période d'examen.

Pour usage externe, elle est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies.

Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux. Cette herbe aromatique est employée dans la cuisine, pour son goût puissant, légèrement amer et camphré [193].

La Sauge est également une source naturelle de flavonoïdes et de composés polyphénoliques (par exemple, l'acide carnosique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique) possédant un fort antioxydant, antiradicalaire et une activité antibactérienne.

La majorité des acides phénoliques dans *Salvia* sont des dérivés de l'acide caféique, qui est le bloc de construction d'une variété de métabolites végétaux.

L'acide caféique joue un rôle central dans la biochimie des plantes, et se produit principalement sous une forme dimère comme l'acide rosmarinique. carnosique et l'acide

rosmarinique, qui sont présents à des concentrations élevées dans l'extrait de plantes de sauge, ont montré de fortes propriétés antioxydantes [193,194].

L'acide ursolique, également une composante de la sauge, possède des propriétés anti-inflammatoires puissants, et dans la préparation de sauge, il est considéré comme une mesure de contrôle de qualité pour les effets anti-inflammatoires des solutions différentes [195,196].

La plante contient de l'huile essentielle (les cétones monoterpéniques sont considérées des constituants principales), des tanins catéchiques, des acides polyphénolcarboxyliques (rosmarinique, caféique, chlorogénique, p-coumarique, férulique), des principes amers diterpéniques, des triterpènes pentacycliques (acides ursolique, cartegolique, oléanolique etc...), des phytostérols, ds flavones [197].

#### 4.3. Composition chimique de *Salvia officinalis*

L'étude phytochimique de *Salvia officinalis* a suscité l'intérêt des chercheurs depuis les années quatre-vingts, les extrais volatils et non-volatils des différentes parties de la plantes ont été étudiés en ayant recours aux dosages physico-chimiques simples, la chromatographie, la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse ainsi que l'isolation et la résolution structurale de quelques composés d'intérêt thérapeutique très important.

##### 4.3.1. Composés volatils (composition chimique de l'huile essentielle)

Les analyses qualitatives et quantitatives des huiles essentielles sont réalisées par deux méthodes, soit par chromatographie en phase gazeuse (CPG) en utilisant des standards ou encore par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) en utilisant une série d'alcane.

**Branches :** Les composés majoritaires de l'huile essentielle des branches de *Salvia officinalis* sont le myrcene , germacrene D et E-caryophyllene [198].

**Feuilles:** C'est la partie de la plante la plus étudiée, les deux composés majoritaires sont l'a-pinene et le P-myrcene [198,199]de plus de ces deux composés certaines études ont montré un troisième composé majoritaire comme le 1.8-Cineole [200,201], le limonene [202,203] ou encore p-Cymene et terpinen-4-ol [204]. D'autres études ont montré

différentes compositions,  $\alpha$ -Pinene,  $\gamma$ -terpinene et terpinen-4-ol [205]; caryophyllene, germacrene D et  $\beta$ -cadinene [206];  $\alpha$ -Pinene, limonene, Terpinen-4-ol, Terpeneol, (Z)-3-Hex-1-enyl benzoate et  $\beta$ -Caryophyllene [207]; Myrcene, limonene, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -phellandrene, sabinene, p-cymene et  $\gamma$ -terpinene [208,209];  $\alpha$ -Pinene, p-Cymene, Limonene, Terpinen-4-ol and  $\alpha$ -Terpeneol [210]; myrcene, germacrene D, E-caryophyllene,  $\alpha$ -cadinol and 5-cadinene [211].

#### 4.3.2. Les composés non-volatiles

Différents types d'extraits ont été étudiés, l'extrait aqueux a montré la présence de composés polaires qui sont les stéroïds-triterpènes, catechin-tannins, flavonoids, sugars, resins and saponins [212], l'extrait hexanique a montré la présence de composés apolaires comme l'  $\alpha$ -tocopherol [213], mais l'extrait le plus étudié dans la bibliographie est l'extrait éthanolique. Les dosages physicochimiques de l'extrait éthanolique ont montré la présence de toutes les familles d'antioxydants, alcaloids, anthocyanins, leuco-anthocyanins, saponosides, coumarins, flavonoids, tannins et terpenoids [214,215], flavonols et phenolic acids [216], plusieurs Phenols (gallic acid, catechin, syringic acid, ellagic acid, quercetin-3-O-rhamnoside, and luteolin), flavonoides (galloyl quinic acid, quercetin and kaempferol glucosides) et anthocyanins ( delphinidin 3-O-glucoside et cyanidin 3-O-glucoside) ont été identifiés et quantifiés par chromatographie en phase liquide [217-231]; de plus, certaines études assez rares ont montré l'isolation et la résolution structurale de certaines molécules composant l'extrait de feuilles de *Salvia officinalis* (tableau 4.2).

**Tableau 4.2** : Phytochimie des composés non-volatils de *Salvia officinalis*.

Famille phytochimique	Composé	Référence bibliographique
<b>Diterpenoides</b>	12-methoxycarnosic acid	[217]
	methyl carnosate	[217]
	safficinolide	[218]
	sageone	[217,218]
	carnosol	[217]
	12-O-methylcarnosol	[219]
	rosmanol	[217,219]
	6,7-dimethoxy-7-epi-rosmanol	[220]
	sagequinone methide A	[220]
	12-methoxy-8,11,13-abietatrien-20,11-olide	[221]
manool	[221]	
<b>Sesterterpenes</b>	rel-(5S,6S,7S,10R,12S,13R)-7-hydroxy-11,16-	[222]

	dioxoapiana-8,14-dien-22,6-olide	
	rel-(5S,6S,7R,10R,12S,13R)-7-hydroxy-11,16-dioxoapiana-8,14-dien-22,6-olide	[222]
	rel-(5S,6S,7S,10R,12R,13S)-7-hydroxy-11,16-dioxoapiana-8,14-dien-22,6-olide	[222]
<b>Triterpenoides</b>	oleanolic acid	[223]
<b>Polyphénols et autres</b>	eugenylglucoside	[224]
	trans-p-coumaric acid 4-O-(2'-O-β-D-apiofuranosyl)-β-D-glucopyranoside	[225]
	cis-p-coumaric acid 4-O-(2'-O-β-D-apiofuranosyl)-β-D-glucopyranoside	[225]
	4-hydroxyacetophenone 4-O-(6'-O-β-D-apiofuranosyl)-β-D-glucopyranoside	[225]
	6-O-caffeoyl-β-D-fructofuranosyl-(2→1)-α-D-glucopyranoside	[226]
	1-O-caffeoyl-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside	[226]
	1-O-p-hydroxybenzoyl-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside	[226]
	-O-(2,3,4-trihydroxy-3-methyl)butyl-6-O-feruloyl-β-D-glucopyranoside	[226]
	melitric acid A	[227]
	methyl melitrate A	[227]
	7,8-dihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,2-dihydronaphthalene-1,3-dicarboxylic acid di(1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl))ethyl ester (= salvianolic acid L)	[228]
	sagerinic acid	[22]
	6,8-di-C-glucosylapigenin (= vicanin-2)	[225,230]
	luteolin 7-O-β-D-glucoside	[225,230]
	luteolin 7-O-glucuronide	[225,230]
	luteolin 3'-O-glucuronide	[225,230]
	6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside	[225,230]
	6-hydroxyluteolin 7-O-glucuronide	[225]
	(6R,9R)-3-oxo-α-ionol β-D-glucopyranoside	[224]
	(6R,9S)-3-oxo-α-ionol β-D-glucopyranoside	[224]
	sagecoumarin	[224]
	(1S,2R,4R)-1,8-epoxy-p-menthan-2-yl-O-β-D-glucopyranoside	[224]
ethyl O-β-D-glucopyranosyl tuberonate	[231]	

#### 4.4. Pharmacologie de *Salvia officinalis*

Les activités pharmacologiques de *Salvia officinalis* sont données dans le tableau 4.3.



**Tableau 4.3** : Les activités pharmacologiques de *Salvia officinalis*.

Type d'extrait	Activité biologique	Références bibliographiques
<b>Huile essentielle</b>	Activité antimicrobienne	[232-239]
	Activité antioxydante	[240-242]
	Activité antifongique	[243-246]
	Activité anti- <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935	[247]
	rôle protecteur contre la toxicité induite par le méthomyl chez les rats femelles gravides.	[248]
	Activité hépatoprotectrice.	[249-252]
	Activité cicatrisante.	[253-257]
	Activité antiproliférative des cellules BHK21	[256]
	Effet sur le cortex cérébral.	[257-262]
Activité anti-inflammatoire.	[263,264]	
<b>extrait non-volatile</b>	Activité antimicrobienne	[265-282]
	Activité hépatoprotectrice	[283-286]
	Activité anti-hyper tension artérielle	[287-291]
	Activité inhibitrice de la lipase	[292-296]
	Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase	[297-204]
	Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase	[305-307]
	Activité inhibitrice de l' acetylcholinesterase	[308]
	Activité antioxydante	[309-327]
	Activité antifongique	[328-333]
Activité antidiabétique	[334-340]	

**L' Huile essentielle :** Les composés volatile de *Salvia officinalis* ont montré plusieurs activités biologiques qui ont été mises en évidence in-vitro ou in-vivo ; Parmi ces activités, l'activité antimicrobienne [232-239], antioxydante [240-242], antifongique [243-246], anti-*Listeria monocytogenes* CECT 935 [247], anti-inflammatoire [263,264], antiproliférative des cellules BHK21 [256], cicatrisante [253-257], hépatoprotectrice [249-252] mais aussi un rôle protecteur contre la toxicité induite par le méthomyl chez les rats femelles gravides [248] et un effet sur le cortex cérébral [257-262].

**Les différents extraits des feuilles :** L'extrait aqueux des feuilles a montré une activité antimicrobienne, hépatoprotectrice, anti-hyper tension artérielle, inhibitrice des lipase,  $\alpha$ -amylase, et  $\alpha$ -glucosidase et une activité inhibitrice de l' acetylcholinesterase.

L'extrait polaire méthanolique a montré une activité antioxydante et l'extrait apolaire de l'éther de pétrole a montré une bonne activité antimicrobienne.

L'extrait ethanologique lui aussi largement étudié a présenté une activité antimicrobienne, antifongique, antioxidante, cytoprotectrice, anticancéreuse et anti-inflammatoire, activité antidiabétique et hépatoprotectrice.

Les études pharmacologiques sur certains polyphénols isolés ont montré des activités antioxydante, antimutagénique et antigenotoxique.

## CHAPITRE 5

### CHOIX DE LA PLANTE

#### 5.1. Introduction

Dans notre étude, le choix de la plante est une étape décisive pour la suite de nos travaux de recherches car toutes les formulations ainsi que toutes les stratégies étudiés seront réalisés dans le but de préserver et d'améliorer l'efficacité thérapeutique des molécules bioactives de la plante sélectionnée.

Le choix d'une plante modèle a été réalisé en deux étapes ; La première est la réalisation d'une enquête ethnopharmacologique et la deuxième est l'évaluation de l'activité biologique in-vitro pour toutes les plantes sélectionnées à l'issue de la première étape, pour choisir la meilleure d'entre elles.

L'enquête ethnopharmacologique sur le traitement du diabète a été réalisée sur 647 patients diabétiques habitant la région de la Mitidja et ces environs. Le choix du diabète comme pathologie cible lors de cette étude est due à l'intérêt socioéconomique que cette maladie représente.

L'activité antidiabétique a été réalisée in-vitro par l'évaluation de l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase pancréatique, l'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase intestinale et l'effet sur la diffusion du glucose.

#### 5.2. Matériels et méthodes

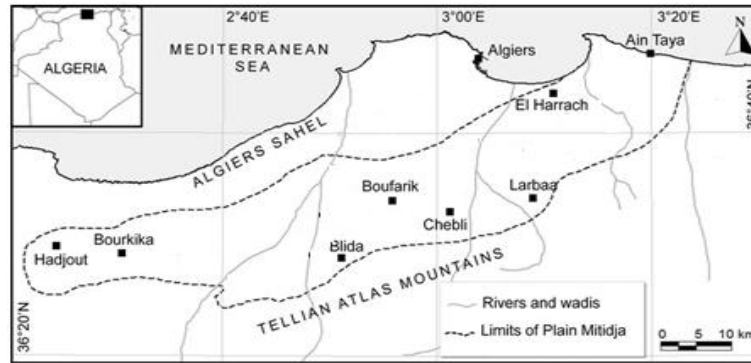
##### 5.2.1. Enquête ethnopharmacologique sur le traitement du diabète dans la région de la Mitidja et ses environs

###### 5.2.1.1. Méthodologie

Une étude ethnobotanique a été menée d'octobre 2014 à février 2015, à l'aide d'un questionnaire, un exemplaire du questionnaire utilisé est donné dans l'appendice 2. L'information ethnobotanique a été obtenue auprès de 607 patients atteints de diabète sucré de type 1 ou de type 2. Les entrevues ont été effectuées aux hôpitaux, pharmacies et les associations d'aide aux diabétiques. Tous les patients interrogés ont été informés de l'objectif de l'étude.

### 5.2.1.2. Description de la zone d'étude

La zone d'étude est indiquée dans la figure 5.1, qui représente la carte de l'Algérie sur la quel la zone d'étude est situé (carré noir) ainsi qu'un agrandissement de cette zone.



**Figure 5.1** : Cartographie de la plaine de la Mitidja et ses environs (Alger, Blida, Tipaza, Médéa et Boumerdès).

La province ciblée par notre étude est la plaine de la Mitidja (d'une superficie d'environ 1400 km<sup>2</sup>) et ses environs. D'ouest en est, la plaine traverse successivement les wilayas de Tipaza (Latitude : 36°35'22" Nord, Longitude : 2°26'50" Est), de Blida (Latitude : 36°28'12" Nord, Longitude : 2°49'39" Est), d'Alger (Latitude : 36°45'08" Nord, Longitude : 3°02'31" Est), de Boumerdès (Latitude : 36° 46' 00" nord, Longitude : 3° 28' 00" est) et l'extrême nord-est de Médéa (Latitude : 36° 16' 03" nord, Longitude : 2° 45' 00" est).

Orientée parallèlement au relief côtier dans une direction est-nord-est vers ouest-sud-ouest, la plaine de la Mitidja est limitée à l'est par l'oued Boudouaou, à l'ouest par l'oued Nador tandis que ses deux principaux flancs sont bordés par deux reliefs élevés : les collines du Sahel Algérois au nord et l'Atlas Blidéen au sud [341]. Elle s'allonge d'est en ouest sur une centaine de kilomètres et s'étire sur une profondeur variant de 5 à 20 km. D'altitude moyenne de 50 m, elle présente une faible pente orientée vers la mer. Elle est divisée en deux unités physiques : la basse Mitidja ou Mitidja Est et la haute Mitidja ou Mitidja ouest. Ses sols fertiles bénéficient d'un climat tempéré de type méditerranéen et d'une pluviométrie suffisante [342].

### 5.2.1.3. Entretiens

Le questionnaire de l'enquête comporte les paramètres suivants:

1. Informant: Prénom des patients, âge, sexe, poids;

2. Information pour le diabète: type de diabète, traitements (nom du médicament utilisé), complications;
3. Information pour les plantes antidiabétiques: parties utilisés et méthodes de préparation des traitements;
4. Estimation des résultats de leur phytothérapie: Bon, moyen ou variable, par rapport à la clinique.

Le questionnaire a été adressé uniquement aux patients diabétiques qui connaissent et utilisent les plantes pour le traitement de leur maladie.

Une liste des noms communs utilisés pour désigner les plantes médicinales a été établie et des spécimens de plantes impliqués ont été recueillis.

L'identification taxonomique des plantes et la détermination définitive de leurs noms botaniques ont été menées à l'université des Sciences et Technologie Houari Boumediene, Alger, Algérie et par la bibliographie [343-346].

#### 5.2.1.4. L'analyse des données et calcul de la valeur d'utilisation des espèces végétales

Pour l'analyse des données, la valeur d'utilisation des espèces (UV) [347], une méthode quantitative qui démontre l'importance relative des espèces connues localement, a été calculée en utilisant la formule suivante (équation 5.1):

$$UV = \frac{U}{N} \quad (5.1)$$

Où U est le nombre de citations par espèce et N le nombre d'informateurs.

#### 5.2.2. Extraction et caractérisation des molécules bioactives à partir de plantes sélectionnées

##### 5.2.2.1. Récolte des plantes

Les échantillons de toutes les plantes étudiés nous ont été donnés par les patients lors de la réalisation de l'enquête ethnobotanique.

##### 5.2.2.2. Extraction des molécules bioactives

L'extraction des molécules bioactives à partir des plantes étudiées a été réalisée par deux méthodes différentes la première est l'infusion en utilisant l'eau comme solvant

d'extraction (extrait aqueux), la deuxième est la macération en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction (extrait éthanolique).

#### Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux a été préparé en mélangeant la plante broyée et l'eau distillée avec un rapport de 1:10. Le mélange est maintenu sous agitation à 60°C dans un montage à reflux. Après 30 min, le système est refroidi et l'extrait est récupéré après filtration de la plante broyée et lyophilisation à -70°C durant 48h [348].

#### Préparation de l'extrait éthanolique

L'extrait éthanolique a été préparé en mélangeant la plante broyée et l'éthanol avec un rapport de 1:10, après 24h de macération à température ambiante, la plante est filtrée ensuite le solvant est évaporé sous vide à 60°C en utilisant un rotavapeur pour récupérer l'extrait [349].

#### 5.2.2.3. Composition chimique des extraits

Les principales familles de métabolites secondaires contenus dans les extraits ont été identifiées par un screening phytochimique, ensuite le dosage des polyphénols totaux a été réalisé en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

#### Screening phytochimique

Identification des phénols : 0,5 g d'extrait a été traité avec 3-4 gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 10%. La formation de la couleur noire bleutée permet d'identification des phénols [350].

Identification des flavonoïdes : L'extrait (0,5 g) a été traité avec quelques gouttes d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10%. La formation de la couleur jaune intense, qui devient incolore par addition d'acide dilué, met en évidence la présence de flavonoïdes [351].

Identification des tanins : Une solution de gélatine à 1% contenant 10% de chlorure de sodium a été ajoutée à 0,5g d'extrait. La formation de précipité blanc a confirmé la présence de tanins [352].

Identification des alcaloïdes (par la méthode du réactif de Wagner) : L'extrait a été dissous dans de l'acide chlorhydrique dilué ensuite filtré. Le filtrat obtenu a été soumis au traitement par le réactif de Wagner (2 g d'iode et 6 g d'iodure de potassium dans 100 ml d'eau) et la présence d'alcaloïdes est confirmée par formation d'un précipité marron/rougeâtre [353].

Identification des saponines : L'extrait en poudre (2,0 g) a été porté à ébullition dans 20 ml d'eau distillée pendant 5 minutes ensuite filtré. Le filtrat (10 ml) a été mélangé avec 5 ml d'eau distillée dans un tube gradué et agité vigoureusement et laissé 15 minutes pour un moussage persistant. La mousse a ensuite été mélangée avec 3-4 gouttes d'huile d'olive et secouée à nouveau pour l'observation de la couche d'émulsion qui signifie la présence de saponines [354].

Identification des anthraquinones : Le chloroforme (2 ml) a été ajouté à 0,2 g de l'extrait et le mélange résultant a été agité vigoureusement pendant 5 minutes avant la filtration. Des volumes égaux du filtrat obtenu et une solution d'ammoniaque à 10% ont été soigneusement mélangés et la formation d'une coloration rose vif dans la couche aqueuse du mélange confirme la présence d'anthraquinones [355].

Identification des glycosides : L'extrait a été hydrolysé avec de l'acide chlorhydrique aqueux à 10%, puis traité avec du nitroprussiate de sodium à 2% dans de la pyridine et de l'hydroxyde de sodium à 20%. La formation de couleur rose à rouge sang indiquera un test positif pour les glycosides cardiaques [356].

Identification des triterpènes : L'extrait a été traité avec du chloroforme ensuite filtré. Le filtrat a été traité avec quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, agité et laissé au repos. L'apparence de la couleur jaune doré nous confirme la présence des triterpènes [357].

Identification des phytostérols : Une partie de l'extrait a été traitée avec du chloroforme ensuite filtrée. Le filtrat résultant a été soumis au traitement à l'anhydride acétique (quelques gouttes), porté à ébullition ensuite refroidi. Après addition d'acide sulfurique concentré, la formation d'un anneau brun à la jonction de la couche indique la présence de phytostérols [358].

### Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits obtenus est réalisé par la méthode de folin-ciocalteu [359,360] en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible de type SHIMADZU®. Des solutions de 20 mg d'extraits dans 6 ml de méthanol ont été préparées, 0.5 ml de chaque solution est prélevé et mélangé à 2.5 ml de solution de carbonate de sodium à 20 % w/v et 2.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 % v/v. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance des solutions a été déterminée à une longueur d'onde de 765 nm. La quantification est réalisée moyennant une courbe d'étalonnage préalablement établie dans les mêmes conditions avec des solutions d'acide gallique (utilisés comme polyphénol de référence) de différentes concentrations, qui varient de 0 à 50 µg/ml). Les résultats sont exprimés en équivalent mg d'acide gallique par mg d'extrait.

#### 5.2.3. Évaluation de l'activité antidiabétique in-vitro des plantes sélectionnées

L'évaluation de l'activité antidiabétique in-vitro a été réalisée en utilisant trois protocoles différents. Chaque protocole agit sur un organe différent, activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase pancréatique, activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase intestinale et l'effet sur la diffusion du glucose.

##### 5.2.3.1. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase intestinale in-vitro

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase a été testée selon la méthode décrite par [361]. En bref, une solution d'extrait a une concentration de 5 mg/mL a été préparée. Ensuite, 50 µl de la solution mère ont été mélangés avec 100 µl de tampon phosphate 0,1 M (pH 6,9) contenant 1M de solution d' $\alpha$ -glucosidase. Les mélanges ont ensuite été incubés à 25°C pendant 10 minutes. Ensuite, 50µl d'une solution de p-nitrophényl- $\alpha$ -D-glucoopyranoside a 5mM dans un tampon phosphate 0,1M (pH 6,9) ont été ajoutés. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 25°C pendant 5 minutes. Les lectures d'absorbance ont ensuite été prises à 405 nm en utilisant un spectrophotomètre et les valeurs ont été comparées à un contrôle qui contient 50µl du tampon au lieu de l'extrait.

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase a été exprimée en% d'inhibition en utilisant l'expression (équation 5.2):



$$Inhibition (\%) = \left( \frac{(A_{\text{témoin}(0)} - A_{\text{témoin}}) - (A_{\text{extrait}(0)} - A_{\text{extrait}})}{A_{\text{témoin}(0)} - A_{\text{témoin}}} \right) \cdot 100 \quad (5.2)$$

Où :  $A_{\text{témoin}(0)}$  et  $A_{\text{extrait}(0)}$  sont les absorbances de l'échantillon témoin et de l'extrait respectivement à  $t_0$ ,  $A_{\text{témoin}}$  et  $A_{\text{extrait}}$  sont les absorbances de l'échantillon témoin et de l'extrait respectivement après réaction.

#### 5.2.3.2. Activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase pancréatique in-vitro

L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase a été déterminée en utilisant la méthode décrite par [362,363]. En bref, une solution de concentration de 5 mg/ml d'extrait a été préparée et 500 $\mu$ l de cette solution a été mélangés avec 500 $\mu$ l de tampon phosphate de sodium 0,02M (pH 6,9) contenant 0,5 mg/ml de solution d' $\alpha$ -amylase et incubés dans des tubes à essai à 25°C pendant 10 minutes. Après pré-incubation, 500 $\mu$ l de la solution d'amidon à 1% dans du tampon phosphate de sodium 0,02M (pH 6,9) ont été ajoutés à chaque tube à des intervalles de temps différents. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 25°C pendant 10 minutes et arrêtés avec 1,0 ml de réactif colorant acide dinitrosalicyclique. Les tubes ont ensuite été incubés dans un bain d'eau bouillante pendant 5 minutes ensuite refroidis à température ambiante. Les mélanges réactionnels ont été dilués avec de l'eau distillée (15ml) et les absorbances ont été mesurées à 504nm en utilisant un spectrophotomètre, les valeurs ont été comparées à un témoin qui contient 500 $\mu$ l de tampon au lieu des extraits. L'activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase a été exprimée en % d'inhibition.

#### 5.2.3.3. Effet sur la diffusion du glucose in-vitro

L'étude de diffusion du glucose in vitro a été réalisée en suivant la méthode décrite par [364,365]. Brièvement, le système utilisé se compose d'un tube de dialyse unilatéral (10cm x 15mm, membrane de dialyse, Sigma-Aldrich MW12173) dans la quel 2 ml de D-glucose 22 mM dans du NaCl 0,15 M et 1 ml d'extrait (5 mg/ml) ont été incorporés. L'autre extrémité a ensuite été scellée et la membrane a été placée dans un b cher en verre de 100 ml contenant 40 ml de NaCl 0,15 M et 10 ml d'eau distillée pour équilibrer la résistance du milieu interne et externe. Les b chers ont été placés dans un incubateur à 37  C sous agitation à 100 tr/min. Le mouvement du glucose dans le milieu externe par rapport à un témoin négatif a été suivi à des intervalles de temps déterminés, 1, 2, 3 et 4 heures. L'absorbance a été mesuré à 500 nm.

### 5.3. Résultats et discussions

#### 5.3.1. Enquête ethnopharmacologique sur le traitement du diabète dans la région de la Mitidja et ses environs

A l'issue de l'enquête ethnobotanique, nous avons pu récolter et identifier 27 espèces végétales et déterminer leurs fréquences d'utilisation par les patients diabétiques, ces espèces végétales sont : *Salvia officinalis*, *Salvia algeriansis*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia herba alba*, *Dittrichia viscosa*, *Marubium vulgare*, *Olea europaea*, *Ephedra alata*, *Atriplex halimus*, *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Nerium oleander*, *Artemisia absinthium*, *Citrullus colocynthis*, *Titrachiris articulate*, *Trigonella foenum-groecum*, *Lavandula stoechas*, *Mentha pulegium*, *Origanum compactum*, *Origanum mogoma*, *Cinnomonum cassia lorr*, *Punica granatum*, *Ficus cariae*, *Nigella sativa*, *Zyziphus lotus* et *Pistacia lentiscus*. Les valeurs des UV pour chaque plante sont données dans le tableau 5.1.

Selon les patients, les tiges et les feuilles sont les parties utilisées pour la préparation des remèdes pour toutes les plantes, à l'exception de *Allium sativum L.* et *Allium cepa L.* pour lesquelles sont utilisés les bulbes, *Matricaria chamomilla* pour laquelle sont utilisés les fleurs, *Citrullus colocynthis*, *Trigonella foenum-graecum* et *Nigella sativa* pour lesquelles sont utilisés les graines et enfin, *Punica granatum* pour laquelle sont utilisés les écorces.

La méthode de préparation du traitement est pareille pour toutes les plantes, une tisane est préparée en mélangeant la matière végétale finement broyée à de l'eau bouillante à l'exception de *Citrullus colocynthis* qui a une utilisation plus simple, qui consiste à avaler directement la graine (comme un comprimé)

Les résultats de cette enquête ethnopharmacologique, ont montrés que certaines plantes sont nettement plus utilisées que d'autres, parmi ces plantes on retrouve *Citrullus colocynthis* (UV=0.102), *Trigonella foenum-graecum* (UV=0.094), *Rosmarinus officinalis* (0.087), *Marrubium vulgare L* (UV=0.072), *Artemisia herba alba* (UV=0.069), mais la plante la plus utilisée est *Salvia officinalis*, elle a été citée par 81 patients et représente un UV de 0.133.

**Tableau 5.1** : Résultats de l'enquête ethnopharmacologique.

N°	Nom scientifique	Nom arabe	Non berbère	partie utilisée	méthode de préparation	nombre d'utilisateurs	UV
1	<i>Atriplex halimus</i> L.	gtef	gtef	feuilles et tiges	tisane	2	0.003
2	<i>Allium sativum</i> L.	toum	thicherth	bulbes	tisane	4	0.007
3	<i>Allium cepa</i> L.	bsel	levsel	bulbes	tisane	1	0.002
4	<i>Nerium oleander</i>	defla	ilili	feuilles et tiges	tisane	8	0.013
5	<i>Matricaria chamomilla</i>	babounedj	wajdim	fleurs	tisane	12	0.020
6	<i>Raphanus sativus</i> L.	fijel	awermi	feuilles et tiges	tisane	1	0.002
7	<i>Opuntia ficus-indica</i>	hendi	akermous	feuilles et tiges	tisane	3	0.005
8	<i>Citrullus colocynthis</i>	lahtedj	Reman a khchkhach	graines	boire la graine avec de l'eau	62	0.102
9	<i>Tetraclinis articulata</i>	arar	azimba	feuilles et tiges	tisane	25	0.041
10	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	halba	halba	graines	tisane	57	0.094
11	<i>Lavandula stoechas</i> L.	halhal	amezir gudrar	feuilles et tiges	tisane	31	0.051
12	<i>Marrubium vulgare</i> L.	meriweth	meruyeth	feuilles et tiges	tisane	44	0.072
13	<i>Ficus carica</i> L.	kermous	thankoulth	feuilles et tiges	tisane	1	0.002
14	<i>Ziziphus lotus</i> (L.) Lam	sedra	tazugarth	feuilles et tiges	tisane	27	0.044
15	<i>pistacia lentiscus</i>	derw	amather/tit hekth	feuilles et tiges	tisane	32	0.053
16	<i>Vitis vinifera</i>	dalia	arrich/thar a/tajnant	feuilles et tiges	tisane	16	0.026
17	<i>Salvia algeriansis</i>	lberweg	aberweg	feuilles et tiges	tisane	7	0.012
18	<i>Salvia officinalis</i>	swek nbi	irgel	feuilles et tiges	tisane	81	0.133
19	<i>Rosmarinus officinalis</i>	laklil	amezir	feuilles et tiges	tisane	53	0.087
20	<i>Arthemisia herba alba</i>	chih	chih	feuilles et tiges	tisane	42	0.069
21	<i>Dittrichia viscosa</i>	magraman	amagraman	feuilles et tiges	tisane	5	0.008
22	<i>Oléa europeae</i>	zitoune/zebo udj	azemour/a zeboudj	feuilles et tiges	tisane	26	0.043
23	<i>Ephedra alata</i>	lemrira	ifis	feuilles et tiges	tisane	1	0.002
24	<i>Arthemisia absinthium</i>	chedjret meriem	chedjret meriem	feuilles et tiges	tisane	4	0.007
25	<i>Mentha pulegium</i>	naenaa	naenaa	feuilles et tiges	tisane	11	0.018
26	<i>Punica granatum</i>	reman	reman	écorce	tisane	32	0.053
27	<i>Nigella sativa</i>	sanoudj/haba souda	sanoudj	graines	tisane	19	0.031

### 5.3.2. Extraction et caractérisation des molécules bioactives à partir de plantes sélectionnées

#### 5.3.2.1. Les rendements

Les rendements d'extractions des différentes plantes en utilisant l'eau et l'éthanol comme solvants d'extraction sont donnés dans le tableau 5.3.

Les résultats obtenus ont montré que l'éthanol permet d'obtenir de plus grands rendements comparé à l'eau. Effectivement, les alcools comme l'éthanol permettent de solubiliser plus de familles chimiques que l'eau [366].

Les graines et les bulbes présentent des rendements plus importants que les feuilles, les tiges, les fleurs et les écorces. Ces rendements importants sont dus à la nature des composés chimiques solubles que les bulbes et les graines renferment ; ces parties sont considérées comme des réserves nutritives pour la plante (bulbes) ou comme des structures qui contiennent et protègent l'embryon végétal (graines), d'où leur grand taux de métabolites primaires (glucides, lipides et protéines) et secondaires (polyphénols, phytostérols ...), par contre les parties aériennes utilisées (feuilles, tiges, écorces et fleurs) contiennent moins de métabolites solubles et plus de cellulose insoluble (polymère structural qui est le principal constituant de la paroi des cellules végétales).

#### 5.3.2.2. Le screening phytochimique

Le tableau 5.2 nous renseigne sur les différentes familles chimiques contenues dans les extraits préparés.

Toutes les plantes (extraits aqueux et éthanoliques) contiennent des phénols, des flavonoïdes, des tanins et des glycosides. Ces quatre familles de molécules sont toutes considérées comme des polyphénols, ces dernières sont toutes solubles dans les solvants polaires comme l'eau et les alcools [367]. Les polyphénols sont le type d'entités phytochimiques les plus abondants dans la nature.

Tous les extraits aqueux ne contiennent pas d'alcaloïdes, de triterpènes, d'antraquinones et de phytostérols car ces quatre familles sont insolubles dans l'eau, les alcaloïdes sont solubles dans les milieux acides et les alcools [368], les triterpènes sont solubles dans les solvants organiques [369], les anthraquinones sont solubles dans les solvants organiques apolaires [370] et les phytostérols sont solubles dans les solvants organiques de faible

polarités [371]. Tous les extraits éthanoliques sans exception contiennent des triterpènes, effectivement l'éthanol permet la solubilisation de tous les terpènes [369,372].

La présence d'antraquinones a été mise en évidence dans les extraits éthanoliques de 5 plantes seulement. Ces plantes sont : *Allium sativum L.*, *Allium cepa L.*, *Opuntia ficus-indica*, *Pistacia lentiscus* et *Oléa europeae*.

La présence de saponines a été mise en évidence dans les extraits aqueux et éthanoliques de 19 plantes : *Allium sativum L.*, *Allium cepa L.*, *Matricaria chamomilla*, *Citrullus colocynthis*, *Trigonella foenum-graecum*, *Lavandula stoechas L.*, *Marrubium vulgare L.*, *Ziziphus lotus (L.) Lam*, *pistacia lentiscus*, *Salvia algeriansis*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Arthemisia herba alba*, *Dittrichia viscosa*, *Oléa europeae*, *Ephedra alata*, *Arthemisia absinthium*, *Mentha pulegium* et *Nigella sativa*. De plus tous les extraits éthanoliques de ces 19 plantes contiennent des alcaloïdes et des phytostérols. Cette présence simultanée de ces différentes entités chimiques est due à la nature des saponines qui sont des tensioactifs naturels composés d'une partie hydrophile (qui contient des sucres) et d'une partie hydrophobe (qui contient des alcaloïdes, des phytostérols ou des triterpènes) [373-375].

#### 5.3.2.3. Dosage des polyphénols totaux

Les résultats des dosages des polyphénols totaux sont représentés sur le tableau 5.3.

Les polyphénols (acides phénoliques, tanins et flavonoïdes) sont les seuls composés en communs contenus dans les différentes plantes antidiabétiques étudiés, c'est pour cette raison que les dosages de ces derniers est important pour choisir la plante ayant le plus grand pouvoir antidiabétique.

De manière générale les extraits éthanoliques présentent un taux de polyphénols totaux plus important que les extraits aqueux, cette importance est due à la forte solubilité de ces composés dans l'éthanol que dans l'eau. Les taux de polyphénols totaux varient selon les plantes, l'espèce végétale présentant le plus grand taux de polyphénols totaux est *Salvia officinalis* (164.02 Eq mgAG / gE pour l'extrait aqueux et 172.95 Eq mgAG / gE pour l'extrait éthanolique). Ces variations sont dus à plusieurs facteurs liés à la plante (génétique, âge, stade végétale ...) [376] et liés à l'environnement dans le quel la plante existe (saison, humidité, température, soleil ...) [377-380].

Tableau 5.2 : Résultats du screening phytochimique.

N°	Nom scientifique	Screening phytochimique : familles de composés chimiques																	
		Phé		Fla		Tan		Gly		Sap		Alc		Ant		Tri		Phy	
		W	E	W	E	W	E	W	E	W	E	W	E	W	E	W	E	W	E
1	<i>Atriplex halimus</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2	<i>Allium sativum</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
3	<i>Allium cepa</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
4	<i>Nerium oleander</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	<i>Matricaria chamomilla</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
6	<i>Raphanus sativus</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7	<i>Opuntia ficus-indica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
8	<i>Citrullus colocynthis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
9	<i>Tetraclinis articulata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
10	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
11	<i>Lavandula stoechas</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
12	<i>Marrubium vulgare</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
13	<i>Ficus carica</i> L.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
14	<i>Ziziphus lotus</i> (L.) Lam	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
15	<i>pistacia lentiscus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
16	<i>Vitis vinifera</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
17	<i>Salvia algeriansis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
18	<i>Salvia officinalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
19	<i>Rosmarinus officinalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
20	<i>Artemesia herba alba</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
21	<i>Dittrichia viscosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
22	<i>Oléa europeae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
23	<i>Ephedra alata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
24	<i>Artemesia absinthium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
25	<i>Mentha pulegium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+
26	<i>Punica granatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
27	<i>Nigella sativa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+

W : extrait aqueux.
E : extrait éthanolique.
+ : présence.
- : absence.
Phé : Phénols.

Tan : Tanins.
Fla : flavonoïdes
Phy : phytostérols.
Tri : triterpènes.
Gly : glycosides.

Ant : anthraquinones.
Sap : saponines.
Alc : alcaloïdes.

**Tableau 5.3** : Résultats des rendements, des dosages de polyphénols totaux et des activités antidiabétiques in-vitro.

N	Nom scientifique	Rendement (%)		DPT (Eq mgAG / gE)		AI- $\alpha$ -A (%)		AI- $\alpha$ -G (%)		GD (%)	
		W	E	W	E	W	E	W	E	W	E
1	Atri halimus L	11.49	14.44	121.14	122.37	12.14	44.31	12.13	11.24	43.05	11.23
2	Allium sativum L	24.16	36.31	132.43	134.16	13.46	24.31	11.76	24.90	11.23	36.22
3	Allium cepa L	22.54	35.17	138.21	141.55	11.49	14.44	11.73	15.49	17.22	19.14
4	Nerium oleander	16.21	19.14	119.12	120.92	24.16	36.31	10.61	14.50	12.62	17.64
5	Matricaria chamomilla	12.31	17.64	146.36	149.72	22.54	35.17	16.57	21.45	11.43	26.31
6	Raphanus sativus L.	16.42	17.35	103.14	111.06	16.21	19.14	9.31	16.22	14.57	17.11
7	Opuntia ficus-indica	15.33	19.74	106.63	108.40	12.31	17.64	15.97	19.42	11.72	17.13
8	Citrullus colocynthis	27.65	34.94	142.35	143.79	16.42	17.35	12.12	19.11	16.23	19.21
9	Tetraclinis articulata	13.17	18.55	128.53	131.21	15.33	19.74	20.32	26.07	13.97	14.14
10	foenum-graecum	39.17	41.13	122.61	127.87	27.65	34.94	28.19	41.69	17.52	19.54
11	Lavandula stoechas L.	17.22	26.31	134.77	140.36	13.17	18.55	12.31	11.73	16.21	14.05
12	Marrubium vulgare L.	12.62	17.11	<b>152.19</b>	<b>162.85</b>	<b>66.64</b>	<b>72.41</b>	<b>62.12</b>	<b>59.11</b>	<b>45.33</b>	<b>49.74</b>
13	Ficus carica L.	11.43	17.13	140.22	154.32	13.46	24.31	15.33	16.57	10.61	22.11
14	Ziziphus lotus	14.57	19.21	<b>153.29</b>	<b>167.71</b>	<b>60.57</b>	<b>64.45</b>	<b>47.65</b>	<b>59.31</b>	<b>46.57</b>	<b>45.49</b>
15	pistacia lentiscus	11.72	14.14	119.83	121.92	15.49	17.22	13.17	15.97	9.31	14.50
16	Vitis vinifera	16.23	19.54	107.01	109.13	14.50	12.62	39.17	12.12	19.11	21.45
17	Salvia algeriensis	13.97	14.05	143.12	147.21	21.45	11.43	17.22	20.32	26.07	16.22
18	Salvia officinalis	17.52	24.13	<b>164.02</b>	<b>172.95</b>	<b>74.06</b>	<b>77.57</b>	<b>70.32</b>	<b>76.07</b>	<b>57.65</b>	<b>64.94</b>
19	Rosmarinus officinalis	16.21	22.11	<b>158.11</b>	<b>167.76</b>	<b>61.29</b>	<b>69.11</b>	<b>58.19</b>	<b>61.69</b>	<b>53.17</b>	<b>58.55</b>
20	Arthemisia herba alba	11.73	15.49	111.91	114.12	16.42	10.61	14.57	15.49	24.16	36.31
21	Dittrichia visc	10.61	14.50	137.94	140.52	12.62	28.19	10.61	14.50	22.54	35.17
22	Oléa europeae	16.57	21.45	120.63	121.06	11.43	30.88	16.57	21.45	16.21	19.14
23	Ephedra alata	9.31	16.22	109.21	109.53	11.73	24.13	9.31	16.22	12.31	17.64
24	Arthemisia absinthium	15.97	19.42	142.71	146.90	41.69	19.42	15.97	19.42	16.42	17.35
25	Mentha pulegium	12.12	19.11	127.79	129.16	11.49	19.11	12.12	19.11	15.33	19.74
26	Punica granatum	20.32	26.07	114.49	118.99	13.17	18.55	20.32	26.07	27.65	34.94
27	Nigella sativa	28.19	41.69	138.04	141.35	39.17	41.13	28.19	41.69	13.17	18.55

DPT: dosage des polyphénols totaux.

AI- $\alpha$ -A: activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase pancréatique (pourcentage d'inhibition).

AI- $\alpha$ -G: activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase intestinale (pourcentage d'inhibition).

GD: effet de l'extrait sur la diffusion du glucose (pourcentage d'inhibition de la diffusion du glucose).

Eq mgAG/GE: équivalent mg d'acide gallique par g d'extrait.

### 5.3.3. Évaluation de l'activité antidiabétique in-vitro des plantes sélectionnées

Les résultats des activités antidiabétiques in-vitro des plantes sélectionnées sont représentés sur le tableau 5.3.

Toutes les plantes étudiées sans exception ont montrés une activité antidiabétique. *Salvia officinalis* reste la plante qui a montré le plus grand pouvoir antidiabétique comparés aux autres plantes, se résultat confirme notre enquête ethnopharmacologique préalablement réalisée.

### 5.4. Conclusion

Les études réalisées lors de cette partie, nous ont permis de se renseignés sur le traitement traditionnel du diabète dans la région de la Mitidja et ses environs, et de confirmé expérimentalement les propriétés antidiabétiques de ses composés.

D'un point de vue ethnobotanique : nous avons identifié 27 plantes appartenant à 19 familles différentes.

D'un point de vue ethnopharmacologique : l'étude de l'activité antidiabétique a permis de montré que 24 espèces on déjà été étudiées in-vivo, 16 espèces ont déjà été étudiées in-vitro, 11 espèces ont déjà été étudié cliniquement et 2 espèces n'ont jamais été étudiées dans la bibliographie et leur activité antidiabétique a été révélé pour la première fois dans notre étude.



## CHAPITRE 6

### ETUDE DE LA PLANTE

#### 6.1. Introduction

*Salvia officinalis* est une plante médicinale traditionnellement utilisée pour le traitement de plusieurs maladies comme le diabète et les maladies inflammatoires, plusieurs de ses activités biologiques ont été mises en évidence comme l'activité antimicrobienne, anticancéreuse, anti-VIH, cytotoxique, antipyrétique, anti-ulcéreugénique, antidiabétique et hypolipémiante [381-384]. Jusqu'à aujourd'hui, beaucoup d'études ont été réalisées sur sa composition chimique et ses activités biologiques [385], mais l'étude des paramètres d'extraction de ces composés chimiques à partir de cette plante n'existe pas dans la bibliographie.

Le but de ce travail est d'étudier et d'optimiser les paramètres d'extraction des molécules bioactives à partir des feuilles de *Salvia officinalis*. L'extraction des molécules bioactives sera réalisée par l'extracteur soxhlet en utilisant 3 solvants différents (l'éthanol, le dichlorométhane et l'hexane). Le temps d'extraction et la force de chauffage seront optimisés pour chaque solvant en utilisant un plan factoriel complet à deux niveaux et deux facteurs. Nous étudierons l'effet de ces paramètres sur deux réponses différentes qui sont le rendement de l'extraction, et le taux de polyphénols extraits. Ensuite l'étude de la composition chimique des molécules non-volatiles et volatiles de *Salvia officinalis* sera réalisée par HPLC/UV-DAD et CG/SM. Enfin l'évaluation de l'activité antidiabétique in-vivo des différents extraits de la sauge sera réalisée sur les rats wistar.

#### 6.2. Matériel et méthodes

##### 6.2.1. Extraction des molécules bioactives de *Salvia officinalis*

**Matériel végétal :** Les feuilles de *Salvia officinalis* ont été récoltées au stade de floraison (samedi 11 février 2015) à Roudah, commune de Ouled Sidi Brahim wilaya de Bouira, à 170 Km d'Alger, Algérie. La position géographique du lieu de récolte est représentée dans la figure 6.1 (Geonames-ID: 2485311, Latitude: 36.36748, Longitude: 3.70329, Altitude: 801). La plante récoltée (Figure 6.2 A) est lavée puis séchée à l'ombre durant une semaine, après séchage la plante est finement broyée et tamisée à 100 µm.

**Produits chimiques :** L'éthanol (99%), le dichlorométhane (96%) et l'héxane (99%) sont fournis par QUIMICA PANREAC, Barcelone. Le réactif de Folin-Cicatleu (Sigma Aldrich), l'acide gallique (Panreac Quimica), le carbonate de sodium (Sigma Aldrich), le méthanol, et l'eau distillée utilisés sont tous des produits de grade laboratoire.



**Figure 6.1 :** Position géographique de Roudah, Ouled Sidi Brahim, Bouira, Algérie.

#### 6.2.1.1. Extraction des molécules bioactives non-volatiles

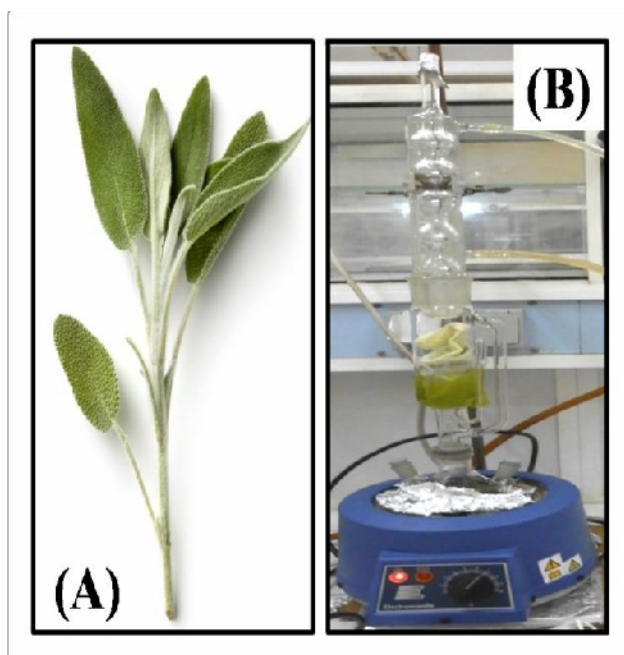
##### Le procédé d'extraction utilisé

20 g de poudre de plante est introduit dans une cartouche d'extraction en cellulose (Albert labscience®). La cartouche est placée dans un soxhlet de marque Rivier® d'un volume de 200 ml, muni d'un ballon de 500 ml contenant 300 ml de solvant organique. Le chauffage est assuré à l'aide d'un chauffe-ballon de type Electrothermal®. Le montage utilisé est représenté sur la figure 6.2 B.

Dans cette étude, le rapport matière végétale/volume du solvant organique est maintenu fixe (1/9 w/v), par contre la durée de l'extraction et la force du chauffage ont été modifiées et variées afin d'étudier leurs effets sur les réponses sélectionnées.

L'effet de la nature du solvant utilisé a également été étudié en sélectionnant trois solvants organiques différents, l'éthanol (solvant polaire protique), le dichlorométhane (solvant

polaire aprotique) et l'hexane (solvant apolaire) ; les caractéristiques de chaque solvant sont données dans le tableau 6.1.



**Figure 6.2** : Photographie de *Salvia officinalis* (à gauche), photographie du montage Soxhlet utilisé (à droite).

**Tableau 6.1** : Caractéristiques des solvants utilisés.

Solvant	Formule chimique	Type du solvant organique	Température d'ébullition (°C)	Moment dipolaire (D)	Polarité
Éthanol	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	Polaire protique	78,37	1,69	0.654
Dichlorométhane	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	solvant polaire aprotique	39,6	1,60	0.309
Hexane	CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> - CH <sub>3</sub>	solvant apolaire	68,95	1,09	0.009

#### Plans d'expériences utilisés

Pour chaque solvant, les paramètres d'extraction des molécules bioactives ont été optimisés en utilisant un plan factoriel à deux niveaux, deux facteurs et un point au centre, le nombre d'expériences pour chaque plan factoriel est donné par l'équation 6.1 [386]:

$$N = L^F + 1 \quad (6.1)$$

Où : « N » est le nombre d'expériences, « L » le nombre des niveaux et « F » le nombre des facteurs ; le nombre d'expériences réalisées est  $2^2 + 1 = 5$  expériences pour optimiser les paramètres d'extraction pour chaque solvant. Les facteurs modifiés sont le temps d'extraction (facteur 1) et la force de chauffage (facteur 2), les valeurs des niveaux haut (+1) et bas (-1) de chaque facteur sont données dans le tableau 6.2.

**Tableau 6.2:** Matrices des expériences.

Solvant	Essais n°	Facteur 1 : Temps d'extraction		Factor 2 : Force de chauffage	
		Niveau	Valeurs (min)	Niveau	Valeurs (watt)
Ethanol	1	+1 <sup>a</sup>	120	+1	200
	2	-1 <sup>b</sup>	100	+1	200
	3	+1	120	-1	140
	4	-1	100	-1	140
	5	0 <sup>c</sup>	110	0	170
Dichloro methane	6	+1	120	+1	200
	7	-1	100	+1	200
	8	+1	120	-1	140
	9	-1	100	-1	140
	10	0	110	0	170
Hexane	11	+1	120	+1	200
	12	-1	100	+1	200
	13	+1	120	-1	140
	14	-1	100	-1	140
	15	0	110	0	170

<sup>a</sup> : Niveau haut (+1). <sup>b</sup> : Niveau bas (-1). <sup>c</sup> : valeur au centre (0).

Nous avons choisi deux réponses principales pour nos plans d'expériences qui sont : le rendement de l'extraction (réponse 1) et le taux de polyphénols extraits (réponse 2) en équivalent gramme d'acide gallique.

Après la réalisation des expériences et l'analyse des résultats à l'aide du logiciel MODDE.6, l'effet des facteurs sur les réponses sera évalué et les différents coefficients des modèles mathématiques seront obtenus.

Le modèle mathématique d'un plan factoriel complet à deux niveaux et deux facteurs est donné par l'équation polynomiale 6.2 [386]:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (6.2)$$

Où : « Y » est la réponse, «  $\beta_0$  » est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude, «  $\beta_i$  » est l'effet du facteur i, «  $\beta_{ij}$  » est l'effet de l'interaction entre les facteurs i et j, «  $x_i$  » est le niveau attribué au facteur i.

#### Détermination du rendement

A la fin de chaque extraction, le ballon contenant les molécules bioactives extraites est récupéré, le solvant organique est évaporé sous vide à l'aide d'un rotavapor de type Heidolph® dont le bain est réglé à 40°C, puis la masse de la concrète obtenue est pesée à l'aide d'une balance analytique. Le rendement d'extraction est calculé par l'équation 6.3:

$$R(\%) = \frac{m_{\text{ext}}}{m_v} \times 100 \quad (6.3)$$

Où : « R » est le rendement (%), «  $m_{\text{ext}}$  » est la masse de l'extrait après évaporation du solvant (g), «  $m_v$  » la masse végétale initiale dans la cartouche (g).

#### Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits obtenus est réalisé par la méthode de Folin-ciocalteu [359,360] en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible de type SHIMADZU®. Des solutions de 20 mg d'extraits dans 6 ml de méthanol ont été préparées, 0.5 ml de chaque solution est prélevé et mélangé à 2.5 ml de solution de carbonate de sodium à 20 % w/v et 2.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 % v/v. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance des solutions a été déterminée à une longueur d'onde de 765 nm. La quantification est faite selon une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions avec des solutions d'acide gallique (utilisée comme polyphénol de référence) de différentes concentrations, qui varient de 0 à 50 µg/ml). Les résultats sont exprimés en équivalent mg d'acide gallique par mg d'extrait.

##### 6.2.1.2. Extraction des molécules bioactives volatiles

L'extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* a été réalisée par hydrodistillation en utilisant l'appareil de Clevenger. Le protocole utilisé est celui décrit par la pharmacopée

Européenne [387]. 150 g de la plante sèche est introduite dans un ballon de 2l contenant 1.5l d'eau distillée ; après 3 heures d'extraction, l'huile essentielle est récupérée puis pesée. Le rendement de l'extraction est calculé en utilisant l'équation 6.4 :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse de l'huile esentielle extraite}}{\text{masse de la plante utilisée}} \quad (6.4)$$

## 6.2.2. Caractérisation des molécules bioactives de *Salvia officinalis*

### 6.2.2.1. Caractérisation des molécules bioactives non-volatiles par HPLC/UV-DAD

L'analyse a été réalisée en utilisant un appareil HPLC de type WATERS muni d'un détecteur UV/DAD. La méthode utilisée est celle décrite par [388]. La phase stationnaire utilisée est de type (Nucleosil – C18, 25 x 0.4mm i.d., 5µm particle). La phase mobile est un mélange de deux solvants, le premier est un mélange d'eau et d'acide phosphorique à 999 :1 (v/v) (solvant A) et le deuxième est l'acetonitrile (solvant B). Le gradient utilisé est de : 90%A/10%B, 0 min; 90 à 78% A/10 à 22%/B, 0-13 min; 78 à 60%A/ 22 à 40%/B, 13-14 min; 60%A/40%B, 14-20 min. Le débit est de 1,5 ml / min, le volume d'injection de 20 µL et la longueur d'onde de suivie est de 310 nm.

L'identification des différents composés séparés est réalisée par la comparaison des temps de rétentions des pics obtenus avec les temps de rétentions des standards préalablement analysé dans les mêmes conditions opératoires. Les standards utilisés sont l'acide caféique (9.14 min) et l'acide ferulique (12.39 min), la rutine (15.59 min), l'acide rosmarinique (16.58 min) et la quercitrine (18.87 min).

### 6.2.2.2. Caractérisation des molécules bioactives volatiles par CG/SM

La composition chimique de l'huile essentielle est déterminée en utilisant un appareil de chromatographie gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (CG/SM) de type Hewlett-Packard 6890 series GC systems (Agilent Technologies) couplé à un spectrophotomètre de masse de type quadruple HP 5973. Le système utilisé est équipé d'une colonne capillaire de type HP5MS (5% phenyl methylsiloxane, 30m × 0.25mm, 0.25µm épaisseur du film). Les conditions analytiques sont : température de l'injecteur 250°C, température isotherme de 60°C, 8min à 250°C, 30min avec un pat de 2°C/min ; l'hélium a été utilisé comme gaz vecteur (He, 0.5ml/min, split 1/20); un voltage

d'ionisation de 70eV et une gamme de scan de 35-500uma. L'identification des composés est basée sur la comparaison des temps de rétention de ces derniers avec les standards identifiés et la base de données informatique en utilisant les temps de rétention d'une série d'alcanes [389,390].

### 6.2.3. Évaluation de l'activité antidiabétique in-vivo des extraits de *Salvia officinalis*

#### 6.2.3.1. Matériel animal

Avant de commencer les expérimentations in-vivo, nous avons consulté le guide des éthiques de l'expérimentation sur les animaux obtenu par le comité institutionnel et utilisation des animaux (Institutional Animal Care and Use Committee « IACUC »). Les animaux utilisés sont des rats albinos de type Wistar, d'un poids de 200+250g, âgés de 70-90 jours.

Les rats ont été obtenus de l'animalerie de l'USTHB. Avant de commencer les expériences les rats ont été mis dans leur box à l'animalerie durant 8 jours pour s'acclimatiser avec les conditions environnementales qui sont la température ( $20\pm 5$  °C), l'humidité relative (45–55 %) et un cycle jour/nuit de 12h. tous les rats ont un accès à l'alimentation et à l'eau à volonté, sous des conditions d'hygiène stricte.

#### 6.2.3.2. Induction du diabète

Les rats ont été mis sous diète standard de 24h, ensuite une injection intrapéritoniale de 50mg/kg de streptozotocine [391,392] dissoute dans un tampon citrate 0.1M (pH=4.5). Après 10-14 jours de l'injection le diabète est confirmé sur les rats en mesurant la glycémie.

#### 6.2.3.3. Procédure expérimentale

Après induction et confirmation du diabète, les rats ont été divisés en six groupes de 6 rats chacun. Cette étude consiste en l'administration d'une dose quotidienne unique du traitement pour chaque rat, les différents traitements pour les rats de chaque groupe sont donnés dans le tableau 6.3.

L'activité antidiabétique chronique est le modèle utilisé dans notre étude qui a duré 4 semaines (28 jours) au cours desquelles les paramètres antidiabétiques, antioxydants et hypolipidémiques de *Salvia officinalis* sur le diabète induit sur les rats par la

streptozotocine. Le traitement a été administré par gavage intragastrique selon la méthode décrite par [393].

**Tableau 6.3** : Procédure expérimentale de l'activité antidiabétique in-vivo.

Groupes	Induction du diabète (STZ)	Traitement
<b>Groupe 1</b> : physiologique.	Non	Eau physiologique.
<b>Groupe 2</b> : témoin négatif.	Oui	Eau physiologique.
<b>Groupe 3</b> : témoin positif traité par le médicament de référence.	Oui	Glimepiride (20mg/kg).
<b>Groupe 4</b> : traitement par l'extrait éthanolique.	Oui	Extrait éthanolique (100mg/kg).
<b>Groupe 5</b> : traitement par l'huile essentielle.	Oui	Huile essentielle (100mg/kg).

#### 6.2.3.4. Suivi de la glycémie et du poids corporel des rats avant sacrifice

Les glycémies des rats ont été mesurées chaque deux jours avant l'administration du traitement en utilisant un glucomètre de type (Free-style®) [394,395]. Le prélèvement sanguin est réalisé au niveau du sinus orbital des animaux, et la glycémie est estimée en mg/dl (mg de glucose par dl de sang).

Le poids corporel des animaux est estimé chaque semaine durant toute la période du traitement (a J0, J7, J14, J21 et J28).

#### 6.2.3.5. Sacrifice et collection du sang et des organes

Après 28 jours de traitement et une diète de 24h, les rats ont été sacrifiés par décapitation cervicale sous anesthésie (pentobarbital 40mg/kg). Le sang a été récolté dans des tubes, et les foies ont été prélevés pour la détermination des paramètres biochimiques.

#### 6.2.3.6. Estimation des paramètres antidiabétiques

Quatre paramètres antidiabétiques ont été sélectionnés, la glycémie, l'hémoglobine glyquée (Hb1Ac), insulïnémie et dosage du glycogène hépatique.



La glycémie est estimée par la méthode oxydase [396]. L'hémoglobine glyquée est mesurée dans le plasma en utilisant des kits biologiques commerciaux de type (Erba Diagnostic) à l'aide d'un autoanalyseur de type (Chem 5 Plus-V2 Autoanalyser, Erba Mannheim, Germany). Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'hémoglobine totale. Le glycogène hépatique est estimé par la méthode décrite par [397]. Le niveau d'insuline dans le sérum est mesuré par le test enzyme-lié par immunosorption (ELISA) en utilisant Merckodia rat insulin ELISA kit, l'insulinémie est exprimé par  $\mu\text{g/l}$ .

#### 6.2.3.7. Estimation des paramètres lipidiques

Trois paramètres du bilan lipidique ont été étudiés, lipides totaux, triglycérides et cholestérol total. Le protocole utilisé est décrit par [398].

#### 6.2.3.8. Estimation des paramètres antioxydants

Deux paramètres antioxydants ont été étudiés, le malondialdéhyde et glutathione réduits.

Le malondialdéhyde (MDA), est l'indice de la régénération des radicaux libres sur la peroxydation lipidique, il est déterminé en utilisant la méthode décrite par [399].

L'estimation du taux de glutathione réduits dans le plasma du tissu hépatique est déterminée en utilisant le protocole décrit par [400], les résultats sont exprimés en  $\mu\text{mol GSH/g tissu}$ .

#### 6.2.3.9. Étude statistique

L'étude statistique pour la comparaison entre les résultats des différents groupes de rats a été réalisée par l'analyse ANOVA en utilisant le test de Student. Les différences sont dites significatives pour des valeurs de  $P < 0.05$ , très significatives pour des valeurs  $P < 0.01$  et non-significatives pour des valeurs  $P > 0.05$ .

### 6.3. Résultats et discussion

#### 6.3.1. Extraction des molécules bioactives de *Salvia officinalis*

##### 6.3.1.1. Extraction des molécules bioactives non-volatiles

#### Résultats des plans d'expériences

Les valeurs des rendements des extractions et des taux de polyphénols pour chaque expérience sont données dans le tableau 6.4.

**Tableau 6.4** : Matrice des réponses.

Solvant	Essais n°	Facteur 1	Facteur 2	Rendement de l'extraction (%) (Réponse 1)	Taux de polyphénols (mg GAE/g) (Réponse 2)
<b>Ethanol</b>	1	+1	+1	<b>27.11</b>	<b>174.32</b>
	2	-1	+1	<b>23.91</b>	<b>147.41</b>
	3	+1	-1	<b>20.85</b>	<b>136.88</b>
	4	-1	-1	<b>20.14</b>	<b>123.47</b>
	5	0	0	<b>22.79</b>	<b>147.01</b>
<b>Dichloro methane</b>	6	+1	+1	<b>5.29</b>	<b>9.82</b>
	7	-1	+1	<b>4.35</b>	<b>8.81</b>
	8	+1	-1	<b>5.45</b>	<b>8.42</b>
	9	-1	-1	<b>3.75</b>	<b>7.66</b>
	10	0	0	<b>4.72</b>	<b>8.73</b>
<b>Hexane</b>	11	+1	+1	<b>3.81</b>	<b>1.38</b>
	12	-1	+1	<b>3.75</b>	<b>1.3</b>
	13	+1	-1	<b>3.6</b>	<b>0.68</b>
	14	-1	-1	<b>3.55</b>	<b>0.64</b>
	15	0	0	<b>3.67</b>	<b>1.03</b>

On remarque que les rendements et les taux de polyphénols sont plus importants lors de l'utilisation de l'éthanol comme solvant d'extraction comparée à l'utilisation de l'hexane ou le dichloromethane. L'essai optimum des plans d'expériences étudiés est l'essai n°1, qui correspond à un temps d'extraction de 120 min et une puissance de chauffage de 200 W en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction.

Les histogrammes représentant les effets des facteurs sur les réponses sont donnés dans la figure 6.3.

Pour l'éthanol et l'hexane, l'effet de la force de chauffage sur le rendement de l'extraction et le taux de polyphénols extraits est plus important que celui du temps d'extraction. Les deux facteurs et leurs interactions ont un effet positif sur les réponses.

Pour le dichloromethane, on observe les mêmes effets que pour les deux autres solvants concernant le taux de polyphénols, mais pour la réponse 1 (rendement de l'extraction) le temps d'extraction présente un effet positif plus important que celui de la force de chauffage et l'interaction entre les deux facteurs est négative.

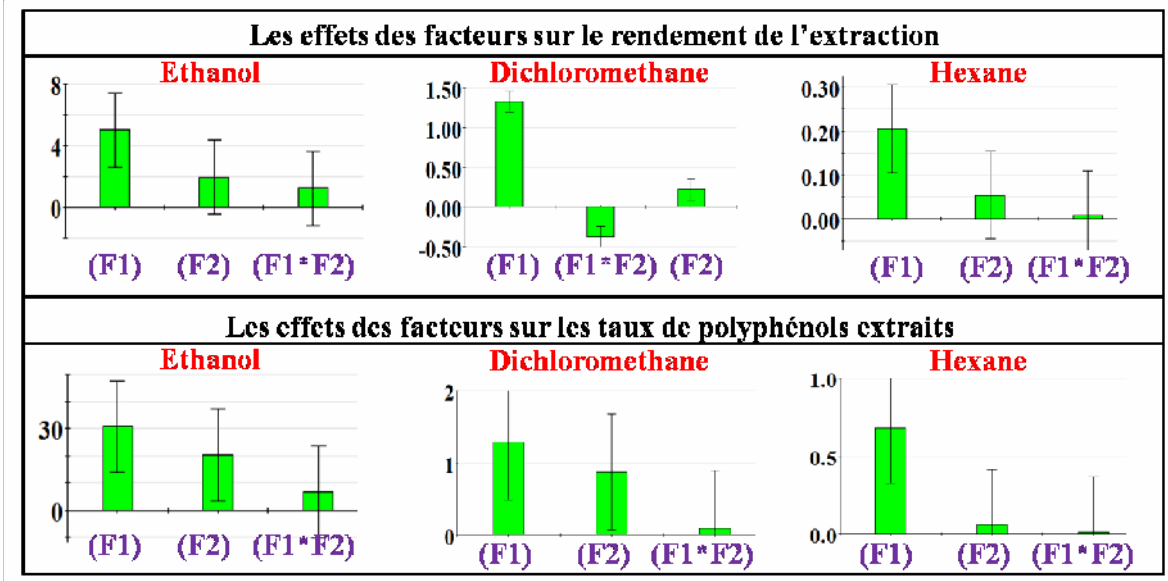


Figure 6.3 : Histogrammes représentant les effets des facteurs sur les réponses.

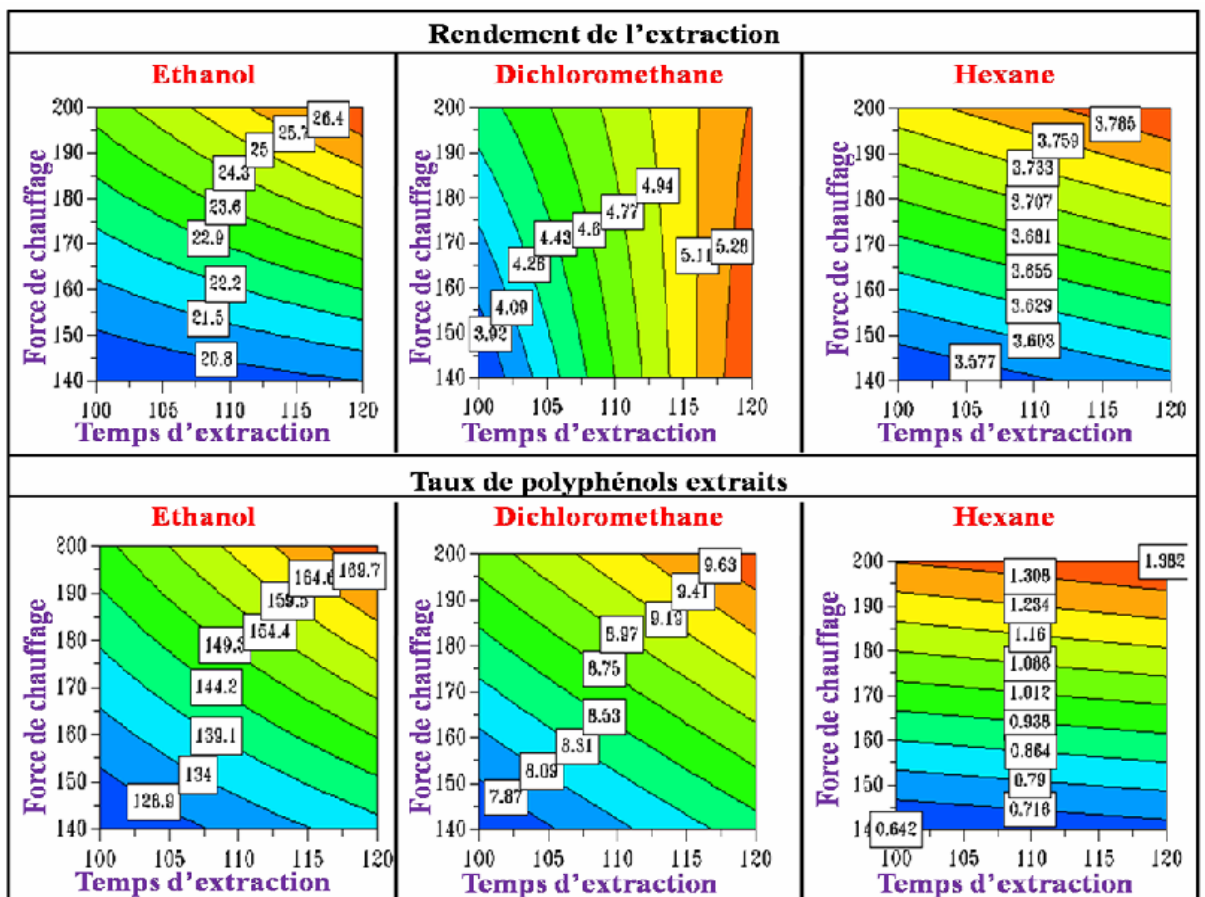


Figure 6.4 : Les contours représentant les prédictions des réponses dans les domaines étudiés.

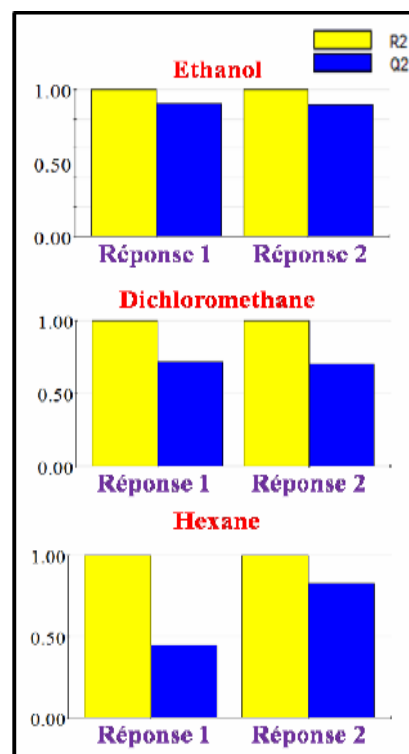
Les contours représentant la prédiction des réponses dans les domaines étudiés sont donnés dans la figure 6.4.

De manière générale, plus le temps d'extraction et la force de chauffage sont importants, plus le rendement de l'extraction et le taux de polyphénols extraits sont grands.

Toutefois, l'influence du temps d'extraction sur le rendement lors de l'utilisation du dichloromethane comme solvant, est nettement plus importante que celle de la force de chauffage ; et l'influence de la force de chauffage sur le taux de polyphénols extraits lors de l'utilisation de l'hexane comme solvant, est nettement plus importante que celle du temps d'extraction.

Les différents modèles mathématiques du procédé d'extraction des molécules bioactives de la sauge sont donnés dans le tableau 6.5.

Les histogrammes représentant les valeurs des coefficients de corrélation ( $R^2$ ) et des coefficients de prédiction ( $Q^2$ ) sont donnés dans la figure 6.5. On remarque que toutes les valeurs de  $R^2$  se rapprochent de 1, tandis que les valeurs de  $Q^2$  sont moins importantes que celles des coefficients de corrélations. Une seule valeur de  $Q^2$  inférieure à 0.5 a été observée pour le rendement de l'extraction en utilisant l'hexane comme solvant.



**Figure 6.5:** Les histogrammes représentant les valeurs de  $R^2$  et  $Q^2$ .

**Tableau 6.5** : Les modèles mathématiques.

Solvants	Réponses	Modèles mathématiques	Probabilité P	Significativité du modèle
<b>Ethanol</b>	Rendement de l'extraction (%)	Yield = 0.9775*Time + 2.5075* power + 0.6225*Time* power + 22.96	<b>0.044<sup>a</sup></b>	significant
	Taux de polyphénols (mg GAE/g)	Poly = 10.08*Time + 15.345*power + 3.375*Time*power +145.818	<b>0.045<sup>a</sup></b>	significant
<b>Dichloro methane</b>	Rendement de l'extraction (%)	Yield = 0.660819*Time + 0.109279* power – 0.187535*Time* power + 4.712	<b>0.010<sup>a</sup></b>	significant
	Taux de polyphénols (mg GAE/g)	Poly = 0.436105*Time + 0.643131*power + 0.0432491*Time*power + 8.688	<b>0.052<sup>b</sup></b>	non-significant
<b>Hexane</b>	Rendement de l'extraction (%)	Yield = 0.0272003*Time + 0.102489* power + 0.00453531*Time* power + 3.676	<b>0.047<sup>a</sup></b>	significant
	Taux de polyphénols (mg GAE/g)	Poly = 0.0305502*Time + 0.340019*power + 0.00626155*Time*power +1.006	<b>0.052<sup>b</sup></b>	non-significant

<sup>a</sup>: La probabilité de la régression est significative à 95 %. Le modèle est statistiquement bon.

<sup>b</sup>: La probabilité de la régression n'est pas significative à 95 %. Le modèle est statistiquement faible.

#### Effets des facteurs sur les réponses

Le principe de fonctionnement du montage d'extraction de type soxhlet est basé sur la régénération du solvant organique après chaque siphonage. Le transfert de matière entre la phase solide (plante broyée) et la phase liquide (solvant organique) se fait au cours du siphonage (remplissage de la cartouche contenant la poudre de plante avec le solvant condensé préalablement évaporé), ce qui fait des caractéristiques de cette étape (le nombre de siphonages et la durée de chacun) un élément décisif pour expliquer les résultats obtenus. Le nombre des siphonages et la durée de chaque siphonage sont étroitement liés

aux facteurs que nous avons étudié, à savoir le temps d'extraction, la force de chauffage et la nature du solvant utilisé [401].

La durée de chaque siphonage est indépendante du temps d'extraction et elle dépend exclusivement de la force de chauffage et de la nature du solvant utilisé. Cette durée diminue lorsque la force du chauffage augmente et la température d'évaporation du solvant diminue. Le nombre de siphonages augmente lorsque la durée de chaque siphonage diminue, donc augmente proportionnellement avec la force du chauffage et le temps d'extraction. Par contre ce nombre diminue lorsque la température d'évaporation du solvant augmente.

Lors de l'utilisation de l'éthanol ou l'hexane comme solvant d'extraction, l'effet de la force de chauffage sur les réponses est plus important que celui du temps d'extraction. Ce résultat peut être expliqué par l'augmentation du nombre de siphonages. La régénération très rapide du solvant d'extraction permet de solubiliser rapidement les molécules bioactives à partir de la matrice végétale. Effectivement, lorsque le contact entre les deux phases dure très longtemps, le solvant organique est saturé et le transfert des molécules bioactives de la matrice végétale vers le solvant devient impossible [402,403].

Lors de l'utilisation du dichlorométhane comme solvant d'extraction, l'effet de la force de chauffage sur le taux de polyphénols était plus important que celui du temps d'extraction, c'est les mêmes résultats que ceux qui ont été obtenus avec les deux autres solvants, mais pour le rendement de l'extraction, le temps d'extraction présente un effet positif plus important que celui de la force de chauffage. Ce résultat peut être expliqué par la très faible solubilité des molécules bioactives dans le dichlorométhane qui est un solvant polaire aprotique au contraire des deux autres solvants. Effectivement, l'éthanol peut être utilisé pour l'extraction des polyphénols de la sauge [404], l'hexane pour l'extraction des huiles essentielles de la sauge [404], mais le dichlorométhane solubilise une très faible quantité de molécules bioactives [405].

#### Prédiction des résultats et modélisation mathématique

Les modèles obtenus nous permettent de prédire les réponses pour les valeurs proposées des facteurs, la significativité des valeurs obtenues dépendra de la précision des modèles obtenus. Selon les valeurs de P déterminées par l'analyse ANOVA (tableau 6.5) tous les modèles mathématiques sont statistiquement significatifs ( $P < 0.05$ ) à l'exception de deux

modèles qui représentent le taux de polyphénols extraits pour le dichlorométhane et l'hexane ( $P > 0.05$ ). La faiblesse statistique des deux modèles mathématiques concernant le taux de polyphénols extraits par le dichlorométhane et l'hexane sont dus à la très faible solubilité des polyphénols dans l'hexane et le dichlorométhane [405,406].

### Coefficients de corrélation ( $R^2$ ) et de prédiction ( $Q^2$ )

A partir de la figure 6.5, nous pouvons déduire que le modèle obtenu à une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux (les valeurs de  $R^2$  se rapprochent de 1) et nous avons la possibilité de prédire des résultats en dehors des intervalles imposés pour les facteurs (les valeurs de  $Q^2$  sont supérieures à 0.5). Ceci dit, il est difficile de prédire des résultats en dehors des intervalles imposés pour le rendement de l'extraction en utilisant l'hexane comme solvant (la valeur de  $Q^2$  est inférieure à 0.5).

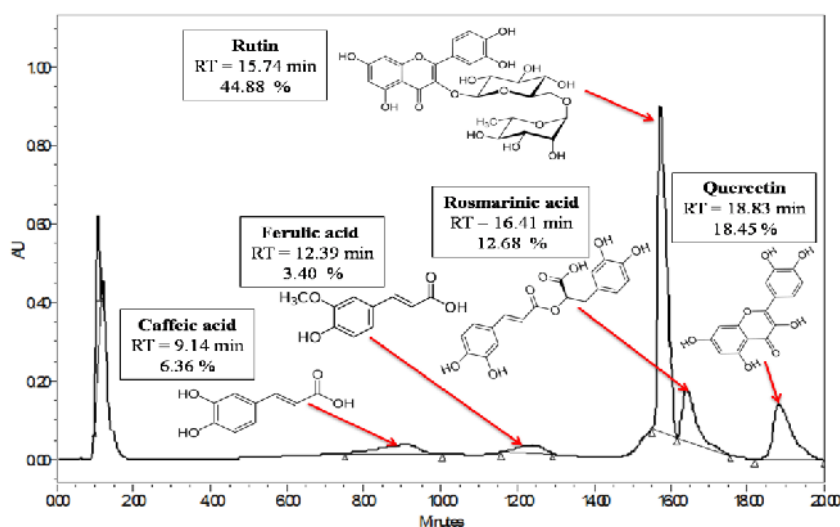
#### 6.3.1.2. Extraction des molécules bioactives volatiles

Le rendement de l'extraction est de 2.07 % après 3 heures de chauffage du système Clevenger utilisé.

#### 6.3.2. Caractérisation des molécules bioactives de *Salvia officinalis*

##### 6.3.2.1. Caractérisation des molécules bioactives non-volatiles par HPLC/UV-DAD

Le chromatogramme HPLC de l'extrait obtenu est donné dans la figure 6.6, les principales molécules extraites sont la rutine (44.88%), la quercitrine (18.83%), l'acide rosmarinique (12.68%), l'acide caféique (6.36%) et l'acide ferulique (3.40%).

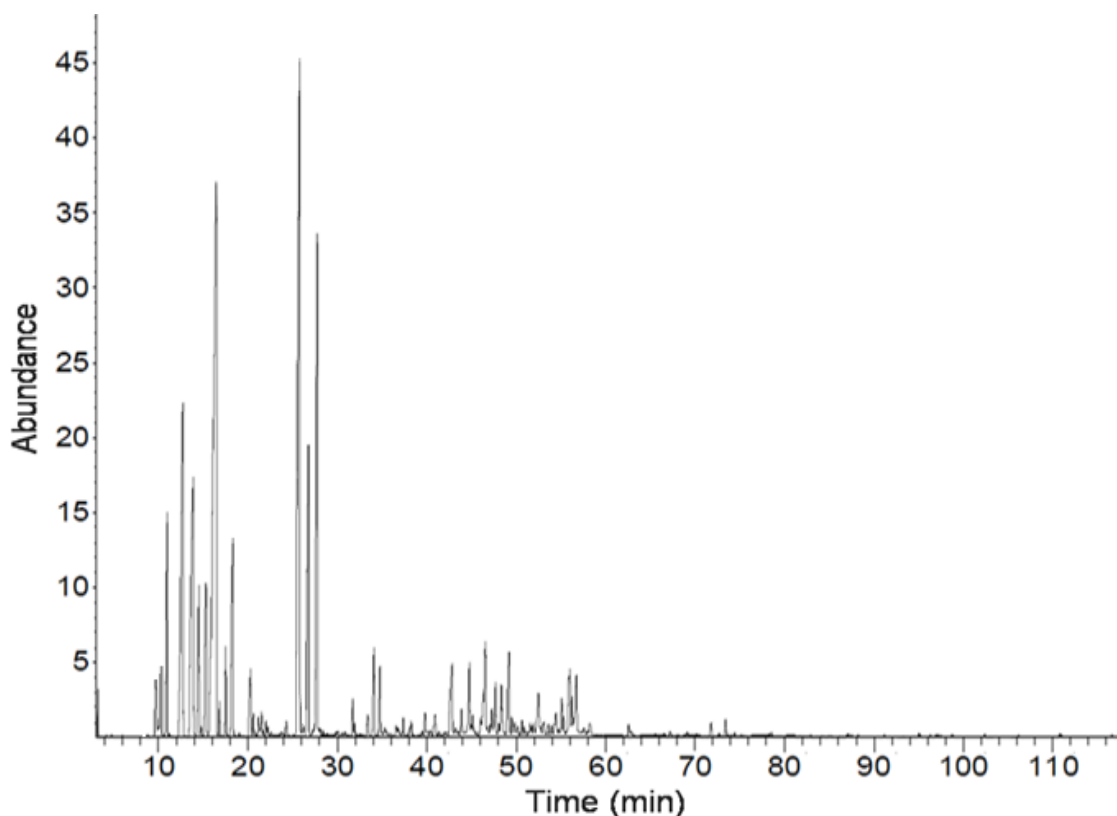


**Figure 6.6 :** Le chromatogramme HPLC de l'extrait de *Salvia officinalis*.

### 6.3.2.2. Caractérisation des molécules bioactives volatiles par CG/SM

Le tableau 6.6 représente la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*. Cette analyse (figure 6.7) a permis l'identification et la quantification de 48 composés qui correspondent à un total de 97.27% de l'huile obtenue. Les composés majoritaires de cette huile essentielle sont l' $\alpha$ -Thujone (23.21%), le 1,8-Cineole (14.17%) et le Camphor (11.02%).

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* en Algérie se limite à trois travaux effectués au centre de l'Algérie (Alger) [407] ou à l'est (Batna [408] et El-Kala [409]). Lors de cette étude nous avons contribué pour la première fois à identifier la composition chimique de l'huile essentielle de sauge dans la région de Kabylie. Les composés majoritaires de cette huile essentielle sont l' $\alpha$ -Thujone, le 1,8-Cineole et le Camphor ; les résultats obtenus dans notre travail se concordent avec ceux obtenus en Algérie [407-409], en Serbie [410], au Monténégro [411] et en Albanie [412], toutefois certaines études montrent d'autres composés majoritaires additionnels à ceux déjà cités comme l' $\alpha$ -Humulene en Libye [413], le Borneol au Brésil [414] ou encore le  $\beta$ -Thujone en Égypte [415] et en France [416].



**Figure 6.7** : Le chromatogramme CG/SM de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*.



**Tableau 6.6** : Composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*.

N°	Composés <sup>a</sup>	%	IR <sup>b</sup>
1	Tricyclene	0.71	927
2	$\alpha$ -Thujene	0.94	935
3	$\alpha$ -Pinene	4.67	939
4	Camphene	7.01	954
5	$\beta$ -Pinene	5.03	979
6	$\beta$ -Myrcene	2.59	991
7	$\alpha$ -Phellandrene	2.01	1003
8	$\delta$ -3-Carene	t	1011
9	Limonene	1.6	1029
<b>10</b>	<b>1.8-Cineol</b>	<b>14.17</b>	<b>1022</b>
11	(Z)- $\beta$ -Ocimene	0.46	1037
12	(E)- $\beta$ -Ocimene	0.05	1049
13	$\gamma$ -Terpinene	3.04	1060
14	p-mentha-3,8-diene	t	1072
15	2-Nonanone	0.49	1079
16	$\alpha$ -Terpinolene	0.23	1089
<b>17</b>	<b><math>\alpha</math>-Thujone</b>	<b>23.21</b>	<b>1101</b>
18	$\beta$ -Thujone	8.62	1112
<b>19</b>	<b>Comphor</b>	<b>11.02</b>	<b>1121</b>
20	Borneol	0.47	1196
21	Bornyl acetate	0.69	1285
22	2-Undecanone	0.63	1293
23	$\alpha$ -Cubebene	t	1340
24	$\gamma$ -Pyronene	0.04	1345
25	Ylangene	0.09	1371
26	$\alpha$ -Copaene	0.01	1377
27	$\beta$ -Elemene	0.57	1391
28	Benzyl isovalerate	0.02	1395
29	$\beta$ -Caryophyllene	1.42	1421
30	Aromadendrene	t	1441
31	$\alpha$ -Amorphene	0.51	1442
32	Geranyl acetone	0.18	1455
33	$\alpha$ -Humulene	1.04	1457
34	Germacrene-D	0.09	1480
35	Valencene	0.59	1482
36	$\alpha$ -Muurolene	0.62	1499
37	(E,E)- $\alpha$ -Farnesene	0.86	1507
38	$\delta$ -Cadinene	0.19	1523
39	Cadina-1.4-diene	0.25	1532
40	$\alpha$ -Cadinene	0.23	1539
41	$\alpha$ -Calacorene	0.3	1546
42	Nerolidol	0.21	1561
43	Caryophyllene oxide	0.54	1583
44	T-Muurolol	0.62	1642
45	$\beta$ -Eudesmol	0.34	1651
46	$\alpha$ -Cadinol	0.78	1654
47	Benzyl Benzoate	t	1753
48	Hexahydrofarnesyl acetone	0.13	1844
<b>Total des composés identifiés</b>		<b>97.27</b>	
Non identifié		2.73	

<sup>a</sup>: Indices de rétention par rapport à la série n-alcanes (C8-C24) calculés sur colonne capillaire non polaire de type HP5MS.

<sup>b</sup>: Nomenclature des composés identifiés dans l'huile essentielle.

### 6.3.3. Évaluation de l'activité antidiabétique in-vivo des extraits de *Salvia officinalis*

#### 6.3.3.1. Suivi de la glycémie et du poids corporel des rats avant sacrifice

Les résultats de l'évolution des glycémies des animaux durant toute la période du traitement (a J0, J7, J14, J21 et J28) sont donnés dans le tableau 6.7.

**Tableau 6.7 :** Évolution des glycémies des animaux durant toute la période du traitement.

Groupes	Glycémies (mg/dl)		
	J0	J14	J28
G1	77.67±2.17	78.67±2.62	80.5±2.28
G2	412.33±13.92	406.17±13.6	401.33±14.56
G3	411.5±21.24	205.83±17.58	119.83±4.85
G4	412.67±7.05	232±7.28	130.17±9.46
G5	412±15.39	241.5±9.67	149.5±8.58

Les résultats de l'évolution des poids corporels des animaux durant toute la période du traitement (a J0, J7, J14, J21 et J28) sont donnés dans le tableau 6.8.

**Tableau 6.8:** Évolution des poids corporels des animaux durant toute la période du traitement.

Groupes	Poids corporels (g)			
	J0	J14	J28	J28-J0
G1	222.33±2.22	228.17±1.55	235.5±2.35	13.17±2.53
G2	222.17±1.96	214.17±1.01	203.5±2.54	-18.67±2.77
G3	223.67±0.92	222.83±1.71	221.66±1.48	-2.01±1.03
G4	223.5±1.34	222.67±2.6	217.66±2.46	-5.84±1.5
G5	223.83±1.01	221.83±2.24	215.16±2.34	-8.67±1.62

### 6.3.3.2. Estimation des paramètres antidiabétiques

Les résultats des quatre paramètres antidiabétiques (la glycémie, l'hémoglobine glyquée Hb1Ac, insulinémie et dosage du glycogène hépatique), sont donnés dans le tableau 6.9.

**Tableau 6.9** : Les paramètres biochimiques des animaux après 28 jours de traitement.

Groupes	HG (%)	Glycogène (mg/g de foie)	Insuline (µg/l)
G1	6.5±0.34	74.83±3.36	15.67±1.43
G2	12.17±1.14	25.5±2.84	5.33±0.76
G3	6.67±0.49	61.5±6.86	11.83±1.58
G4	7.17±1.17	63.17±10.02	15.17±2.03
G5	7.83±0.87	54.33±8.93	10.5±1.31

Les résultats obtenus après l'évaluation de l'activité antidiabétique in-vivo de *Salvia officinalis* ont montré que l'extrait non volatil présente un plus grand pouvoir thérapeutique que l'huile essentielle.

Le traitement a permis une évolution normale du poids corporel des animaux, une glycémie standard tout au long de la période expérimentale.

Des analyses biochimiques plus approfondies ont montré que le métabolisme glucidique était bien contrôlé chez les rats diabétiques traités aux extraits de sauge. Effectivement, ces molécules bioactives agissent sur la régulation de la glycémie par le contrôle des fonctions hépatiques (glycogène) et pancréatiques (insuline).

Cette étude confirme encore une fois les résultats de l'activité antidiabétique in-vitro de *Salvia officinalis* qui ont été obtenus auparavant dans le chapitre 5 ainsi que dans la bibliographie [417-420]. De plus, elle nous renseigne d'avantage sur le mécanisme d'action très complexe des molécules bioactives composant les extraits de cette plante.

#### 6.4. Conclusion

L'éthanol est le solvant organique le plus adéquat à l'extraction des molécules bioactives des feuilles de *Salvia officinalis*. La nature apolaire protique de ce solvant permet la solubilisation efficace et rapide des polyphénols qui sont la famille dominante des métabolites secondaires synthétisés par la plante étudiée. L'augmentation de la force de chauffage permet d'obtenir la plus grande quantité de molécules bioactives dans un temps d'extraction optimal et en consommant le moins d'énergie possible.

L'extrait éthanolique de *Salvia officinalis* est composé principalement de polyphénols (acide caféique, acide rosmarinique, quercitine et rutine), tandis que l'huile essentielle est principalement composée d' $\alpha$ -Thujone (23.21%), de 1,8-Cineole (14.17%) et de Camphor (11.02%).

L'activité antidiabétique in-vivo de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* a montré une normalisation du poids corporel et des paramètres biochimiques des rats diabétiques, l'extrait éthanolique a montré une plus grande activité antidiabétique comparé à l'huile essentielle.

## CHAPITRE 7

### FORMULATION DE NANOSYSTEMES POUR LA DELIVRANCE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *SALVIA OFFICINALIS*

#### 7.1. Introduction

Les nanoéponges sont une nouvelle génération de nanoparticules composées de polymères ayant des propriétés gonflables. Ces nanomatériaux ont la capacité d'absorber des particules de manière sélective et surtout de pouvoir relarguer ces dernières de manière contrôlée en fonction des conditions du milieu externe [421]. A ce jour, très peu d'études ont été réalisées pour comprendre et détailler les mécanismes mis en jeu lors de l'utilisation de ces nanoéponges dans le domaine pharmaceutique pour la délivrance contrôlée des médicaments [422] ou dans le domaine de l'environnement pour le traitement ciblé de certains polluants [423].

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles ont toujours été utilisées dans la vie quotidienne pour la cuisine, la médecine traditionnelle et la parfumerie ; ce qui confère à ces bioproduits une garantie de qualité pour les consommateurs et une marque de vente pour les industriels. Les huiles essentielles sont utilisées dans les industries alimentaires [424], cosmétiques [425] et pharmaceutiques [426], mais le problème avec ces composés est leur instabilité dans les conditions environnementales comme la température, la lumière et l'oxygène de l'air [427]; c'est pour cela que différents types de nano/microsystèmes innovants ont été élaborés par les scientifiques, comme les nanoémulsions [428], les liposomes [429], les complexes d'inclusions [430], les nanocapsules [431], les microcapsules [432] et les films polymériques [433].

L'un des problèmes majeurs rencontrés lors de l'utilisation des huiles essentielles pour le traitement de certaines pathologies est leur caractère lipophile qui diminue leurs propriétés de diffusion dans les milieux biologiques qui sont aqueux. A cet effet, nous avons proposé une formulation permettant de modifier ces propriétés de diffusion et de solubilité de notre huile essentielle étudiée (huile essentielle de *Salvia officinalis*). Cette formulation est basée sur la mise au point de nanoparticules composées de plusieurs écrans moléculaires (les  $\beta$ -cyclodextrines) liées entre elles par un agent de réticulation.

En premier lieu, nous avons élaboré de nouveaux nanomatériaux à base de  $\beta$ -cyclodextrine et de 1,4-Naphtalène acide di-carboxylique en utilisant la méthode de polycondensation. L'optimisation des paramètres de préparation des nanoéponges a été réalisée en utilisant un plan factoriel complet à deux niveaux et deux facteurs (les deux facteurs choisis sont : la durée de réaction et le ratio entre les deux réactifs).

Les nanomatériaux ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, diffraction de rayons X sur poudre, la BET et la microscopie électronique à balayage.

Ensuite, nous avons encapsulé l'huile essentielle dans les nanomatériaux préalablement élaborés par leur nanodispersion dans l'eau, le système dispersé a été stabilisé en augmentant la polarité de la phase dispersante par l'ajout d'un polyélectrolyte (la gomme xanthane) et un acide aminé (l'arginine). La nanodispersion a été caractérisée par la détermination de la granulométrie, le potentiel zêta, la viscosité, la turbidité et le taux d'huile essentielle encapsulée. Afin de confirmer l'efficacité des nouveaux nanomatériaux synthétisés nous avons réalisé une étude de stabilité qui a duré 90 jours durant lesquels les propriétés physicochimiques (la granulométrie, le potentiel zêta, la viscosité, la turbidité et le taux d'huile essentielle encapsulée) de cette nanoémulsion ont été suivies.

Enfin, la caractérisation pharmacologique a été réalisée par l'étude de la cinétique de dissolution in-vitro et l'évaluation de l'effet de la formulation sur l'activité antidiabétique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* in-vivo sur des rats wistar par la comparaison entre le traitement direct (huile essentielle) et la formulation (nanoémulsion).

## 7.2. Matériels et méthodes

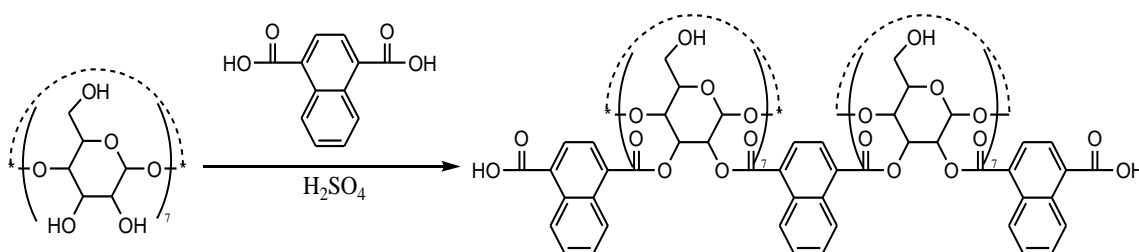
La  $\beta$ -cyclodextrine (BCD), l'acide 1,4-naphtalène-dicarboxylique (NDCA), la gomme de xanthane, l'arginine et la STZ ont été obtenus auprès de sigma-Aldrich. L'huile essentielle de *Salvia officinalis* a été extraite dans notre laboratoire par hydrodistillation à l'aide d'un appareil dus Clevenger et analysée par chromatographe GC / MS, ses principaux composés chimiques sont: 1,8-Cinéole (22.1%),  $\alpha$ -Thujone (29.4%) et Camphor (27.9%). Tous les autres matériaux utilisés étaient de qualité pharmacopée.

## 7.2.1. Préparation et caractérisation des nanoéponges BCD-NDCA-NS

### 7.2.1.1. Préparation des nanoéponges BCD-NDCA-NS

#### Procédure générale

Les BCD-NDCA-NS ont été préparés par une réaction de polycondensation de la BCD avec le NDCA en présence de l'acide sulfurique comme catalyseur. En bref, le NDCA et l'acide sulfurique à 98% (2 gouttes) ont été ajoutées à 25ml de solution aqueuse de BCD (200mmol/l) sous agitation à 100°C pendant toute la durée de la réaction [434]. La réaction de synthèse des BCD-NDCA-NS est montrée dans la figure 7.1.



**Figure 7.1** : La réaction de synthèse des nanoéponges.

#### Optimisation des paramètres de préparation des nanoéponges

Dans cette étude, on a utilisé un plan d'expérience factoriel  $2^2+1$  avec deux niveaux, deux facteurs (X1 et X2) et un point au centre, les facteurs étant le rapport BCD:NDCA (1:5 - 1:10, X1) et le temps de réaction (24h-48h, X2). La réponse étudiée est le rendement de la réaction (Y), calculé par l'équation (7.1):

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{m_{\text{BCD-NDCA-NSs}}}{m_{\text{BCD}} + m_{\text{NDCA}}} \times 100 \quad (7.1)$$

Où : « $m_{\text{BCD-NDCA-NS}}$ » est la masse de BCD-NDCA-NS collectée en fin de réaction, « $m_{\text{BCD}}$ » et « $m_{\text{NDCA}}$ » sont respectivement les masses initialement introduites de BCD et de NDCA.

Le nombre d'expériences nécessaires pour réaliser cette conception expérimentale est donné par l'équation (6.1). La matrice expérimentale pour la préparation des nanoéponges est donnée dans le tableau 7.1.

La conception du modèle mathématique montrant la relation entre la réponse « Y » et les facteurs étudiés est donnée par l'équation (6.2) [386].

Les résultats expérimentaux ont été analysés avec le logiciel MODDE 6. L'appréciation globale du modèle mathématique, définissant la relation entre les facteurs et la réponse, a été évaluée en utilisant le coefficient de corrélation  $R^2$  et le coefficient de prédiction  $Q^2$ .

**Tableau 7.1** : Matrice expérimentale pour la préparation des nanoéponges.

Expériences	Facteur 1 (le ratio BCD:NDCA)	Facteur 2 (le temps de la réaction)
1	+1	+1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	-1	-1
5	0	0

#### 7.2.1.2. Caractérisation des nanoéponges BCD-NDCA-NS

##### Spectroscopie FTIR

Les spectres FTIR de la BCD, le NDCA et les BCD-NDCA-NS ont été enregistrés à température ambiante sur un spectrophotomètre de type Tensor 27 FT-IR.

##### Microscopie électronique a balayage (MEB)

Un microscope électronique à balayage environnemental Le Philips XL30 ESEM FEG a été utilisé pour la détermination des caractéristiques de surface des BCD-NDCA-NS par rapport au BCD naturel, les échantillons de poudre ont été soumis à une énergie de faisceau de 30 kV.

##### BET

Un analyseur de surface ASAP 202 MICROMIRITICS a été utilisé pour la détermination des surfaces spécifiques des BCD-NDCA-NS par rapport au BCD naturel par les mesures de l'isotherme d'adsorption d'azote Brunnauer, Emmet et Teller (BET).

##### La diffraction de rayons X (XRD)

Les diffractogrammes des rayons X de la BCD naturelle et des BCD-NDCA-NS ont été obtenus en utilisant un diffractomètre à rayons X Philips PW 3710 équipé du logiciel informatique Xpoder.



## 7.2.2. Préparation et caractérisation des nanoémulsions SEO-NE

### 7.2.2.1. Préparation des nanoémulsions SEO-NE

Dans la préparation de SEO-NE, 2,5ml de SEO (Huile essentielle de sauge) sont dispersés dans de l'eau bidistillée (à 5% p/p) contenant la BCD ou les BCD-NDCA-NS, l'arginine et la gomme xanthane en utilisant un Ultra-Turrax (T25 IKA Labortechnik, Allemagne) à 24000 tr/min pendant 5 minutes pour former une émulsion primaire. Ensuite, l'émulsion primaire a été soumise à une sonication à l'aide d'une sonde à ultrasons (Ultrasonics, USA) à une fréquence de 20kHz et une puissance de 750W. L'amplitude des ultrasons est de 40%, le diamètre de la sonde est de 13mm. Tous les codes des formulations SEO-NE avec leurs compositions sont donnés dans le tableau 7.2.

**Tableau 7.2** : Composition des nanoemulsions SEO-NE.

Code des formulations	Huile essentielle (SEO)	$\beta$ -cyclodextrine	BCD-NDCA-NSs	Arginine	Gomme xanthan	Eau
NE1	5%	5%	-	5%	1%	84%
NE2	5%	-	5%	5%	1%	84%
NE 3	5%	5%	-	-	-	90%
NE 4	5%	-	5%	-	-	90%
NE 5	5%	-	-	-	-	95%

### 7.2.2.2. Caractérisation des nanoémulsions SEO-NE

#### La taille des particules

La distribution granulométrique des gouttelettes a été déterminée à l'aide d'un granulomètre laser de type Nanotrak TM250 (Microtrac Inc, PA, USA). La répartition des tailles de gouttelettes a été caractérisée en termes de diamètre moyen de la distribution volumique en mesurant la lumière diffusée (173°), l'échantillon a été dilué à un rapport de 1:100 avec de l'eau bidistillée.

Le diamètre moyen de la distribution volumique « MV » a été calculé par l'équation suivante (7.2):

$$MV = \frac{\sum V_i d_i}{\sum V_i} \quad (7.2)$$

Où « $V_i$ » est le pourcentage de volume entre les tailles de gouttelettes et « $d_i$ » le diamètre des gouttelettes.

### Le Potentiel $\zeta$

Les potentiels zêta de NE1 et NE2 ont été déterminés à l'aide des instruments de l'onde Nanotracs (Microtracs Inc, PA, USA) et calculés en utilisant l'équation de Smoluchowski (7.3):

$$\zeta = \frac{4\pi\eta}{\varepsilon} \frac{v}{L} \quad (7.3)$$

Où « $U$ » est la tension et « $L$ » est la distance entre deux électrodes, « $\varepsilon$ » et « $\eta$ » sont respectivement la constante diélectrique et la viscosité de l'eau pure et « $v$ » la vitesse mobile des gouttelettes SEO dans le champ électrique.

### Viscosité

Les viscosités de NE1 et NE2 ont été mesurées en utilisant un viscosimètre Brook Field (pour la gamme de viscosité LV-II), le taux de cisaillement appliqué a été fixé à 170 s<sup>-1</sup>. Toutes les expériences ont été effectuées à 25°C.

### Turbidité

Les turbidités de NE1 et NE2 ont été déterminées en mesurant l'absorbance des échantillons dilués 1:100 avec de l'eau bidistillée à 600nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis Agilent 8453.

### La quantité de l'huile essentielle contenue dans les SEO-NE

L'extraction de l'huile essentielle totale à partir des SEO-NE a été réalisée par l'hexane ; 1ml de NE, 20ml d'eau distillée et 10ml d'hexane ont été mis dans des tubes de verre. Les systèmes préparés ont été agités par un agitateur à ultrasons pendant 20 minutes à 60°C en utilisant un bain ULTRASONIC X-TRA 30H, ensuite la phase organique (hexane + SEO) a été séparée de la phase aqueuse par centrifugation à 4500 tr/min pendant 10 minutes. La teneur en SEO dans les NE a été déterminée par le dosage spectroscopique de SEO dans la phase organique extraite précédemment en utilisant un spectrophotomètre Agilent 8453 UV-Vis à 256nm.

Le contenu SEO dans les NE a été calculé en utilisant l'équation 7.4:

$$\text{La contenance en SEO (\%)} = \frac{\text{SOE contenu dans 1ml de NE}}{0.05} \times 100 \quad (7.4)$$

### 7.2.3. Étude de la stabilité physicochimique de la formulation

Après la préparation des nanoémulsions NE1 et NE2, elles ont été stockées à 4°C, 25°C et 50°C. Les échantillons ont été retirés périodiquement pour la détermination de leurs caractéristiques physico-chimiques (granulométrie, potentiel zêta, viscosité, turbidité et teneur en SEO) selon les protocoles décrits dans la section 7.2.2.2.

L'évolution de la teneur en SEO dans les EN lors du stockage à différentes températures a été déterminée par l'équation d'Avrami (7.5) [435-437]:

$$R = e^{-(kt)^n} \quad (7.5)$$

Où « R » est la rétention de SEO, « t » est le temps de stockage, « k » est la constante du taux de libération et la valeur de « n » représente le mécanisme de libération décrit par Avrami.

### 7.2.4. Étude de la cinétique de dissolution in-vitro

La dissolution in vitro de toutes les nanoémulsions a été étudiée par la méthode de dialyse membranaire [438] dans un appareil de dissolution Electrolab TDT-08L utilisant un agitateur à palette. 2ml de la formulation ont été placés dans le sac de dialyse et introduits dans un récipient de dissolution; 250ml de tampon phosphate pH 7,4 ont été utilisés comme milieu de dissolution à 50 tr/min et à 37±0,5°C. 5ml d'échantillon de milieu de dissolution ont été retirés à divers intervalles de temps et analysés en mesurant l'absorbance à 256nm en utilisant un spectrophotomètre Agilent 8453 UV-Vis.

### 7.2.5. Évaluation de l'activité antidiabétique in-vivo

#### 7.2.5.1. Animaux

Des rats Wistar mâles (210 ± 10g), âgés de 4 à 6 semaines, ont été mis dans des cages en polypropylène, à 25°C avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Ces rats ont été divisés en cinq groupes de 6 rats chacun.

### 7.2.5.2. Induction du diabète

Ces rats ont été soumis à un régime alimentaire standard, jeûné pendant 24h puis injectés par voie intrapéritonéale de 50mg/kg de streptozotocine [391,392] 10 à 14 jours avant l'étude pour induire le diabète.

### 7.2.5.3. Conception expérimentale

Cette étude consiste en l'administration d'une dose unique de traitement pour les cinq groupes de rats diabétiques (tableau 7.3). La glycémie à jeun a été évaluée à l'aide d'un glucomètre (free-style®).

Les traitements ont été administrés par gavage intragastrique avec une dose unique de 100 mg/kg, ensuite la glycémie a été déterminée à différents intervalles (1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 et 24h). La réponse hypoglycémique a été évaluée en pourcentage de diminution de la glycémie calculée comme suit (équation 7.6):

$$\% \text{ de diminution BGL} = \frac{\text{BGL à } t_0 - \text{BGL à } t}{\text{BGL à } t_0} * 100 \quad (7.6)$$

Les quatre paramètres pharmacocinétiques pris en compte sont:

- 1- Pourcentage maximal de diminution du taux de glucose dans le sang.
- 2- Temps de réponse maximal.
- 3- Temps de demi-vie (le temps correspondant à la moitié du pourcentage maximal de diminution du taux de glucose dans le sang).
- 4- Diminution de la surface de la glycémie (correspond à la surface de l'intégral de la courbe BGL en fonction du temps, calculée selon la règle trapézoïdale).

**Tableau 7.3** : Conception expérimentale de l'activité antidiabétique in-vivo.

Les groupes d'animaux	Induction du diabète par la STZ	Traitement
Groupe 1: physiologique	Non	-
Groupe 2: témoin négatif	Oui	-
Groupe 3	Oui	SEO (100mg/kg)
Groupe 4	Oui	NE1 (équivalent de 100 mg/kg SEO)
Groupe 5	Oui	NE2 (équivalent de 100 mg/kg SEO)

#### 7.2.5.4. Étude histopathologique du pancréas

Après 15 jours d'expérimentation, les animaux ont été sacrifiés par décapitation sous anesthésie au pentobarbital (40mg/kg) et les pancréas des différents groupes ont été prélevé et fixé dans le formol à 10%, des coupes de paraffine (5 $\mu$ m d'épaisseur) ont subi une coloration l'hématoxyline/éosine [439].

#### 7.2.5.5. Analyses statistiques

L'étude statistique pour la comparaison entre les résultats des différents groupes de rats a été réalisée par l'analyse ANOVA en utilisant le test de Student. Les différences sont dites significatives pour des valeurs de  $P < 0.05$ , très significatives pour des valeurs  $P < 0.01$  et non-significatives pour des valeurs  $P > 0.05$ .

### 7.3. Résultats et discussions

#### 7.3.1. Préparation et caractérisation des nanoéponges

##### 7.3.1.1. Préparation des nanoéponges

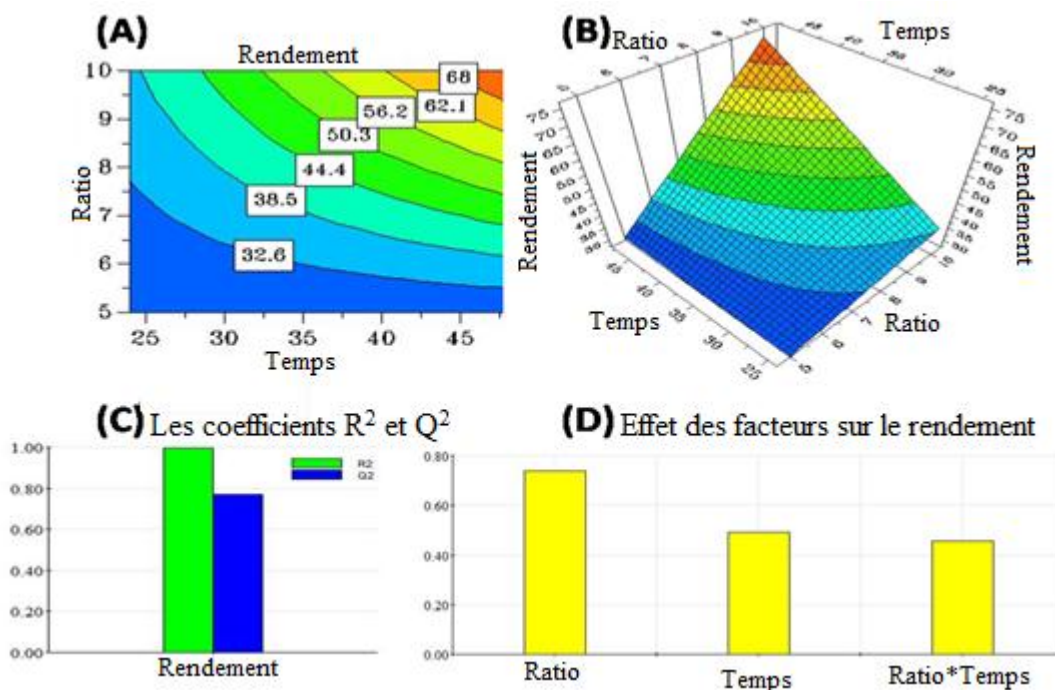
##### Optimisation des paramètres de synthèse des BCD-NDCA-NS par conception expérimentale

Les valeurs des rendements des réactions de toutes les expériences ont été données dans le tableau 7.4. L'expérience 1 représente le rendement de réaction le plus élevé (74.33%), toutes les BCD-NDCA-NS synthétisées sont solubles dans l'eau.

Les données collectées ont été analysées par MODDE 6 afin de trouver une relation entre les facteurs (X1 et X2) et la réponse (Y).

**Tableau 7.4** : Matrice des facteurs et des réponses.

Expériences	Le ratio BCD:NDCA	Temps de réaction	Rendement (%)	Solubilité dans l'eau
1	1:10	48 h	74.33	Soluble
2	1:5	48 h	28.38	Soluble
3	1:10	24 h	37.96	Soluble
4	1:5	24 h	27.14	Soluble
5	2:15	36 h	39.67	Soluble



**Figure 7.2 :** (A) contours et (B) surface de réponses permettant de prédire les rendements de la réaction ; (C) les coefficients  $R^2$  et  $Q^2$  ; (D) effet des facteurs sur le rendement.

#### Effet des facteurs sur le rendement de la réaction

Les relations entre les facteurs et le rendement de la réaction (réponse Y) peuvent être examinées en traçant les courbes d'isorendement (contour) pour le rendement de la réaction.

A partir des graphiques obtenus (Figure 7.2 A et B), l'augmentation progressive des deux facteurs permettent l'augmentation du rendement de la réaction de synthèse des BCD-NDCA-NS.

#### Modélisation mathématique

L'influence du facteur  $X_1$  (le ratio BCD:NDCA) est plus grande que l'influence du facteur  $X_2$  (temps de réaction) et de leur interaction, la figure 7.2 (D), montre des histogrammes représentant les coefficients du modèle mathématique élaboré.

Selon l'équation décrite dans la section 7.2.1.1. ci-dessus, le modèle mathématique obtenu est le suivant (équation 7.7):

$$Y = 41.496 + 14.192X_1 + 9.402X_2 + 8.782X_1X_2 \quad (7.7)$$

### Le coefficient de corrélation $R^2$ et de prédiction $Q^2$

La Figure 7.2 (C) montre les Histogrammes représentant le coefficient de corrélation  $R^2$  et de prédiction  $Q^2$  pour notre plan d'expériences, la valeur du coefficient de corrélation  $R^2$  est de 0.997 et la valeur du coefficient de prédiction  $Q^2$  est de 0.770. Les valeurs de  $R^2$  et de  $Q^2$  ont confirmé la très grande significativité de ces résultats et la bonne prédiction du rendement de la réaction à l'intérieur des intervalles expérimentaux.

#### 7.3.1.2. Caractérisation des nanoéponges

##### Spectroscopie FTIR

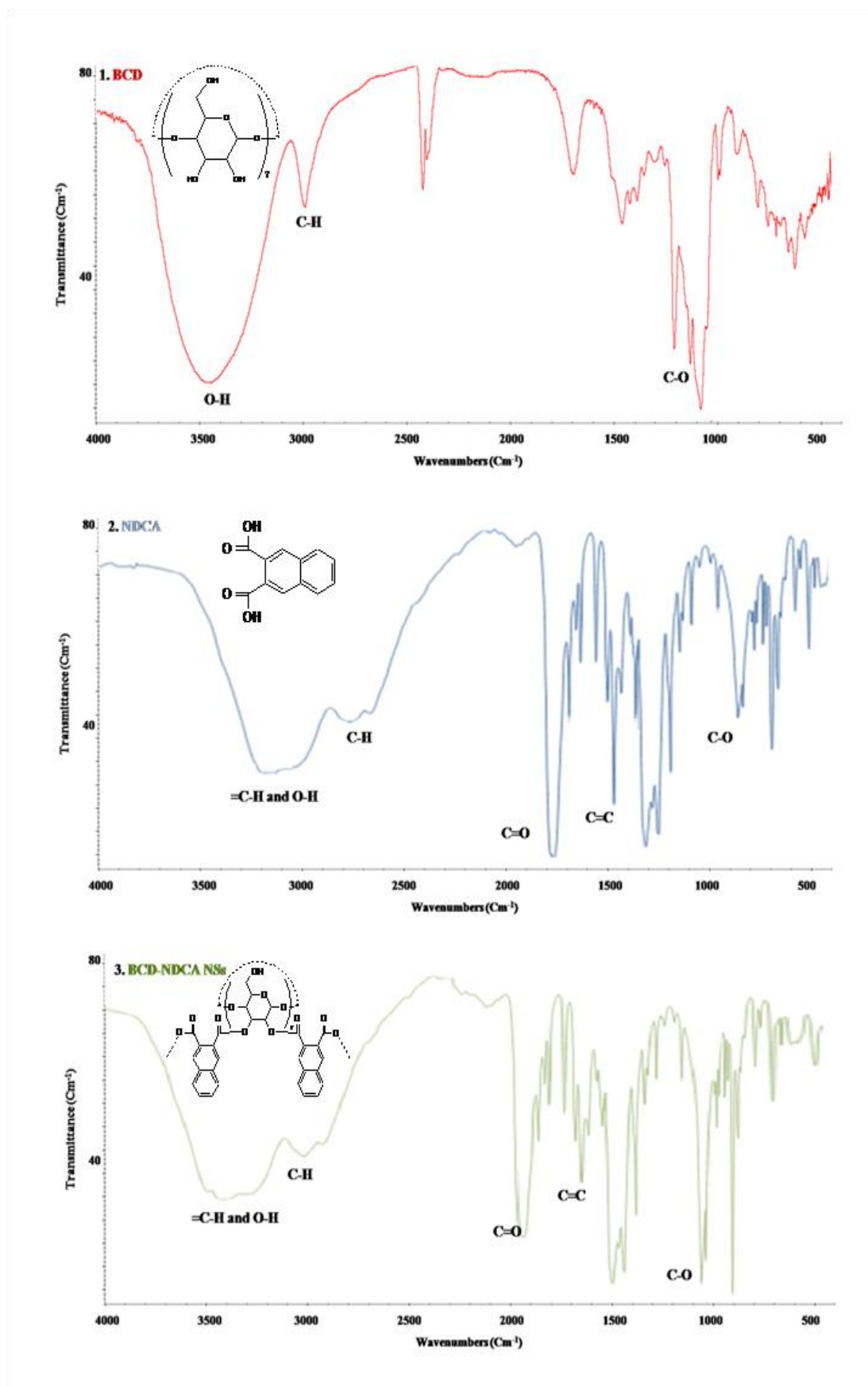
Les spectres FTIR de BCD, NDCA et BCD-NDCA-NS sont montrés sur la figure 3. Les pics apparaissant à 3417, 1938 et 1642-1597 $\text{cm}^{-1}$  approximativement dans le spectre FTIR des BCD-NDCA-NS (figure 7.3.3) sont caractéristiques des liaisons (= C-H), (C = O) et (C = C) respectivement, spécifiques du NDCA et qui n'existent pas dans la BCD, les pics représentatifs de ces liaisons du NDCA pur sont observés à 3154, 1811 et 1487-1619 $\text{cm}^{-1}$ , respectivement sur le spectre FTIR du NDCA pur (figure 7.3.2).

Les fonctions acides carboxyliques réagissent totalement (déplacement de la liaison de 3154 $\text{cm}^{-1}$  dans le NDCA pur à 3417  $\text{cm}^{-1}$  dans les BCD-NDCA-NS) selon la réaction décrite dans la figure 7.1, alors qu'il reste des fonctions alcool libre de la BCD.

L'apparition de deux bandes à 1063 $\text{cm}^{-1}$  (figure 7.3.3) caractéristique de la formation de la fonction ester (C-O) issu de la réaction de l'acide carboxylique aromatique du NDCA (bande caractéristique C-O à 919 $\text{cm}^{-1}$ , sur la figure 3.2) et de la fonction alcool primaire de la BCD (bande caractéristique C-O a 1089 $\text{cm}^{-1}$ , montré sur la figure 7.3 1).

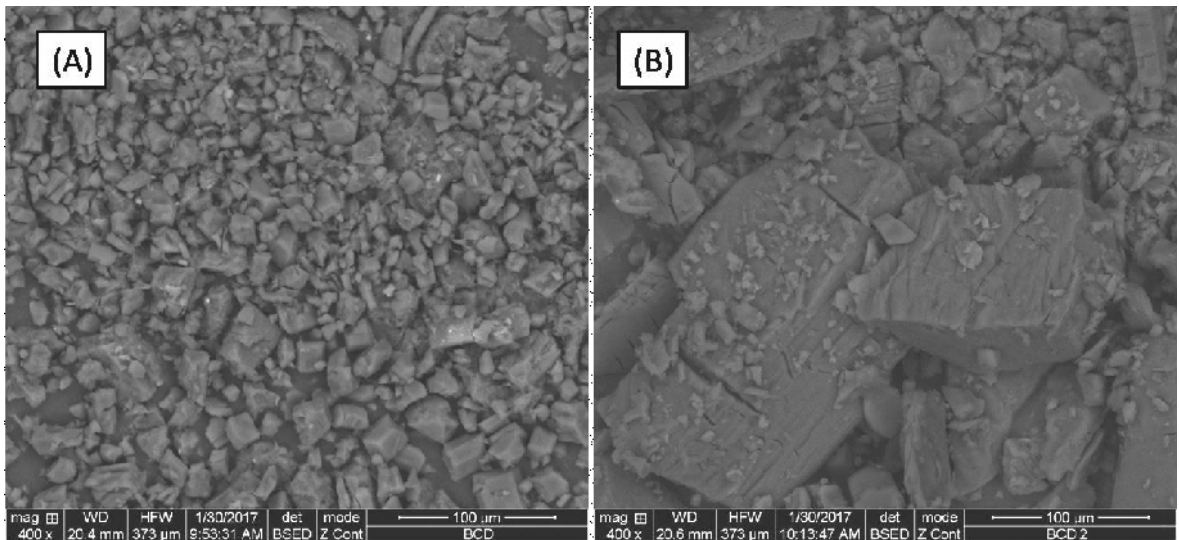
##### Analyses de surface par le MEB et la BET

Les micrographies par microscopie électronique à balayage de BCD (figure 7.4.A) et de BCD-NDCA-NS (figure 7.4.B) confirment la porosité de surface des nanoéponges. En effet, les BCD-NDCA-NS représentent plus de micropores que les BCD purs. Les résultats BET de BCD et BCD-NDCA-NS sont <0.01 et 22.64  $\text{m}^2/\text{g}$ , respectivement. Le volume des pores de BCD-NDCA-NS est de 7.89.10<sup>-3</sup>  $\text{cc/g}$  et leur rayon est de 8.7 Å.



**Figure 7.3:** Spectres FT-IR de la BCD (1), NDCA (2) et BCD-NDCA-NSs (3).



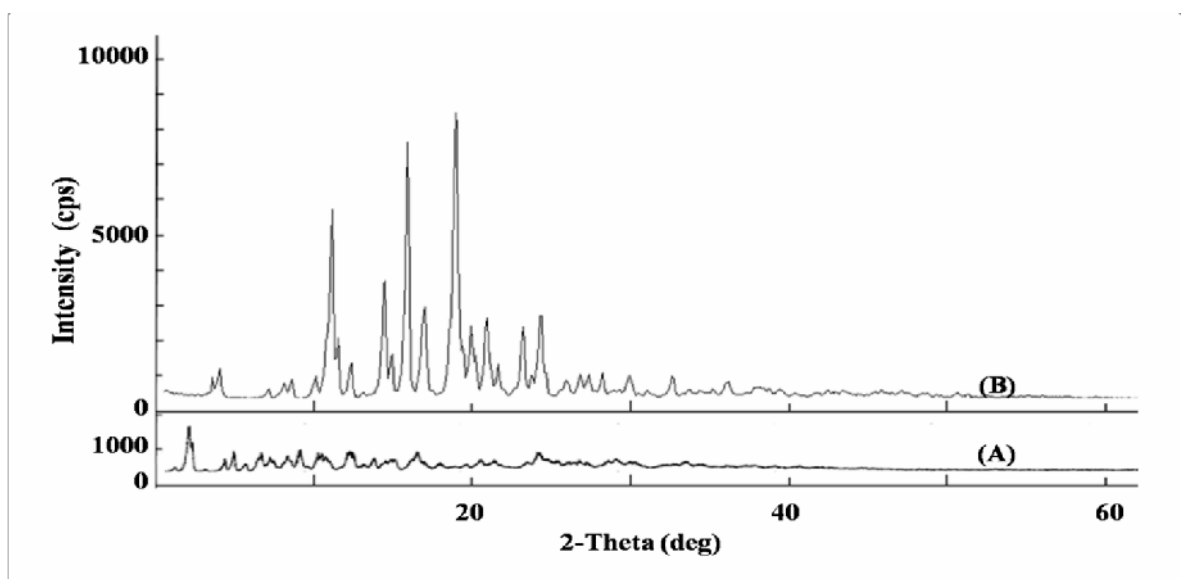


**Figure 7.4:** Microphotographies obtenues par MEB, (A) la BCD et (B) les NSS.

### Poudre XRD

Les diffractogrammes de rayons X sur poudre de BCD-NDCA-NS (figure 7.5.A) et de BCD naturel (figure 7.5.B) montrent clairement la réduction de la cristallinité entre le réactif et le produit.

La cristallinité de la BCD naturelle a diminué significativement après sa réticulation avec le NDCA pour la synthèse des BCD-NDCA-NS. Effectivement, la réduction du nombre de pics et de leurs intensités est attribuée à la formation de nouvelles phases solides avec une faible cristallinité et une grande solubilité dans l'eau.



**Figure 7.5 :** Diffractogrammes DRX des la BCD (B) et des NSS (A).

### 7.3.2. Préparation et caractérisation des nanoémulsions

Les caractéristiques physicochimiques des NE préparées (NE1 et NE2) sont données dans le tableau 7.5. Leur gouttelettes de petite taille leur confèrent un aspect translucide [440,441] ainsi qu'une résistance aux phénomènes de l'instabilité physique (floculation, crémage, sédimentation et coalescence) [442,443], les diamètres moyens des gouttelettes est de 219.1nm pour la NE1 est de 143.2nm pour la NE2. Les deux NE représentent la même teneur en huile essentielle. La NE1 représente un potentiel zeta, une viscosité et une turbidité inférieurs comparés à la NE2, ces différences peuvent être justifiées par la taille différente des deux NE (diminution du potentiel zêta, de la viscosité et de la turbidité lorsque la taille des particules diminue).

**Tableau 7.1:** Les caractéristiques physicochimiques des nanoémulsions préparées.

Caractéristiques	Nanoémulsions	
	NE1 (stabilisé par la $\beta$ -cyclodextrine)	NE2 (stabilisé par les nanoéponges)
Taille des particules (nm)	219.1	143.2
Potentiel $\zeta$ (mV)	36.2	38.8
Viscosité (Pa.S)	0.87	0.89
Turbidité (cm <sup>-1</sup> )	0.19	0.14
Taux d'huile essentielle encapsulée (%)	5%	5%

### 7.3.3. Étude de la stabilité physicochimique des formulations

#### 7.3.3.1. La taille des particules

L'évolution de la taille des gouttelettes des NE durant le stockage à 4°C, 25°C et 50°C sont présentés sur la figure 7.6.

La taille des particules initiale des NE1 et NE2 est de l'ordre de 219.1nm et 143.2nm respectivement, cette dernière augmente durant le stockage jusqu'à atteindre 402.6, 262.8 et 952.6nm à 4°C, 20°C et 40°C respectivement. Après 3 mois de stockage pour la NE1 et 223.5, 161.4 et 301.3nm à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de stockage pour la NE2.

La taille des particules est plus stable à température ambiante qu'à des températures plus basses ou plus élevés, la NE1 présente une stabilité moins importante que celle de la NE2

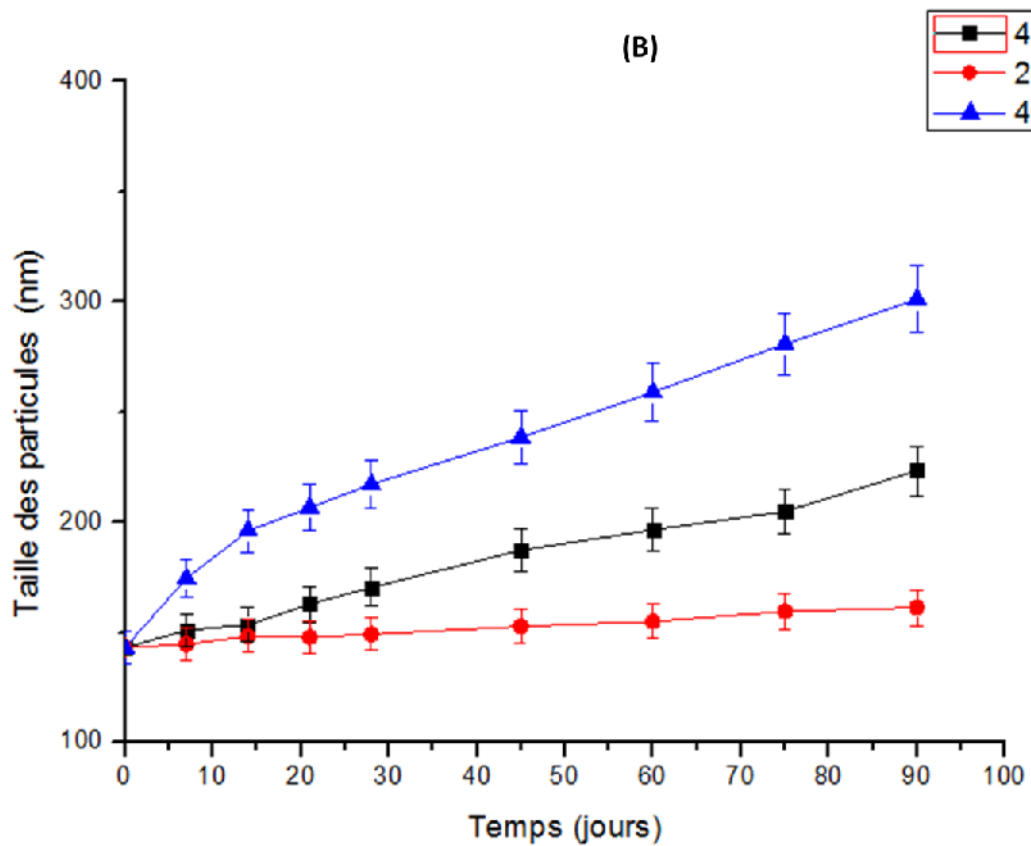
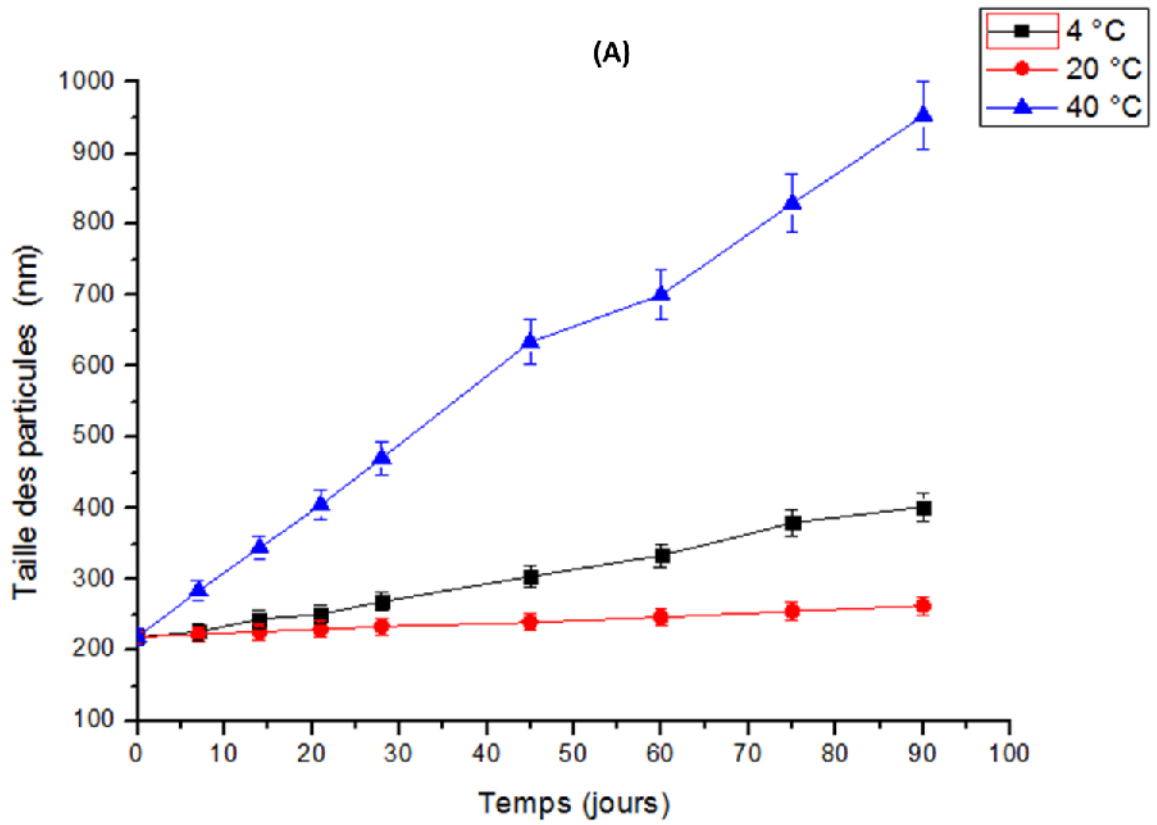


Figure 7.6 : Évolution de la taille des particules durant le stockage.

car les BCD-NDCA-NSs présentent une structure poreuse permettant d'encapsuler SEO tandis que les complexes d'inclusions formés entre la BCD et SEO qui composent la NE1 sont plus facilement dissociés.

L'augmentation de la taille de ces particules est principalement provoquée par les phénomènes de floculation, de coalescence et de maturation d'Ostwald dues à la variation du potentiel zêta. [444,445]. La taille des particules augmente plus rapidement à 40°C qu'à 4°C et 20°C, lorsque cette dernière augmente la viscosité de la phase continue diminue ce qui favorise le déplacement des gouttelettes et augmente leurs collisions [445].

A des températures très basses, la coalescence des gouttelettes est favorisée par la cristallisation de l'huile essentielle ce qui explique l'augmentation de la taille des particules d'une manière plus importante à 4°C comparée aux NEs stockées à 20°C [446,447].

#### 7.3.3.2. Le potentiel zêta

L'évolution du potentiel zêta des NE durant le stockage à 4°C, 25°C et 50°C est représentée sur la figure 7.7.

Les potentiels zeta des NE1 et NE2 sont de l'ordre de 36.2mV et 38.8mV respectivement, ce dernier diminue durant le stockage jusqu'à atteindre 9.5, 7.2 et 5.3mV à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de stockage pour la NE1 et 12.7, 11.5 et 8.2mV à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de stockage pour la NE2.

L'origine des charges positives à la surface des NEs est due à l'arginine qui est chargée positivement [448], c'est pour cela que les valeurs du potentiel zêta des deux NEs sont pratiquement égales (la stabilisation des NEs par la BCD ou par les BCD-NDCA-NSs n'influence pas sur le potentiel zêta).

Les charges positives initiales des NEs sont supérieures à 30mV donc elles sont considérées comme étant suffisamment fortes pour maintenir les forces de répulsions entre les gouttelettes [449,450].

Le potentiel zêta diminue lorsque la température de stockage augmente car la température influence sur la viscosité de la phase continue donc sur l'épaisseur de la couche de tensioactifs agissant à l'interface entre les gouttelettes et la phase aqueuse [451].

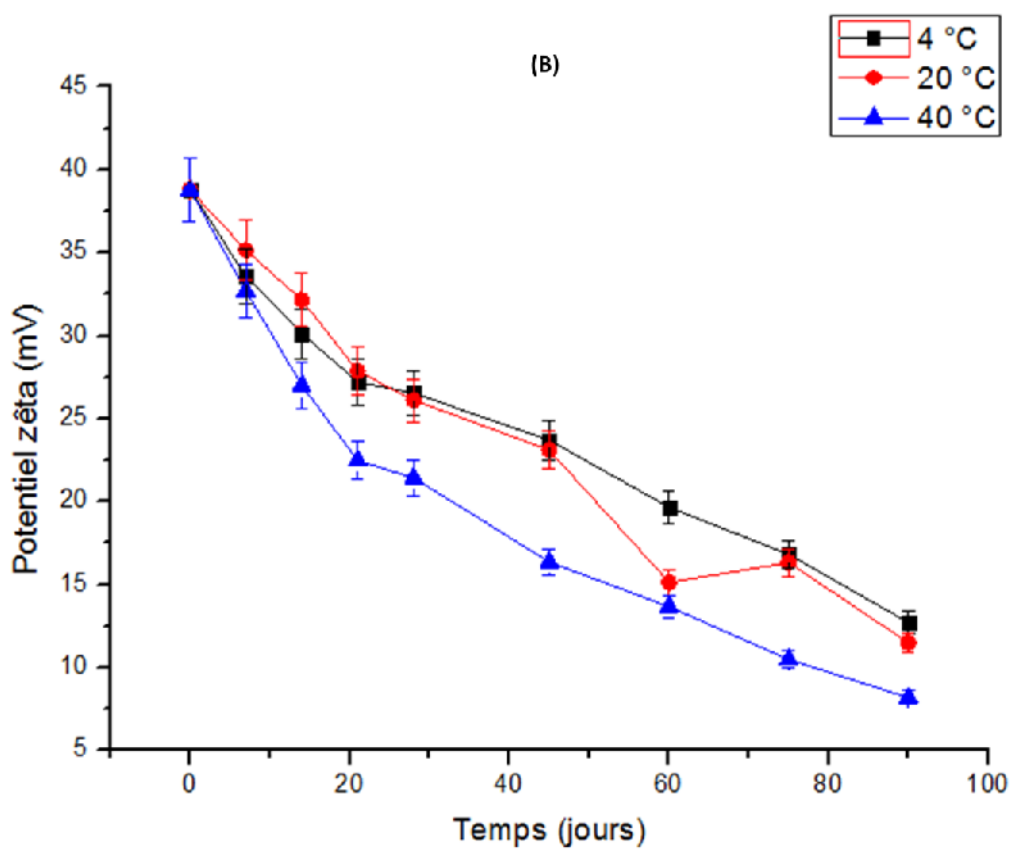
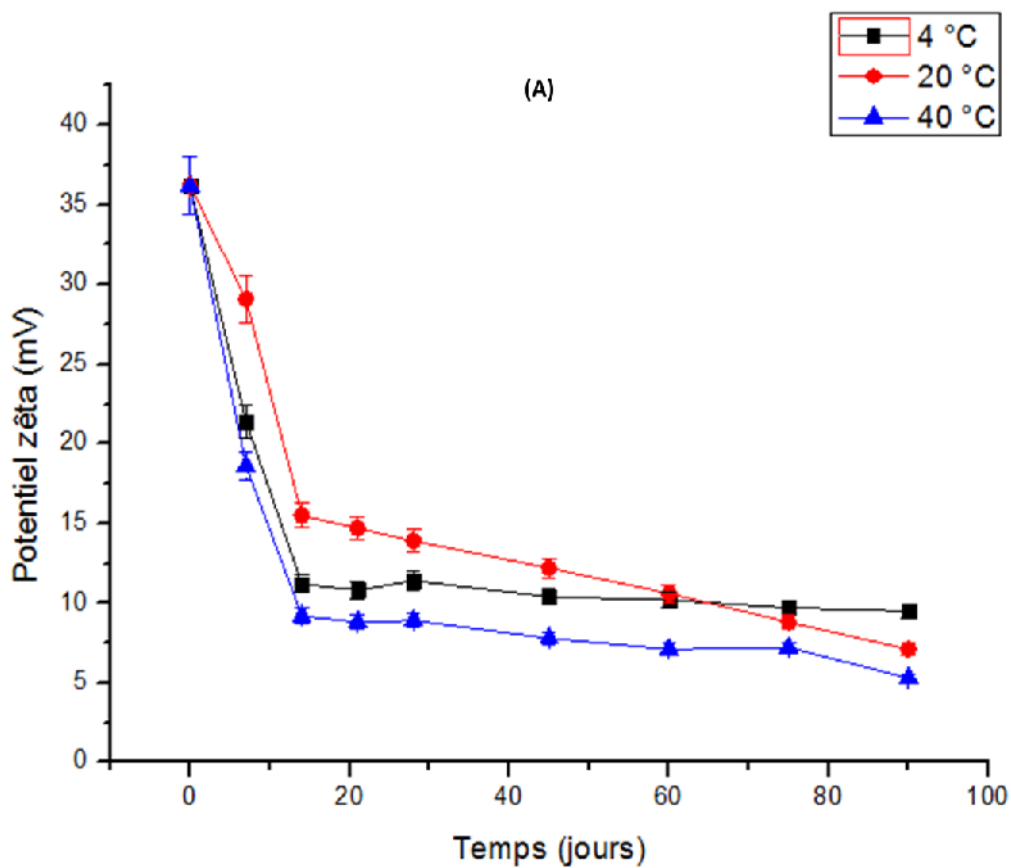


Figure 7.7 : Évolution du potentiel zêta durant le stockage.

### 7.3.3.3. Viscosité:

L'évolution de la viscosité des NE durant le stockage à 4°C, 25°C et 50°C est montrée dans la figure 7.8.

Les viscosités des NE1 et NE2 initiales sont de l'ordre de 0.87 Pa.s et 0.89 Pa.s respectivement, cette viscosité évolue de manière inversement proportionnelle à la température du stockage, elles atteignent les valeurs de 1.19, 1.06 et 0.65 Pa.s à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de stockage pour la NE1 et 1.39, 1.11 et 0.72 Pa.s à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de stockage pour la NE2.

Le pouvoir viscosifiant de la gomme xanthane largement étudié dans la bibliographie [452-454], lui confère des propriétés d'agent stabilisant pour les émulsions simples [455], les émulsions multiples [456] ou encore les nanoémulsions [457]. Effectivement, cette augmentation de la viscosité permet la diminution des mouvements des gouttelettes et leurs collision, d'où la diminution du phénomène de floculation et de coalescence. On remarque que la stabilisation des nanoémulsions par la BCD ou les NSs n'a pas d'influence sur la viscosité.

### 7.3.3.4. Turbidité

L'évolution de la turbidité des NE durant le stockage à 4°C, 25°C et 50°C est illustrée sur la figure 7.9.

Les turbidités des NE1 et NE2 initiales sont de l'ordre de 0.191cm<sup>-1</sup> et 0.14cm<sup>-1</sup> respectivement, cette turbidité augmente proportionnellement à la durée de stockage, elles atteignent les valeurs de 0.69, 0.38 et 0.925 cm<sup>-1</sup> à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de stockage pour la NE1 et 0.432, 0.33 et 0.714cm<sup>-1</sup> à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de stockage pour la NE2.

On remarque que la turbidité des NEs augmente à 4°C par rapport à 20°C et cette augmentation est encore plus importante à 40°C, ce qui prouve que la turbidité de nos NEs augmente proportionnellement avec la taille des particules décrites dans la section 7.3.2. Effectivement, la turbidité d'une nanoémulsion est en relation directe avec la taille des gouttelettes et la concentration [458], lorsque la taille des gouttelettes augmente sous l'effet des interactions de Van der Waals, électrostatiques et stériques qui favorisent la floculation, la coalescence et l'agrégation, la turbidité augmente aussi [459,460].

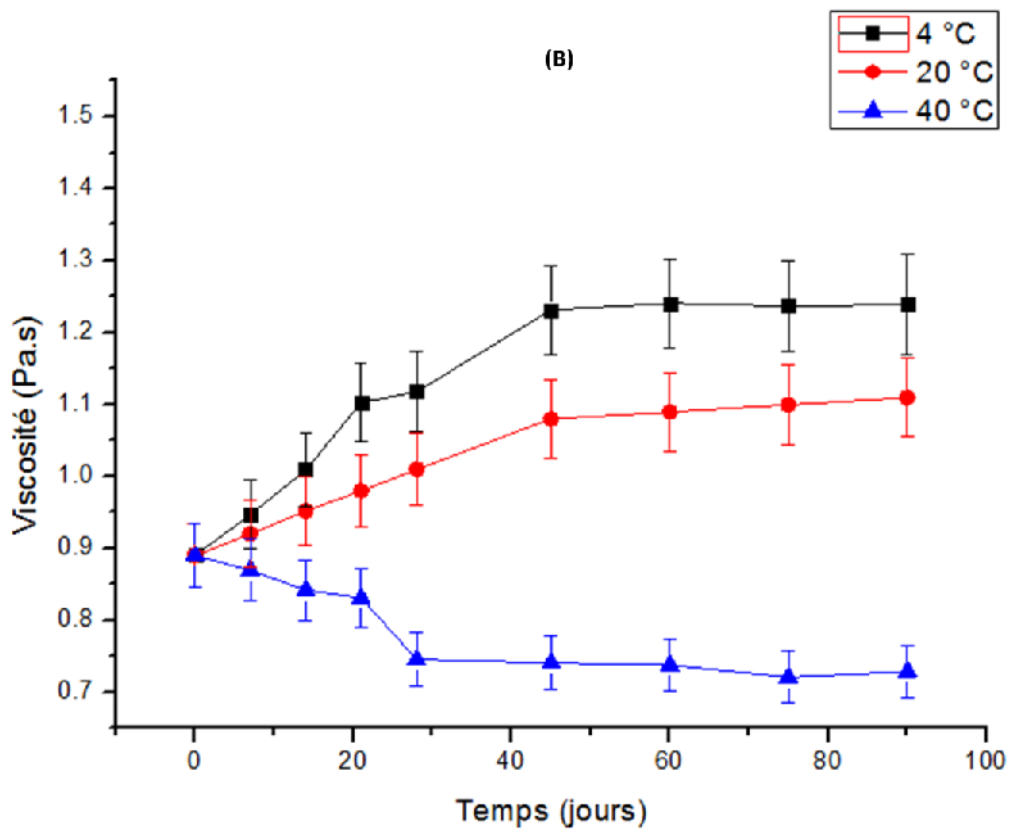
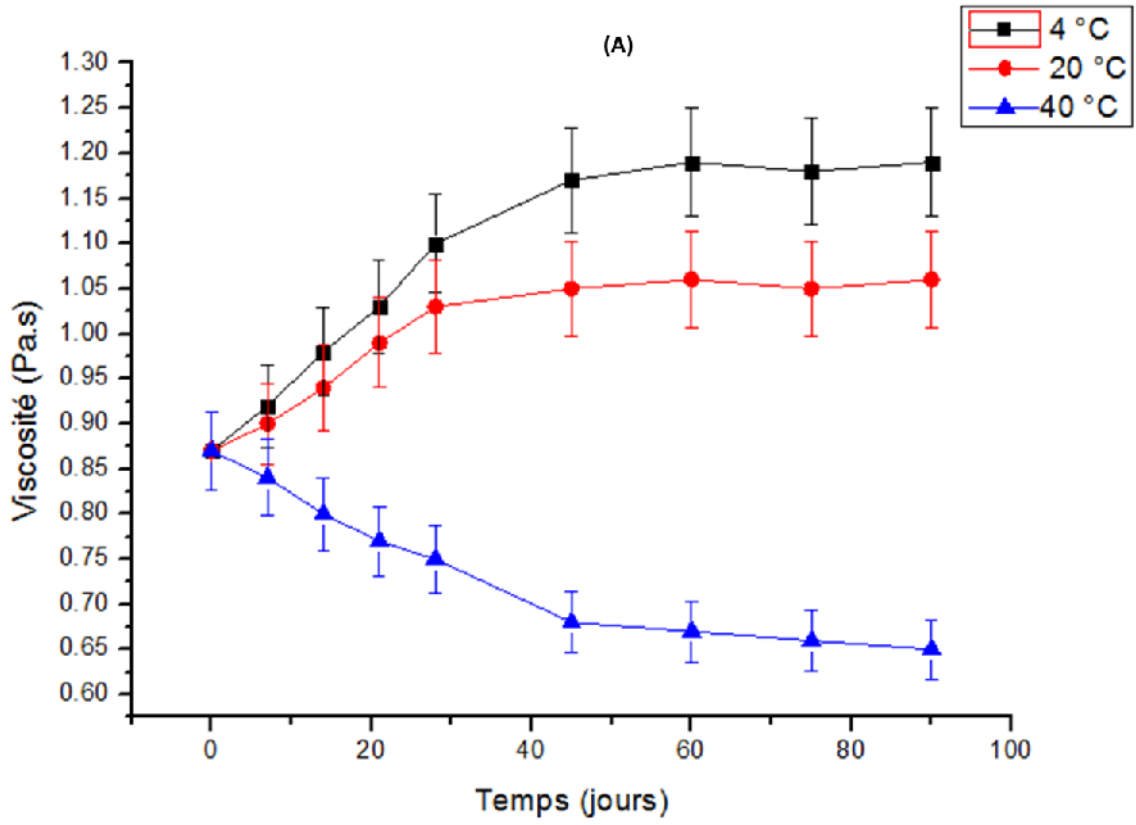


Figure 7.8 : Évolution de la viscosité durant le stockage.

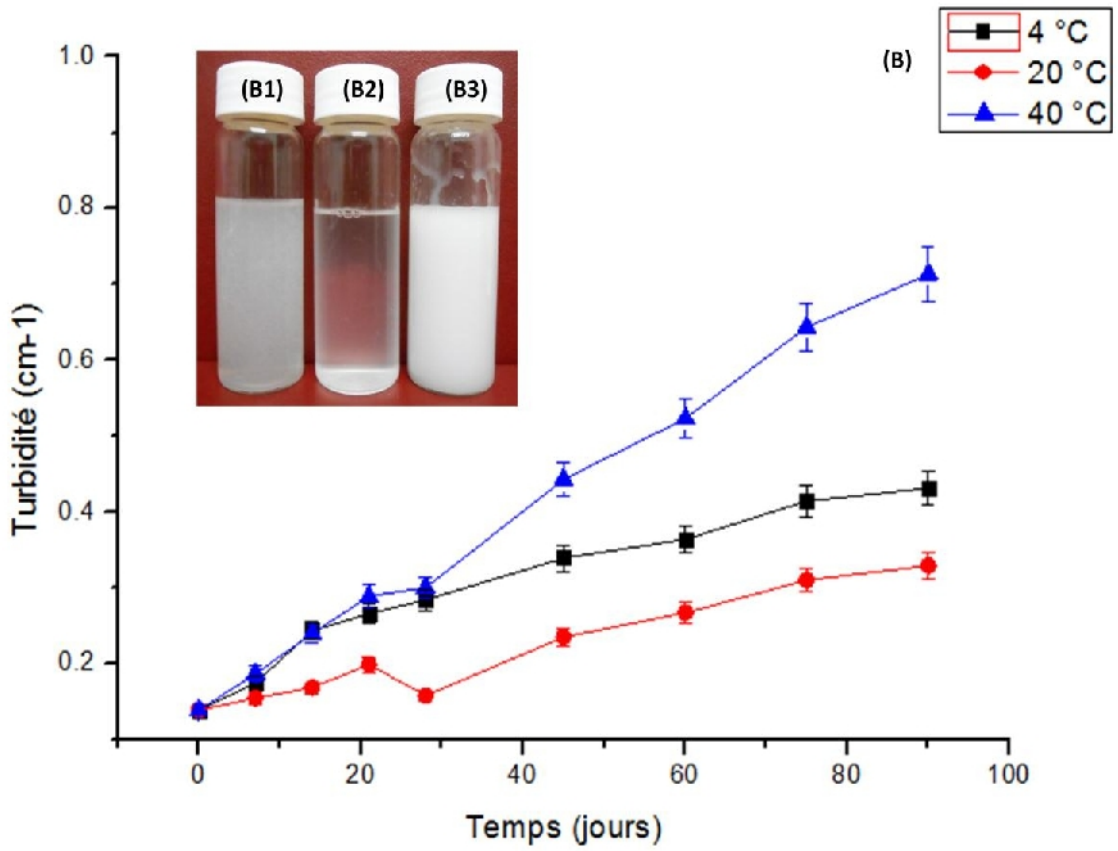
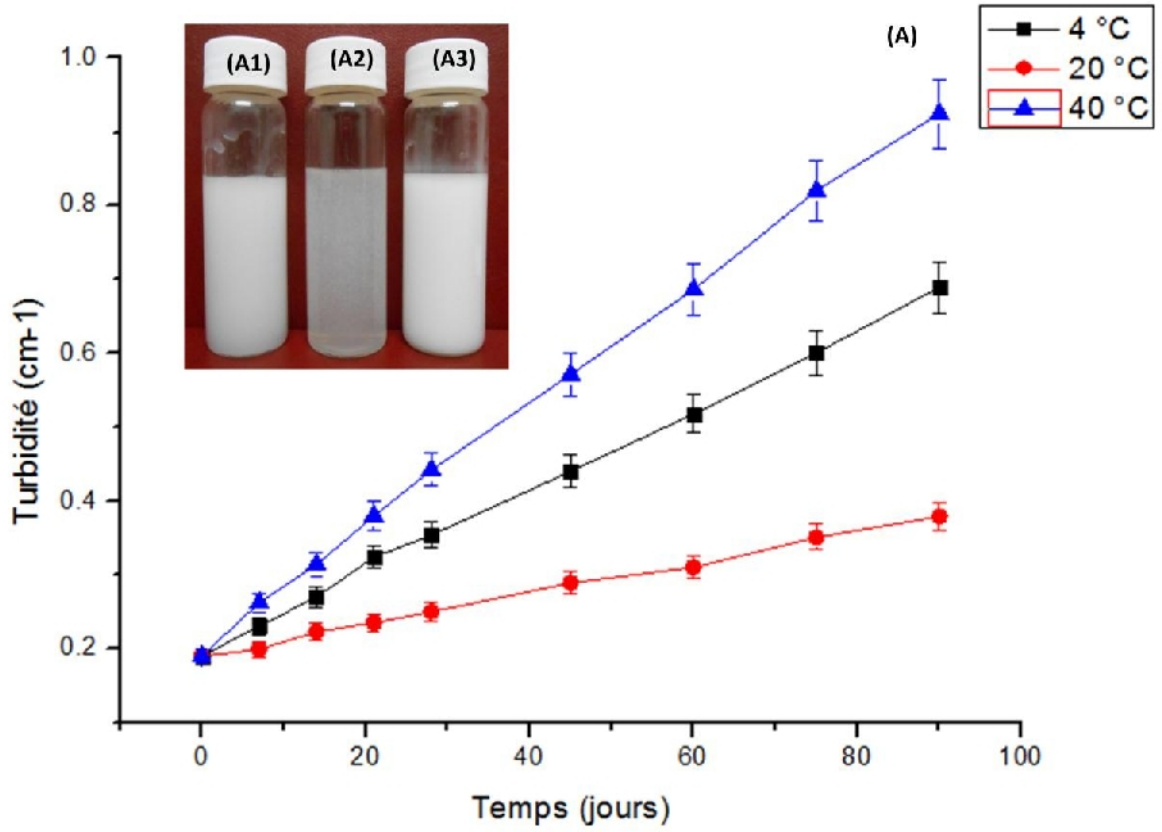


Figure 7.9 : Évolution de la turbidité durant le stockage.



Les photographies de la figure 7.9 montrent clairement le changement de turbidité des NEs après 90 jours de stockage.

Le tube B2 contenant la NE2 stockée à 20°C (161.4nm) est le seul présentant une apparence limpide, les tubes A2 (262.8 nm) contenant la NE1 stockée à 20°C et B2 (223.5nm) contenant la NE2 stockée à 4°C présentent tous les deux une apparence translucide. Les tubes B3 (301.3 nm) contenant la NE2 stockée à 40°C et A1 (402.6 nm) contenant la NE1 stockée à 4°C présentent tous les deux une apparence opaque. Le tube A3 (952.6 nm) contenant la NE1 stockée à 40°C est le seul présentant une apparence laiteuse.

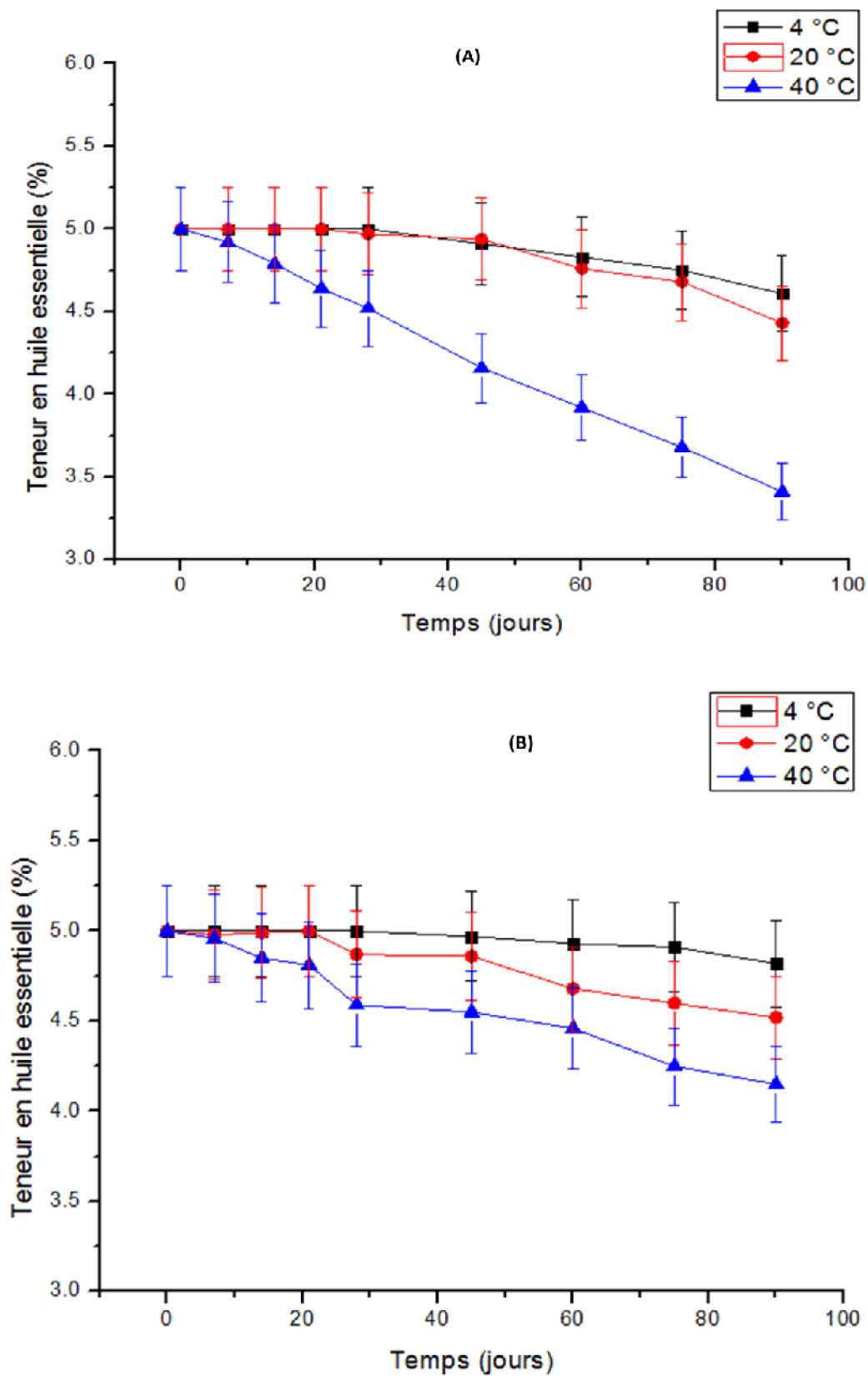
#### 7.3.3.5. Teneur en huile essentielle

L'évolution de la teneur en huile essentielle des NE durant le stockage à 4°C, 25°C et 50°C est représentée sur la figure 7.10.

Les contenances initiales en SEO pour les deux NEs sont de l'ordre de 5%, cette quantité diminue proportionnellement à la durée et à la température de stockage, elles atteignent les valeurs de 4.61, 4.43 et 3.41% à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de stockage pour la NE1 et 4.82, 4.52 et 4.15 % à 4°C, 20°C et 40°C respectivement après 3 mois de conservation pour la NE2.

La diminution de cette quantité est due principalement à l'augmentation du diamètre des gouttelettes car lorsque ce dernier augmente la surface de contact entre la phase continue et la phase dispersée augmente (la structure sphérique des gouttelettes n'est pas maintenue).

La température est le facteur le plus influençant la diminution de la quantité de SEO dans les NEs car les huiles essentielles sont des composés volatils très sensibles à la température. Effectivement, cette dernière non seulement elle influence la volatilité de l'huile essentielle mais aussi sur l'augmentation des tailles de gouttelettes en diminuant l'épaisseur du film interfacial en augmentant la solubilité des tensioactifs, en diminuant la viscosité et en augmentant l'énergie des gouttelettes, ce qui augmente leur mobilité, leurs collisions et les phénomènes de coalescence, de floculation et d'agrégation.



**Figure 7.10** : Évolution de la teneur en huile essentielle durant le stockage.

Afin d'étudier le taux de matière transformée au cours du temps à une température donnée (4, 20 et 40°C) l'équation d'Avrami décrite dans le paragraphe 7.2.3 a été utilisée après linéarisation (équation 7.8):

$$\ln(-\ln R) = n \ln K + n \ln t \quad (7.8)$$

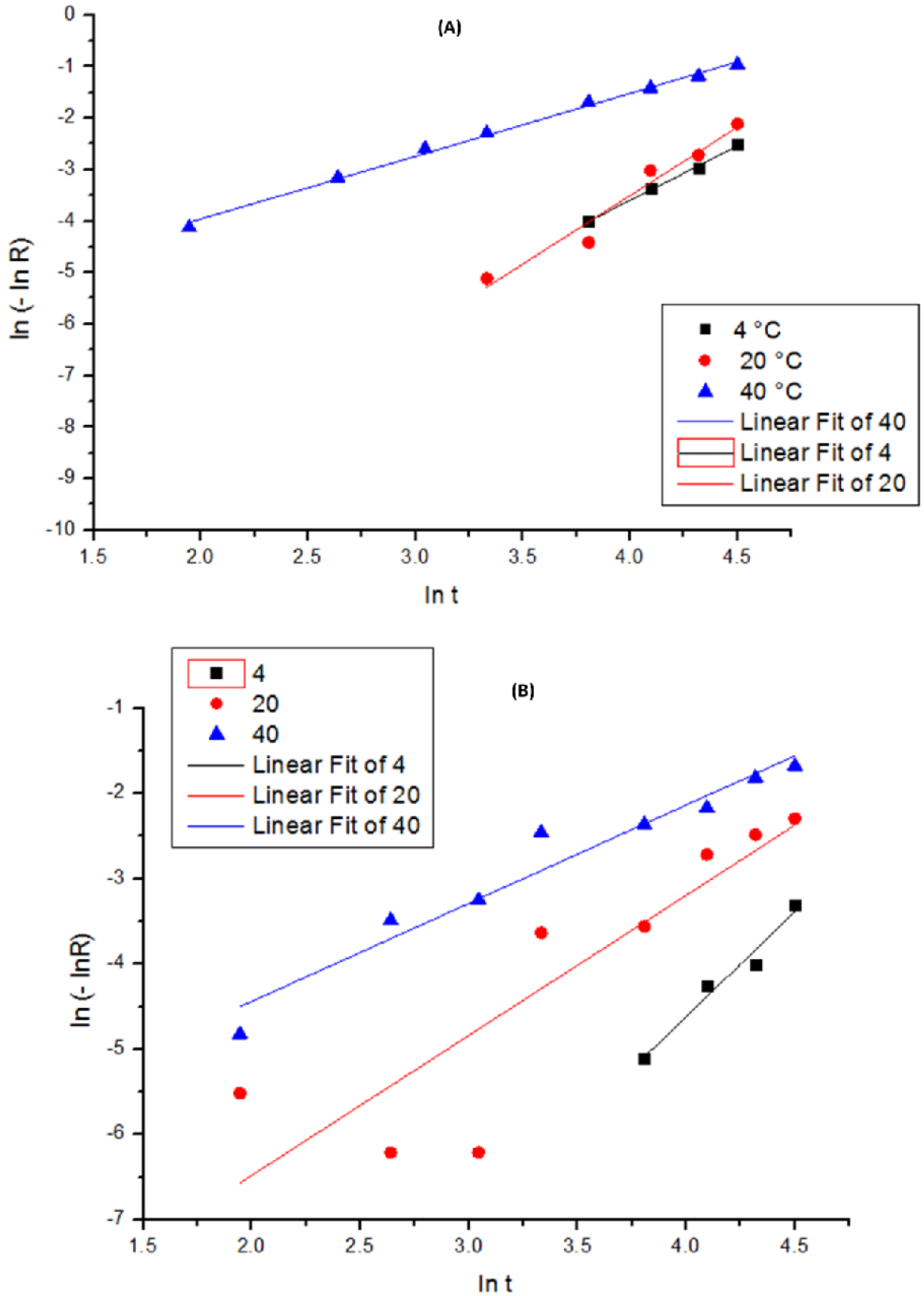
Sur le tracé de la courbe  $\ln(-\ln R)$  en fonction de  $\ln t$ , la pente représente la valeur de « n » et l'intersection entre le tracé et l'axe des ordonnées représentera « K ».

La valeur de la constante de vitesse de libération (K) augmente lorsque la température augmente pour la NE1, elle prend des valeurs de  $3.36 \cdot 10^{-3}$ ,  $4.91 \cdot 10^{-3}$  et  $5.28 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  à 4, 20 et 40 °C respectivement. Par contre pour la NE2, les valeurs de K restent très proches et présentent une faible influence à la température, elle prend les valeurs de  $2.8 \cdot 10^{-3}$ ,  $2.62 \cdot 10^{-3}$  et  $2.87 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  à 4, 20 et 40 °C respectivement.

Dans les études effectuées auparavant, la valeur de K augmente proportionnellement avec la température [461,462]. Mais notre nanoémulsion innovante NE2 présente des valeurs de K pratiquement insensibles à la température, donc une vitesse de libération de SEO à partir des BCD-NDCA-NSs quasiment constantes dans des milieux à différentes températures.

Les valeurs de « n » pour la NE1 sont de l'ordre de 2.11, 2.66 et 1.22 à des températures de 4, 20 et 40 °C respectivement, pour la NE2 sont de l'ordre de 2.45, 1.64 et 1.15 à des températures de 4, 20 et 40 °C respectivement. Les valeurs de n nous ont permis de déterminer le mécanisme de libération de SEO à partir des NEs. Toutes les valeurs de n obtenues sont supérieures à 1 donc la libération est rapide avec une période d'induction [462].

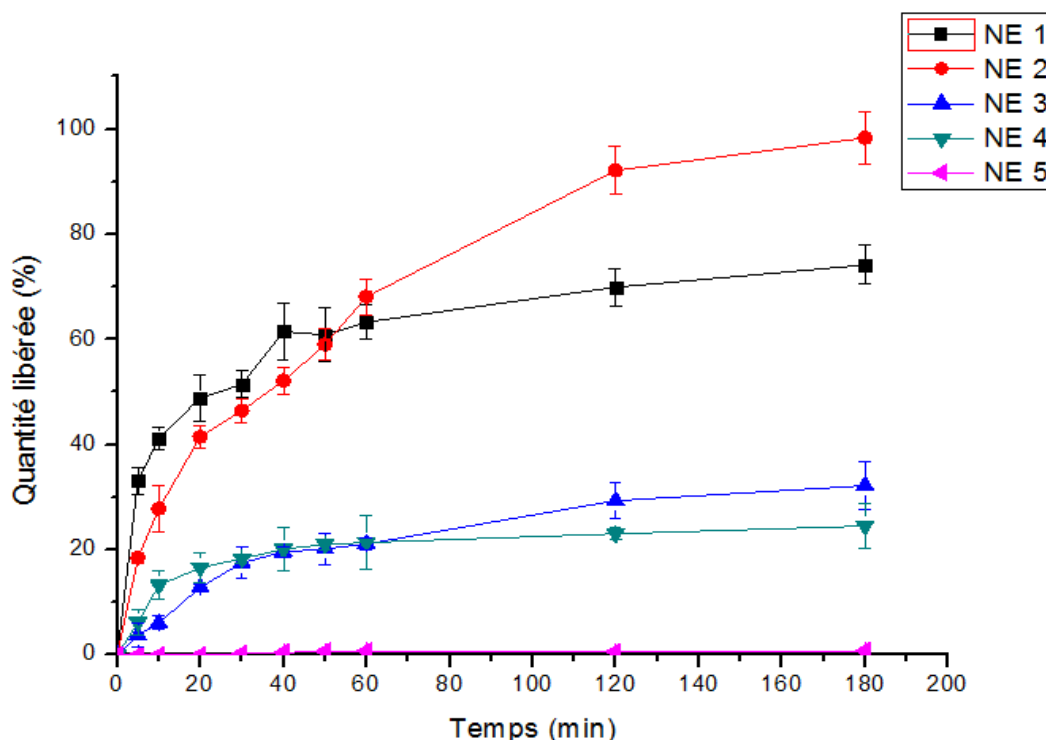
Ces résultats montrent clairement que les BCD-NDCA-NSs présentent un agent stabilisant et encapsulant permettant d'augmenter la stabilité thermique des composés et leur libération d'une manière contrôlée.



**Figure 7.11:** Comportement de SEO dans les NEs par l'équation Avrami durant le stockage pour les NE1 (A) et NE2 (B).

### 7.3.4. Étude de la cinétique de dissolution in-vitro

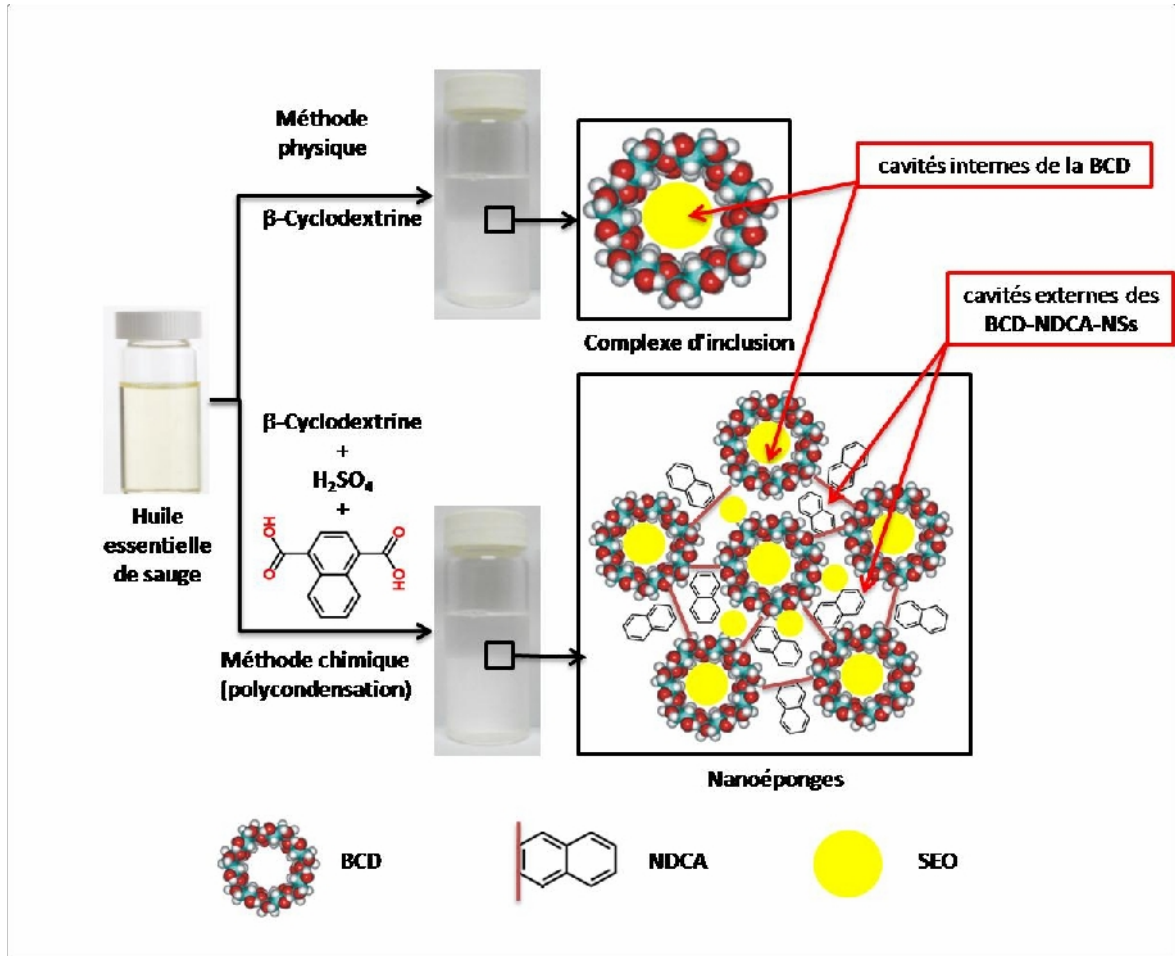
Les profils de la cinétique de dissolution in-vitro des différentes NEs sont donnés dans la figure 7.12.



**Figure 7.12** : Étude de la cinétique de dissolution in-vitro.

La NE5 contenant la SEO uniquement présente une insolubilité dans le milieu aqueux, les NE4 et NE3 stabilisées par la BCD et les BCD-NDCA-NSs respectivement, présentent des taux de dissolutions faibles de l'ordre de 24.52% et 32.23% pour la NE4 et NE3, respectivement. Après 180min de dissolution, cette augmentation est due à la formation de complexes d'inclusions entre la SEO et la BCD dans la NE4 et l'imbibassions des BCD-NDCA-NSs avec la SEO dans la NE3. Cette efficacité plus importante des BCD-NDCA-NSs par rapport à la BCD réside dans la capacité d'encapsuler la SEO dans les cavités des BCD et dans les cavités formées entre les différentes BCD liées entre elles grâce au NDCA [464]. La figure 7.13 représente la structure des différentes cavités des nanoéponges.

Effectivement, les analyses préalablement réalisées des BCD-NDCA-NSs par MEB et BET ont montré leur grande porosité comparée à la BCD naturelle, et leur analyse par DRX a montré une grande diminution de la cristallinité donc une augmentation de la solubilité.



**Figure 7.13:** Structure des cavités internes et externes des nanoéponges contenant l'huile essentielle de *Salvia officinalis*.

Les NE1 et NE2 contenant les mêmes composés que les NE4 et NE3 respectivement, avec un composé supplémentaire qui est l'arginine représentent des taux de dissolutions très importants qui sont de l'ordre de 74.17% et 98.32% pour les NE1 et NE2 respectivement.

Cette augmentation de solubilité est due principalement à l'arginine qui a augmenté la charge ionique du milieu aqueux, ce qui a augmenté l'encapsulation de SEO à l'intérieur des cavités des BCD et des BCD-NDCA-NSs [465]

### 7.3.5. Évaluation de l'activité antidiabétique in-vivo

Les évolutions de la glycémie chez les différents rats au cours du temps sont données dans la figure 7.14 (A).

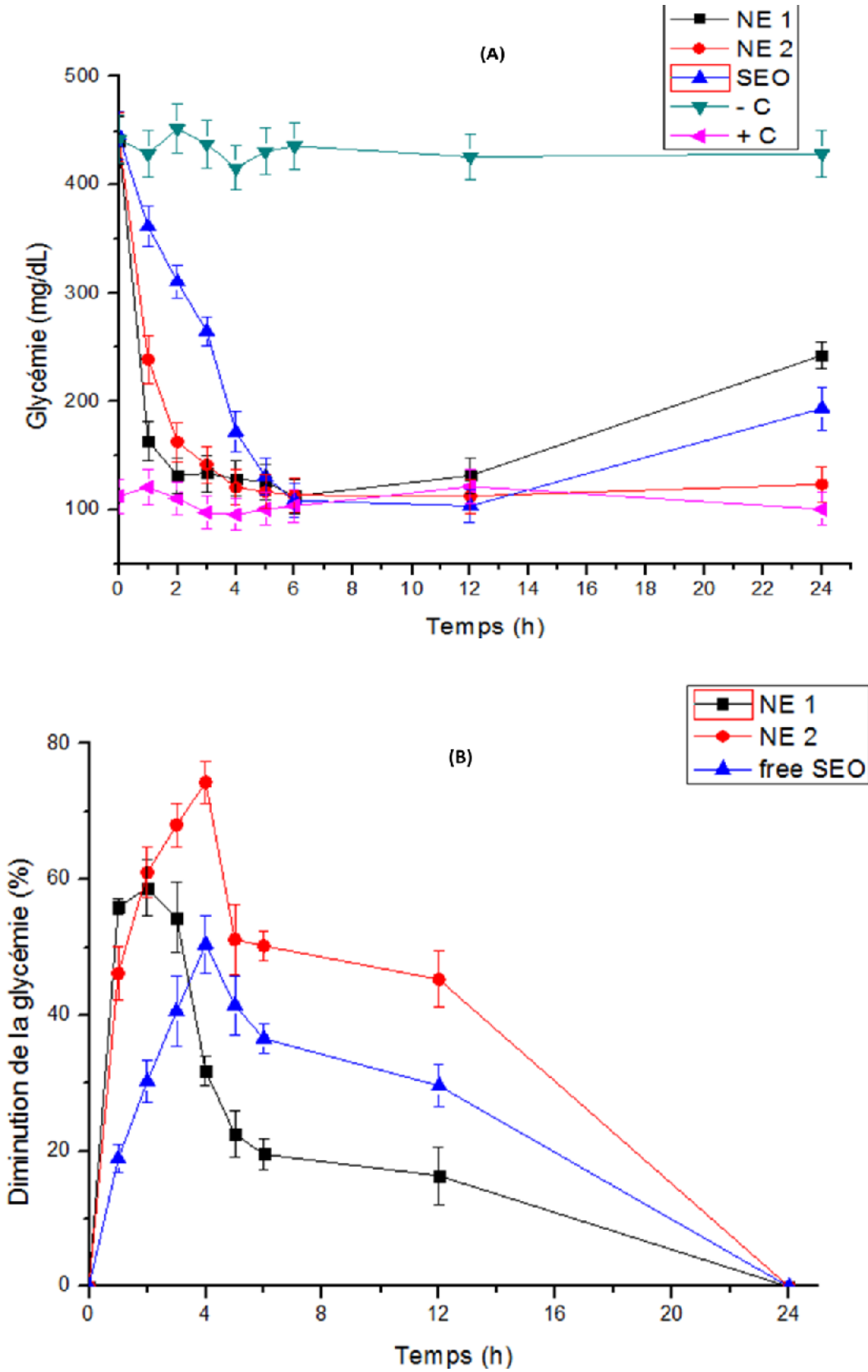


Figure 7.14 : Évolution de la glycémie chez les rats des différents lots (A), .

La glycémie pour les rats non diabétiques (groupe 1) et les rats diabétiques non-traités (groupe 2) est stable durant toute la durée des expériences, à des valeurs de 101 mg/dl et 429 mg/dl respectivement.

Les caractéristiques pharmacocinétiques (diminution maximale de la glycémie, temps de réponse maximal, temps de demi-vie et la surface de diminution de la glycémie) des différents traitements testés sur les rats diabétiques (groupe 3,4 et 5) sont donnés dans la figure 7.14 B et le tableau 7.6.

#### 7.3.5.1. Diminution maximale de la glycémie

La NE2 représente une diminution maximale de la glycémie de 74.32% qui est plus importante comparée à celle de la NE1 qui est égale à 58.73%, et celle de la SEO qui est égale à 50.45%. L'augmentation de cette activité antidiabétique peut être justifiée par l'augmentation de la solubilité in-vitro de la substance active qui correspond à l'augmentation de la biodisponibilité in-vivo [466,467].

#### 7.3.5.2. Temps de réponse maximal

Le temps de réponse maximal de la NE1 (2h) est plus faible que la NE2 (4h), ce temps de réponse précoce pour la NE1 est dû à la diffusion rapide de la SEO à partir de la BCD libre comparée à sa diffusion à partir du milieu poreux composant les BCD-NDCA-NSs.

#### 7.3.5.3. Temps de demi-vie

Le temps de demi-vie de la SEO libre est de 13.67 h. Ce temps diminue jusqu'à 4.17 h pour la NE1 composée de complexes d'inclusion BCD-SEO très solubles et très facilement dissociables et augmente à 14.19h pour la NE2 composée de BCD-NDCA-NSs encapsulant la SEO présentant une solubilité plus importante mais une diffusion très lente de la SEO à partir du système poreux.

#### 7.3.5.4. Surface de diminution de la glycémie

La surface de diminution de la glycémie de la NE1 est de l'ordre de 438.54. Sa valeur est pratiquement deux fois plus importante pour la NE2 d'où l'intérêt de cette formulation qui nous permet de proposer une libération prolongée.



**Tableau 7.6** : Les caractéristiques pharmacologiques des différentes formulations.

Paramètres pharmacocinétiques	Traitements		
	NE1	NE2	SEO
Diminution maximale de la glycémie (%)	58.73	74.32	50.45
Temps de réponse maximal (h)	2	4	4
Temps de demi-vie (h)	4.17	14.19	13.67
Surface de diminution de la glycémie	438.54	883.89	575.89

#### 7.3.5.5. Étude histopathologique du pancréas

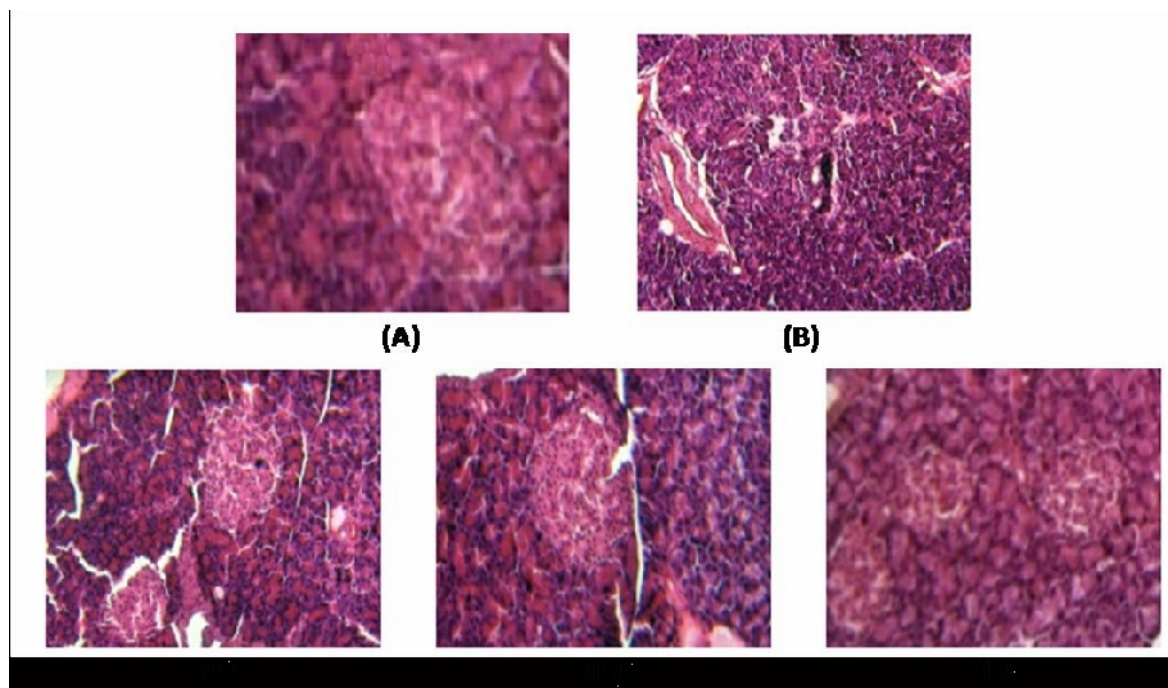
La figure 7.15 représente les microphotographies des coupes histologiques des pancréas pour les différents groupes de rats, (A) physiologique, (B) témoin négatif, (C) lot traité avec l'huile essentielle de sauge libre, (D) lot traité par la NE1 et (E) lot traité par la NE2.

Les pancréas des rats témoins non-diabétiques (groupe 1) présentent une structure physiologique avec des îlots de Langerhans de forme ronde ou ovale avec des bords bien définis.

Les rats diabétiques traités à la STZ qui n'ont pas reçu de traitement (groupe 2) présentent un tissu pancréatique complètement pathologique dans lequel les îlots de Langerhans sont complètement atrophiés et leur nombre a considérablement diminué. Effectivement, cette altération dégénérative des îles de Langerhans est due à la forte cytotoxicité de l'STZ qui vise à les détruire en combinant plusieurs mécanismes, principalement l'oxydation des groupes SH, la génération de radicaux libres, l'inhibition de la glucokinase et les perturbations de l'homéostasie du calcium intracellulaire [468].

Les rats des groupes 3,4 et 5 traité respectivement avec la SEO, NE1 et NE2 présentent des améliorations de l'aspect microscopique du tissu pancréatique. Le traitement avec la SEO a permis le développement des îles de Langerhans mais les altérations dégénératives restent très présentes et les bords de ces dernières restent très irréguliers. Le traitement avec la NE1 a permis un bon développement des îles de Langerhans et une diminution très importante des zones de dégénérescence comparé au traitement avec la SEO. Par contre le

traitement avec la NE2 a permis une régénération quasiment totale du tissu pancréatique, les îles de Langerhans présentent des formes rondes et ovales avec des bordures bien limitées même si leur taille reste plus petite que la normale et les altérations dégénératives ont complètement disparues.



**Figure 15** : Les microphotographies des coupes histologiques des pancréas pour les différents groupes de rats, (A) physiologique, (B) témoin négatif, (C) lot traité avec l'huile essentielle de sauge libre, (D) lot traité par la NE1 et (E) lot traité par la NE2.

Ces résultats prouvent une fois encore que la relation entre la biodisponibilité in-vivo est directe avec la solubilité in-vitro [469]. Cette augmentation de la biodisponibilité n'agit pas seulement sur les caractéristiques pharmacocinétiques des médicaments mais aussi sur les structures histologiques [470]. Donc la régénération du tissu pancréatique par les BCD-NDCA-NSs composant la NE2 EST plus importante que les complexes d'inclusions à base de BCD parce que les NSs présentent un plus grand pouvoir solubilisant.

#### 7.4. Conclusion

Dans cette étude, de nouveaux nanoéponges à base de  $\beta$ -cyclodextrines et de l'acide 1,4-naphtalène dicarboxylique ont été synthétisés. Après optimisation de leurs paramètres de synthèse, les résultats ont montré le rendement de réaction le plus élevé (74,33%) à un ratio de 1:10 BCD:NDCA après 48h de temps de réaction. La caractérisation des

nanoéponges par FTIR, SEM, BET et XRD a montré l'amélioration de leur porosité par rapport à celles de la  $\beta$ -cyclodextrine naturelle. Ces nanoéponges ont clairement démontrés leur grande capacité à encapsuler des substances hydrophobes. La nanoémulsion huile-dans-eau de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* stabilisée par ces nanosponges présente une stabilité supérieure à celle de la nanoémulsion stabilisée par la  $\beta$ -cyclodextrine naturelle. Cette stabilité des nanoémulsions est très sensible à la température et à la période de stockage, elle est plus élevée à 20°C qu'à 4°C et 40°C (la température affecte leur granulométrie, leur potentiel zêta, leur viscosité, leur turbidité et leur teneur en huile essentielle). L'équation d'Avrami a montré une bonne stabilité thermique de notre nanoémulsion stabilisée par les nanoéponges. Ces résultats permettent d'élargir les applications industrielles de l'huile essentielle de sauge. L'étude de l'application pharmaceutique de cette nanoémulsion in vitro par le test de dissolution a montré l'augmentation de la solubilité des huiles essentielles (98,32% après 180 min) et in vivo par l'évaluation de l'activité antidiabétique chez le rat. La nanoémulsion stabilisée par les nanoéponges a montré une meilleure efficacité thérapeutique comparée à la nanoémulsion stabilisée par la  $\beta$ -cyclodextrine naturelle et l'huile essentielle de la sauge libre.

## CHAPITRE 8

### FORMULATION DE MICROSYSTEMES POUR LA DELIVRANCE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE *SALVIA OFFICINALIS*

#### 8.1. Introduction

La stabilisation des suspensions contenant des microparticules est un but que les différentes industries cherchent à atteindre. Effectivement, plusieurs ingrédients actifs utilisés dans les différentes industries sont insolubles dans les solutions aqueuses et présentent une très faible stabilité physico-chimique dans ces milieux, comme certains médicaments [471], conservateurs [472], antioxydants [473], pesticides [474] et catalyseurs chimiques [475], utilisés par les industries pharmaceutiques, alimentaires, cosmétiques, phytosanitaires et chimiques.

L'instabilité physique de ces suspensions est présentée par une sédimentation très rapide de la phase dispersée et une très difficile redispersibilité de la phase dispersée dans la phase dispersante [476]. Par contre l'instabilité chimique est principalement due à l'effet de l'eau formant la phase dispersante sur les différents ingrédients dispersés [477]. La gomme xanthane est un polysaccharide d'origine microbienne présentant un grand pouvoir viscosifiant [478]. La tragacathe est une gomme naturelle, composée de deux différents types de polysaccharides, la tragacanthine (30-40%) qui est un hydrocolloïde soluble dans l'eau et la bassorine (60-70%) qui est insoluble dans l'eau et qui gonfle pour former un gel [479]. Les alginates sont des polysaccharides naturels extraits à partir des algues marines, présentant une grande charge électrique négative [480]. Le point commun entre ces trois différentes substances préalablement citées (gomme xanthane, tragacathe et l'alginate de sodium) est leur capacité à augmenter la viscosité d'une solution aqueuse d'une manière importante [478-481], ce qui permet de les utiliser comme agents dispersants.

L'originalité de ce travail est d'étudier l'effet de différents agents dispersants polymériques sur la stabilité physicochimique d'un principe actif qui a été préalablement encapsulé dans une membrane polymérique. En premier lieu, les substances bioactives seront extraites à partir de *Salvia officinalis*, caractérisées par HPLC-UV/DAD ensuite encapsulées dans une membrane à base de gélatine et de pectine en utilisant un procédé de coaservation complexe. Ensuite, des suspensions à bases de ces microcapsules seront préparées en utilisant différents agents dispersants (la gomme xanthane, gomme de dragon et alginate de

sodium). Les suspensions seront caractérisées par granulométrie laser, zétamétrie, viscosimétrie et évaluation de leurs activités antioxydantes. De plus, les propriétés physico-chimiques et antioxydantes des différentes suspensions seront évaluées au cours de 90 jours de stockage ; et un mécanisme de stabilisation des suspensions sera proposé pour chaque agent dispersant. Enfin, l'activité antidiabétique in-vivo de l'extrait éthanolique de sauge sera évalué in-vivo avant et après formulation pour étudier l'effet de cette dernière sur les propriétés pharmacologiques de l'extrait étudié.

## 8.2. Matériels et méthodes

La gomme xanthane, la gélatine de type B (d'origine bovine) et les alginates de sodium, sont offerts par le groupe pharmaceutique Sidal. La tragacathe, la pectine, le réactif de Folin-ciocatleu et le diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH) sont fournis par Sigma Aldrich. Formaldéhyde, acide acétique, méthanol, éthanol, acide phosphorique, acétonitrile, hydroxyde de sodium, carbonate de sodium et l'eau distillée sont de grade analytique.

### 8.2.1. Préparation et caractérisation des microcapsules

#### 8.2.1.1. Préparation des microcapsules

La technique de microencapsulation utilisée dans la présente étude est une combinaison entre plusieurs procédures décrites dans la littérature [482-486] avec plusieurs modifications. La technique utilisée est la coacervation complexe, elle est basée sur la séparation de phases qui correspond à la désolvatation simultanée de deux polymères de charges opposées. Cette désolvatation est provoquée suite à une modification du pH du milieu réactionnel (pH isoélectrique de la protéine utilisée) et à l'attraction électrostatique induite des deux polymères. Après plusieurs essais, le procédé mis au point est présenté en sept étapes principales.

- 1- 0.5g de l'extrait à encapsuler est dispersé dans une solution de gélatine à 5% préalablement chauffée à 40°C, le système est mélangé à 300RPM durant 15min.
- 2- Addition de la solution de pectine à 5% préchauffée à 40 °C, le système est mélangé à 300RPM durant 5 min.
- 3- Ajustement du pH du système par l'ajout d'une solution d'acide acétique à 1%, le système est mélangé à 300RPM durant 5min.
- 4- Une dilution est effectuée en ajoutant 100ml d'eau distillée froide (5°C), ensuite le système est refroidi à 5°C sous agitation.

- 5- Après l'ajout de l'agent de durcissement, le système est laissé sous agitation à 5°C durant 30min.
- 6- Le pH du système est ajusté à 9 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 20% (afin d'éviter l'agrégation des microcapsules). L'agitation est maintenue durant 2 heures à 300RPM.
- 7- Récupération des microcapsules par filtration à l'aide d'un papier filtre Whatmann n°1. Après le lavage des microcapsules, elles sont directement lyophilisées.

Plan d'expériences utilisé : Afin d'optimiser le procédé de microencapsulation préalablement établi, nous avons utilisé un plan factoriel complet à deux niveaux et trois facteurs. Le nombre d'expériences du plan factoriel utilisé est donné par l'équation (8.1).

$$N = L^F \quad (8.1)$$

Où : « N » est le nombre d'expériences, « L » le nombre des niveaux et « F » est le nombre des facteurs ; Donc nous allons réaliser  $2^3 = 8$  expériences pour optimiser les paramètres du procédé. Les facteurs sélectionnés sont le ratio noyau/paroi (facteur 1), le ratio gélatine/pectine (facteur 2) et la quantité de l'agent de durcissement (facteur 3). Les valeurs des niveaux haut (+1) et bas (-1) de chaque facteur sont données dans le tableau 8.1.

**Tableau 8.1** : Matrice des expériences.

Essais		Facteur 1 : C/S <sup>1</sup>		Facteur 2 : G/P <sup>2</sup>		Facteur 3 : HA <sup>3</sup>	
N°	Nom	Niveau	Valeur	Niveau	Valeur	Niveau	Valeur
1	MC1	-1	1/4	+1	5/2	+1	1ml
2	MC2	+1	1/3	+1	5/2	+1	1ml
3	MC3	-1	1/4	-1	5/3	+1	1ml
4	MC4	+1	1/3	-1	5/3	+1	1ml
5	MC5	-1	1/4	+1	5/2	-1	0
6	MC6	+1	1/3	+1	5/2	-1	0
7	MC7	-1	1/4	-1	5/3	-1	0
8	MC8	+1	1/3	-1	5/3	-1	0

<sup>1</sup>: Le ratio Core/Shell. <sup>2</sup>: Le ratio Gelatin/Pectine. <sup>3</sup>: La quantité de l'agent de durcissement.

La réponse étudiée est le taux d'encapsulation. Après la réalisation des expériences et l'analyse des résultats à l'aide du logiciel MODDE.6. L'effet des facteurs sur le taux d'encapsulation sera évalué et les différents coefficients du modèle mathématique seront

obtenus. Le modèle mathématique d'un plan factoriel complet est donné par l'équation polynomiale (6.2) [386].

### 8.2.1.2. Caractérisation des microcapsules

#### Détermination du taux d'encapsulation

Les taux d'encapsulations sont déterminés à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Taux d'encapsulation} = \frac{\text{Quantité de polyphénols encapsulés (g)}}{0.5} \cdot 100 \quad (8.2)$$

La quantité de polyphénols initialement introduite est connue (0.5g) et la quantité de polyphénols encapsulés est déterminée par le dosage de la quantité de polyphénols totaux contenus dans les microcapsules lyophilisées.

200mg de microcapsules sont finement broyées puis mélangées à 20ml d'éthanol. Après 1 heure d'agitation, la solution est centrifugée à 3000RPM durant 5min, ensuite filtrée à l'aide d'un microfiltre à seringue avec des pores de 0.1µm de diamètre. 0.5ml de cette solution est prélevé pour déterminer la quantité de polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteu [359,360].

Le dosage a été réalisé en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible de type SHIMADZU®, les 0.5ml prélevés de la solution sont mélangés à 2.5ml de solution de carbonate de sodium à 20% w/v et 2.5ml de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 % v/v. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance des solutions a été déterminée à une longueur d'onde de 768nm. La quantification est faite selon une courbe d'étalonnage établie dans les mêmes conditions avec des solutions d'extraits de différentes concentrations (de 0 à 50µg/ml).

#### Analyse microscopique

L'observation microscopique des microcapsules obtenues a été réalisée en utilisant un microscope optique de type Olympus® BX60.

#### Détermination du diamètre moyen

Les diamètres moyens des différentes microcapsules obtenues ont été déterminés par traitement d'image, les microphotographies obtenues à l'aide d'un appareil photo ont été

soigneusement sélectionnées et les diamètres moyens des microparticules ont été déterminés en utilisant le logiciel de traitement d'image « image-J ».

## 8.2.2. Préparation et caractérisation des suspensions

### 8.2.2.1. Préparation des suspensions

0.5mg de l'agent dispersant est rajouté à 89.5ml d'eau distillée. Après 2 heures d'agitation, les solutions de polymères sont homogénéisées par ultra-turax à 10.000 RPM durant 5 min. 10g de microcapsules séchées sont introduites dans le système et la suspension obtenue est à nouveau homogénéisée par ultra-turax à 10.000RPM durant 5min pour avoir une dispersion homogène des microcapsules (phase dispersée) dans la solution de polymères (phase dispersante). Les compositions des formulations réalisées sont données dans le tableau 8.2.

**Table 8.2** : Composition des formulations.

Code de la formulation	Microcapsules	Gomme xanthane	Gomme taragamant	Alginate de sodium	Eau purifiée
S1	10%	0.5%	-	-	89.5%
S2	10%	-	0.5%	-	89.5%
S3	10%	-	-	0.5%	89.5%

### 8.2.2.2. Caractérisation des suspensions

#### Mesure du diamètre moyen

La taille moyenne des particules de suspensions préparées a été déterminée par un granulomètre laser de type FRITSCH ANALYSETTE 22 MicroTec plus. Le diamètre moyen a été calculé en utilisant l'équation (7.2).

#### Mesure du potentiel zêta et de la viscosité

Le potentiel zeta ainsi que la viscosité des suspensions ont été déterminés en utilisant les instruments, les protocoles et les équations décrites dans la section 7.2.2.2.

#### Évaluation de l'activité antioxydante

L'activité anti-oxydante des suspensions et de leurs constituants a été déterminée par la méthode de piégeage des radicaux DPPH, selon le protocole décrit par [487,488] avec



quelques modifications. Une solution de DPPH à 0.004g par 100ml de méthanol est préparée. 3ml de la solution de DPPH sont mélangés à 1ml de solution à analyser (5mg/ml), après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière. L'absorbance de chaque solution est mesurée à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible de type shimadzu. L'activité anti-oxydante a été déterminée en utilisant l'équation suivante (8.3) :

$$AA(\%) = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \cdot 100 \quad (8.3)$$

Ou : 'AA' est le pourcentage de l'activité anti-oxydante, 'A<sub>0</sub>' est l'absorbance de la solution de DPPH et 'A<sub>s</sub>' est l'absorbance de la solution de DPPH contenant l'échantillon à analyser.

### 8.2.3. Étude de stabilité des suspensions

Les suspensions sont placées dans des tubes cylindriques de 20cm de hauteur et de 1.5cm de diamètre, puis stockées à 25°C durant 90 jours. Chaque 30 jours les tubes sont récupérés pour estimer le volume de sédimentation et la redispersibilité, après homogénéisation des tubes un prélèvement est effectué pour estimer les propriétés physicochimiques et antioxydantes des suspensions.

#### 8.2.3.1. Détermination des propriétés physico-chimiques

Le diamètre moyen, le potentiel zêta et la viscosité sont déterminés par les mêmes méthodes décrites dans la partie 8.2.2.2 ci-dessus.

#### 8.2.3.2. Volume de sédimentation

Le volume du sédiment est calculé en utilisant l'équation suivante (8.4) [489,490]:

$$Volume\ de\ sédimentation = \frac{H_s}{H_0} \quad (8.4)$$

Ou : « H<sub>s</sub> » est la hauteur du sédiment et « H<sub>0</sub> » est la hauteur initiale de la suspension.

#### 8.2.3.3. Redispersibilité

La redispersibilité est estimée par le nombre de tours de 360° à 20 RPM nécessaires pour une homogénéisation totale de la suspension sédimentée [491].

#### 8.2.3.4. Dégradation de l'activité anti-oxydante

La dégradation de l'activité anti-oxydante pour les différentes suspensions préparées et pour une solution d'extrait à 5mg/ml stockée à 25°C est réalisée par l'estimation de l'activité antioxydante chaque 30 jours, durant 90 jours de stockage en utilisant la méthode décrite dans la partie 8.2.2.2 ci-dessus.

Une modélisation de la cinétique de dégradation de l'activité antioxydante a été réalisée en utilisant le modèle d'ordre 1 qui est donné par l'équation (8.5).

$$\frac{dD_{AA}}{dt} = -kD_{AA} \quad (8.5)$$

Où : «  $D_{AA}$  » est la dégradation de l'activité anti-oxydante au cours du stockage, «  $t$  » est la durée de stockage et «  $k$  » la constante de dégradation.

Après linéarisation de l'équation, la constante «  $k$  » est déterminée graphiquement, ensuite le temps de demi-vie «  $t_{1/2}$  » est calculé en utilisant l'équation (8.6).

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{k} \quad (8.6)$$

#### 8.2.4. Évaluation de l'activité antidiabétique avant et après formulation

L'évacuation de l'activité antidiabétique in-vivo de la formulation en utilisant le même matériel animal et les mêmes procédures décrites dans la partie 7.2.5.

Cette étude consiste en l'administration d'une dose unique de traitement pour les cinq groupes de rats (tableau 8.3).

**Tableau 8.3** : Procédure expérimentale de l'activité antidiabétique in-vivo.

Les groups d'animaux :	Induction du diabète par l'alloxane:	Traitement:
Groupe 1: physiologique	Non	-
Groupe 2: témoin négatif	Oui	-
Groupe 3	Oui	Extrait de sauge (100mg/kg)
Groupe 4	Oui	S3 (équivalent de 100 mg/kg d'extrait de sauge)

### 8.3. Résultats et discussions

#### 8.3.1. Préparation et caractérisation des microcapsules

##### 8.3.1.1. Optimisation du procédé de microencapsulation

Les taux d'encapsulation pour les différentes microcapsules préparées sont donnés dans le tableau 8.4. L'essai n°1 présente le meilleur taux d'encapsulation (71.25%) dans les conditions optimales qui sont : un ratio noyau/ paroi de 1/3, un ratio gélatine/pectine de 5/3 et une quantité d'agent de durcissement de 1ml.

**Tableau 8.4** : Les taux d'encapsulation et les diamètres moyens pour les microparticules obtenues.

Essai	Facteur 1 : C/S	Facteur 2 : G/P	Facteur 3 : HA	Réponse 1 : taux d'encapsulation (%)	Réponse 2 : le diamètre moyen (µm)
MC1	-1	+1	+1	74.31 %	51.43
MC2	+1	+1	+1	43.04 %	57.13
MC3	-1	-1	+1	19.24 %	-(*)
MC4	+1	-1	+1	13.47 %	-
MC5	-1	+1	-1	68.44 %	52.12
MC6	+1	+1	-1	39.42 %	54.53
MC7	-1	-1	-1	16.91 %	-
MC8	+1	-1	-1	11.87 %	-

(\*): Valeur indéterminé du diamètre moyen.

#### Effets des facteurs sur le taux d'encapsulation

Les effets des facteurs et leurs interactions sur le taux d'encapsulation sont donnés dans la figure 8.1 (A). Le ratio gélatine/pectine (facteur 2) à une très grande influence positive sur le taux d'encapsulation tandis que le ratio noyau/paroi (facteur 1) a une influence négative, l'interaction entre les facteurs 1 et 2 présente un effet négatif sur la réponse. Les effets du facteur 3 (quantité de l'agent de durcissement) et ces interactions avec les autres facteurs sont très faibles.

Les effets des facteurs sur le taux d'encapsulation peuvent être expliqués par la nature et les propriétés des substances à encapsuler. Effectivement, les polyphénols composant l'extrait de *salvia officinalis* présentent des interactions avec la gélatine, ce qui diminue la

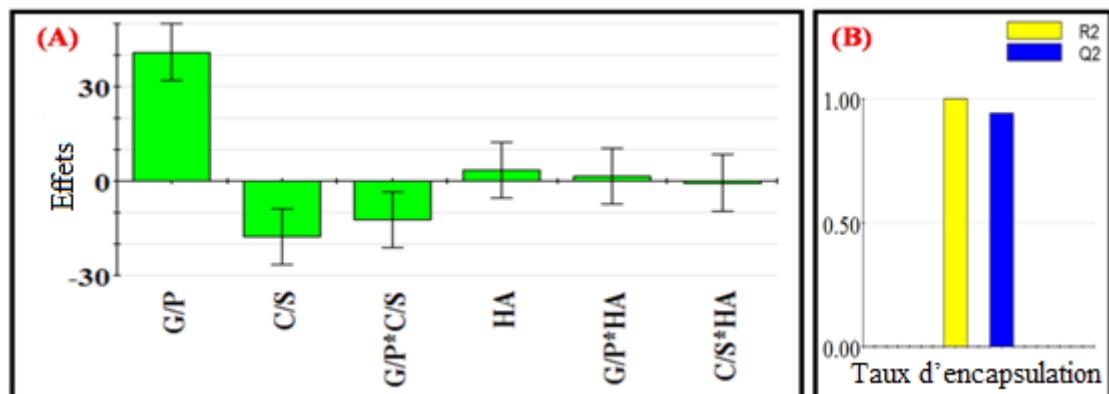
charge de ce polyélectrolyte [492], d'où l'effet négatif du ratio noyau/paroi (facteur 1) et l'effet positif du ratio gélatine/pectine (facteur 2).

De plus, contrairement à la pectine chargée négativement, la gélatine est une protéine chargée positivement [493] mais qui comporte des charges positives ( $\text{NH}_3^+$ ) et des charges négatives ( $\text{COO}^-$ ), d'où le besoin de compenser ce déficit de charges par l'augmentation du ratio gélatine/pectine.

L'agent de durcissement permet la formation de ponts entre les différentes macromolécules formant les membranes des microcapsules pour augmenter leur rigidité. L'effet très faible de la quantité de l'agent de durcissement (facteur 3) est dû à deux facteurs, le premier est la nature du procédé utilisé et le deuxième est la nature de la substance à encapsuler.

Le procédé utilisé comporte une étape de refroidissement à  $5^\circ\text{C}$  (étape 4) qui permet la gélification des microcapsules, suivie d'une étape d'agitation (étape 5) qui permet d'augmenter les interactions entre les deux polyélectrolytes et favoriser leurs interactions électrostatiques, ce qui permet un bon durcissement des microcapsules.

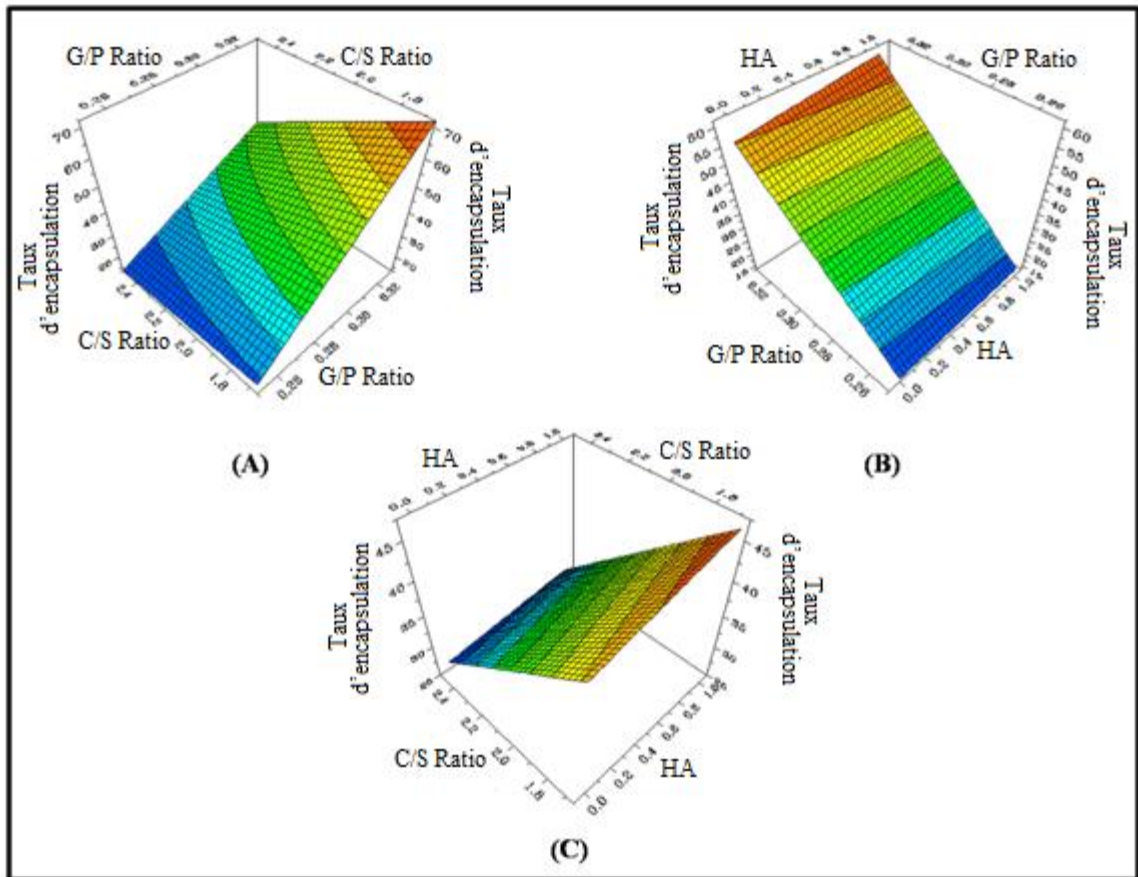
Les polyphénols encapsulés présentent un effet d'agent de durcissement des microcapsules à base de gélatine obtenue par un procédé de coacervation [494], d'où le très faible effet de la quantité de l'agent de durcissement (facteur 3) sur le taux d'encapsulation.



**Figure 8.1 :** (A) Effets des facteurs et leurs interactions sur le taux d'encapsulation, (B) Histogrammes des coefficients de corrélation et de prédiction.

### Prédiction des résultats et modélisation mathématique

Les surfaces de réponses représentant l'influence des facteurs sur le taux d'encapsulation sont données dans la figure 8.2.



**Figure 8.2 :** Surfaces des réponses représentant les prédictions du taux d'encapsulation dans le procédé étudié.

Pour une quantité fixe d'agent de durcissement (0.5ml), la surface de réponse (8.2.A) montre que le taux d'encapsulation augmente lorsque le ratio gelatine/pectine augmente et le ratio noyau/paroi diminue.

Pour un ratio noyau/paroi fixe (7/24), la surface de réponse (8.2.B) montre que le taux d'encapsulation augmente lorsque le ratio gelatine/pectine augmente, tandis que la quantité de l'agent de durcissement n'a pratiquement aucun effet sur la réponse.

Pour un ratio gelatine/pectine fixe (25/12), la surface de réponse (8.2.C) montre que le taux d'encapsulation augmente lorsque le ratio noyau/paroi diminue et la quantité de l'agent de durcissement augmente.

Le modèle mathématique donnant le taux d'encapsulation en fonction du ratio gelatine/pectine, le ratio noyau/paroi et la quantité de l'agent de durcissement pour le procédé de microencapsulation étudié est le suivant :

$$\text{Taux d'encapsulation} = - 8.887 * (C/S) + 20.465 * (G/P) + 1.677 * (HA) - 6.185 * (G/P) * (C/S) - 0.372 * (C/S) * (HA) + 0.694 + (G/P) * (HA) + 36.323$$

Le modèle obtenu nous permettra de prédire les taux d'encapsulations pour des valeurs proposées des facteurs, la valeur P du modèle mathématique obtenu par l'analyse ANOVA est de 0.012, donc le modèle mathématique est statistiquement significatif ( $P < 0.05$ ).

#### Coefficient de corrélation et coefficient de prédiction

La figure 8.1 (B) représente les coefficients de corrélation et de prédiction pour les résultats obtenus. Le coefficient de corrélation  $R^2 = 0.984$  et le coefficient de prédiction  $Q^2 = 0.969$ , nous ont permis de déduire que le modèle obtenu à une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux (la valeur de  $R^2$  se rapproche de 1) et nous avons la possibilité de prédire des résultats en dehors des intervalles imposés pour les facteurs (la valeur de  $Q^2$  se rapproche de 1).

#### 8.3.1.2. Observations microscopiques et diamètres moyens des microcapsules

La photographie représentant l'aspect macroscopique de toutes les formulations réalisées est donnée dans la figure 8.3 (A), on observe la présence de deux phases. La première phase est le surnageant qui est de couleur transparente et claire, la deuxième est le sédiment opaque et foncé.

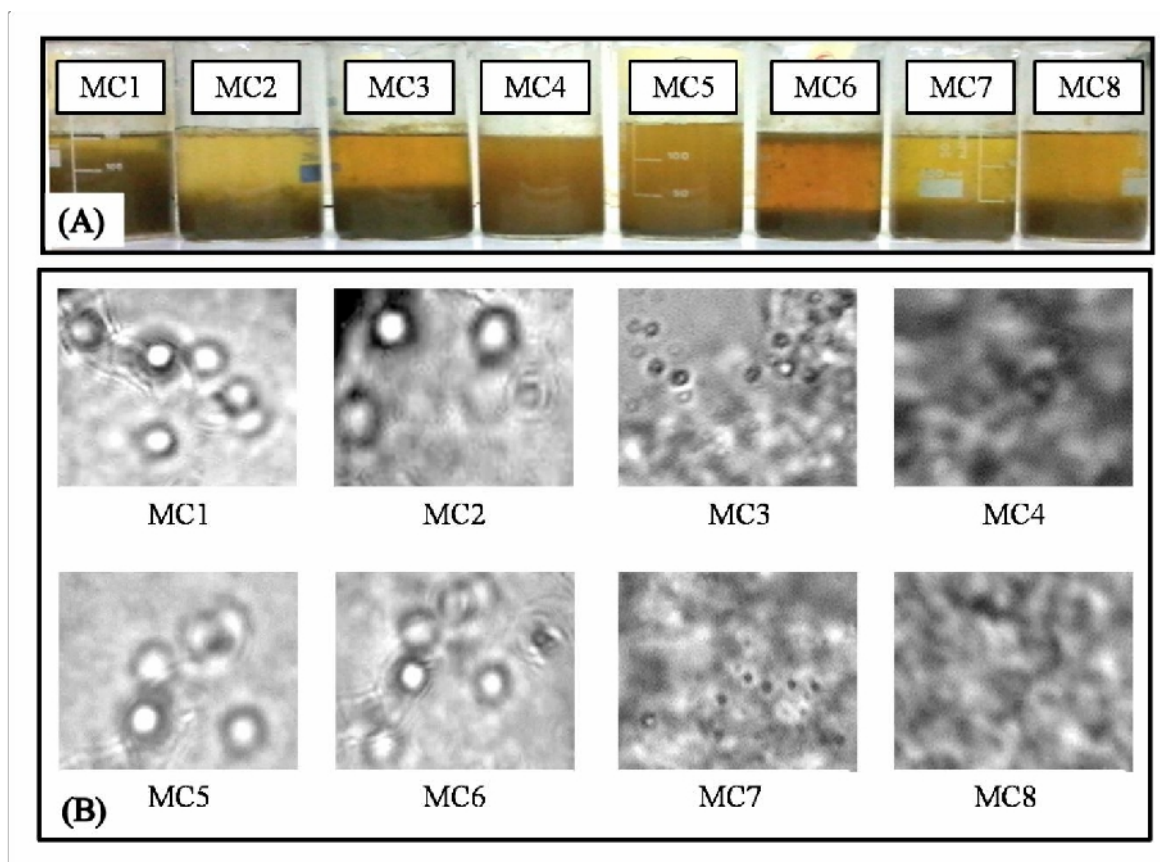
La figure 8.3 (B) représente aussi les microphotographies de microcapsules obtenues pour chaque essai, les microcapsules MC1, MC2, MC5 et MC6 présentent des structures sphériques avec des bords bien délimités. Par contre les microcapsules MC3, MC4, MC7 et MC8 présentent de très petites particules agglomérées et des amas de polymères formant des films dans lesquels la matière active est piégée.

Le ratio gélatine/pectine (facteur 2) est le plus influant sur l'aspect des microcapsules obtenues. Pour un ratio gélatine/pectine de 5/3, les microcapsules ont une forme sphérique avec des bords bien réguliers. Par contre pour un ratio de 5/2, les microcapsules sont en forme d'amas et de films.

Cette formation d'agglomérats, de flocs et de films est due à la quantité très importante de pectine comparée à la quantité de gélatine utilisée. Effectivement, lors de l'encapsulation d'une substance bioactive en utilisant la technique de coacervation complexe et mettant en jeu un système protéine-polysaccharide, la quantité de protéine doit toujours être supérieure

à la quantité de polysaccharides [495]. De plus, la pectine possède des propriétés filmogène [496], ce qui donne un aspect de film aux formulations MC3, MC4, MC7 et MC8.

Les diamètres moyens des microcapsules préparées sont donnés dans le tableau 3. Les diamètres obtenus pour les microcapsules MC1, MC2, MC5 et MC6 sont de l'ordre de 51.43, 57.13, 52.12 et 54.53  $\mu\text{m}$ , respectivement. On remarque que ces valeurs sont très voisines, ce qui nous permet de dire que le ratio noyau/paroi (facteur 1) et la quantité de l'agent de durcissement (facteur 3) ne présentent pas d'influence sur le diamètre de microcapsules obtenues.



**Figure 8.3** : (A) Photographie des formulations obtenues avant l'étape de filtration des microcapsules (phénomène de séparation de phase et sédimentation des microcapsules) et (B) Microphotographies de toutes les microcapsules obtenues à un grossissement X50.

### 8.3.2. Préparation et caractérisation des suspensions

Les suspensions préparées présentent un aspect organoleptique plus ou moins similaire, avec une odeur caractéristique de la sauge, une couleur verte et un aspect homogène.

### 8.3.2.1. Caractéristiques physicochimiques

Le tableau 8.5 représente les caractéristiques physico-chimiques des trois suspensions préparées.

**Tableau 8.5** : Les caractéristiques physico-chimiques des suspensions préparées.

Caractéristiques	Suspension 1	Suspension 2	Suspension 3
Diamètre moyen ( $\mu\text{m}$ )	$52.8 \pm 3.05$	$54.1 \pm 3.12$	$79.4 \pm 4.58$
Potentiel zeta (mV)	$-17.23 \pm -0.99$	$-13.41 \pm -0.77$	$-61.37 \pm -3.54$
Viscosité (Pa.s)	$31.52 \pm 1.82$	$27.05 \pm 1.56$	$22.93 \pm 1.32$

Les diamètres moyens des suspensions S1, S2 et S3 sont  $52.8 \pm 3.05\mu\text{m}$ ,  $54.1 \pm 3.12\mu\text{m}$  et  $79.4 \pm 4.58\mu\text{m}$  respectivement. On remarque que les diamètres des microcapsules ont augmenté après leurs mises en suspensions. Cette augmentation est due à l'adsorption des agents stabilisants sur la surface des microcapsules. Effectivement, la gomme xanthane, la tragacanthé et l'alginate de sodium sont des polymères anioniques portant des charges négatives [497] et les microcapsules à base de gélatine est de pectine présentent une charge de surface positive [498], donc les interactions électrostatiques permettent la fixation des polymères sur la surface des microcapsules [499,500] d'où l'augmentation de leurs diamètres.

Les potentiels zêta des suspensions S1, S2 et S3 sont  $-17.23 \pm -0.99\text{mV}$ ,  $-13.41 \pm -0.77\text{mV}$  et  $-61.37 \pm -3.54\text{mV}$  respectivement. Les valeurs négatives du potentiel zeta sont dues aux charges portées sur les différents polyanions utilisés dans chaque formulation, la différence du potentiel zêta entre les différentes suspensions est due à la capacité de chaque polymère à s'adsorber sur la surface des microparticules [501]. On remarque que le potentiel zêta de la suspension S3 est très important par rapport aux suspensions S1 et S2, ce qui nous permet de dire que l'alginate de sodium s'adsorbe très efficacement aux microcapsules à base de gélatine-pectine. Ce résultat permet d'expliquer l'augmentation très importante du diamètre moyen des microcapsules de la suspension 3 comparé aux suspensions S1 et S2.

Les viscosités des suspensions S1, S2 et S3 sont  $31.52 \pm 1.82\text{Pa.s}$ ,  $27.05 \pm 1.56\text{Pa.s}$  et  $22.93 \pm 1.32\text{Pa.s}$  respectivement. La viscosité très importante des suspensions stabilisées par la gomme xanthane et la gomme de dragon (S1 et S2) par rapport à la suspension S3 qui est stabilisée par l'alginate de sodium est expliquée par le fait que les gommages ont un



effet viscosifiant très important [502] tandis que l'alginate de sodium a un effet viscosifiant moyen [503].

### 8.3.2.2. Activité antioxydante

Le tableau 8.6 représente les valeurs de l'activité antioxydante des suspensions préparées et de leurs différents constituants.

**Table 8.6:** Activité antioxydante des suspensions préparées et de leurs différents constituants.

Systemes	Contenu	AA (%)
Extrait de sauge (5mg/ml)	5mg	97.49
Gélatine (5mg/ml)	5mg	48.97
Pectine (5mg/ml)	5mg	47.11
Microcapsules (5mg/ml)	1.25mg d'extrait de sauge. 2.68mg de gélatine. 1.07mg de pectine.	96.89
Gomme xanthane (5mg/ml)	5mg	42.84
Tragacanthé (5mg/ml)	5mg	47.83
Alginate de sodium (5mg/ml)	5mg	34.69
Suspension S1 (5mg/ml)	0.125mg d'extrait de sauge. 0.268mg de gélatine. 0.107mg de pectine. 0.025mg de gomme xanthane.	96.46
Suspension S2 (5mg/ml)	0.125mg d'extrait de sauge. 0.268mg de gélatine. 0.107mg de pectine. 0.025mg de gomme tragacanthé.	95.29
Suspension S3 (5mg/ml)	0.125mg d'extrait de sauge. 0.268mg de gélatine. 0.107mg de pectine. 0.025mg d'alginate de sodium.	96.65

On remarque que l'activité antioxydante de l'extrait de sauge est nettement plus importante que les différents polymères utilisés pour l'encapsulation (gélatine et pectine) et la dispersion des microcapsules (gomme xanthane, tragacanthé et alginate de sodium), cette très forte activité antioxydante est due aux différents polyphénols contenus dans l'extrait de *salvia officinalis*. Effectivement l'analyse HPLC préalablement réalisée a montré la

dominance des flavonoïdes (rutine et quercitrine) et la présence des acides phénoliques (l'acide caféique, l'acide ferulique et l'acide rosmarinique)

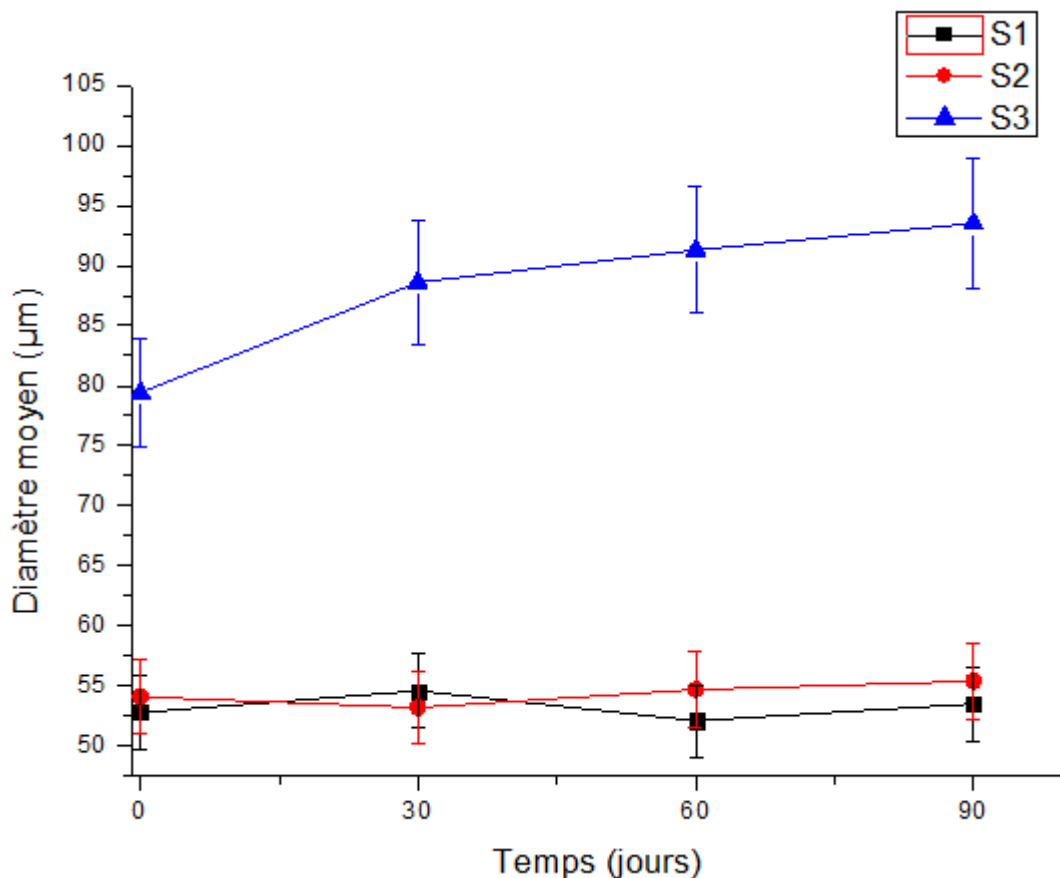
On remarque que l'activité antioxydante de l'extrait de sauge augmente après sa microencapsulation et sa dispersion. Ce résultat était prédictible selon les études réalisées par [504] montrant l'augmentation de l'activité antimicrobienne du D-limonène après sa microencapsulation.

### 8.3.3. Étude de stabilité des suspensions

Au cours du stockage, aucun changement des paramètres organoleptiques (couleur, odeur et aspect) n'a été observé.

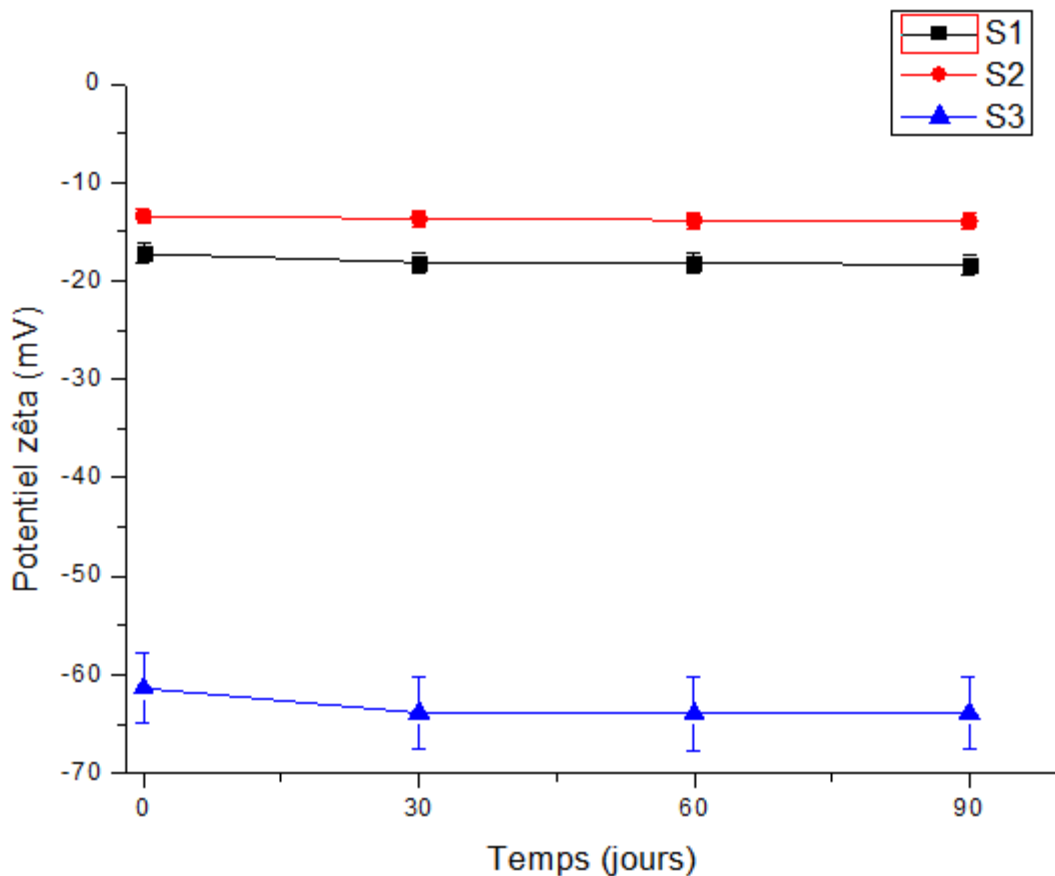
#### 8.3.3.1. Effet de la durée de stockage sur les caractéristiques physico-chimiques

La figure 8.4 représente l'évolution des diamètres moyens des microcapsules au cours du stockage des différentes formulations.



**Figure 8.4** : Evolution des diamètres moyens des microcapsules au cours du stockage.

Les diamètres moyens des suspensions S1 et S2 restent pratiquement stables au cours de la conservation. Le diamètre moyen des microcapsules de la suspension S3 augmente d'une manière significative après 30 jours de stockage, cette augmentation est due à la continuité de la fixation de l'alginate de sodium sur la surface des microcapsules, au-delà de 30 jours, on remarque que le diamètre devient plus stable. Effectivement le temps de l'adsorption d'un polymère sur une surface peut prendre plusieurs jours avant d'atteindre une phase d'équilibre [505].

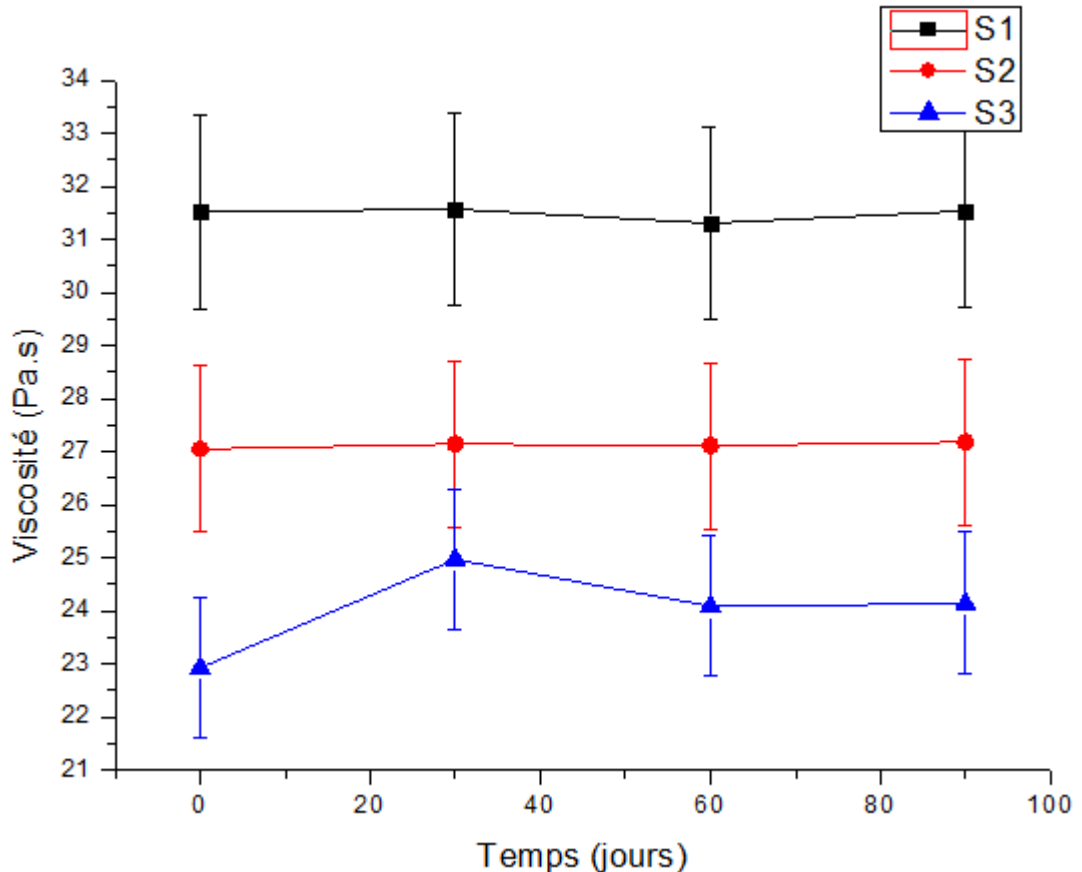


**Figure 8.5 :** Evolution du potentiel zêta des suspensions au cours du stockage.

La figure 8.5 représente l'évolution des potentiels zêta des suspensions au cours du stockage. Les potentiels zêta des suspensions S1 et S2 restent pratiquement stables au cours du stockage tandis que la suspension S3 présente une légère élévation du potentiel zeta après 30 jours de stockage. Cette élévation est due à l'augmentation du nuage macromoléculaire autour des microcapsules qui est principalement composé de chaînes d'alginate de sodium chargées positivement.

La figure 8.6 représente l'évolution des viscosités des suspensions au cours du stockage.

Les viscosités des suspensions S1 et S2 restent pratiquement stables au cours du stockage tandis que la suspension S3 présente une légère augmentation de la viscosité après 30 jours de stockage, cette augmentation est due à l'augmentation du diamètre moyen des microcapsules contenues dans les différentes suspensions. Effectivement, lorsque la taille des particules d'une dispersion augmente sa viscosité augmente [506].



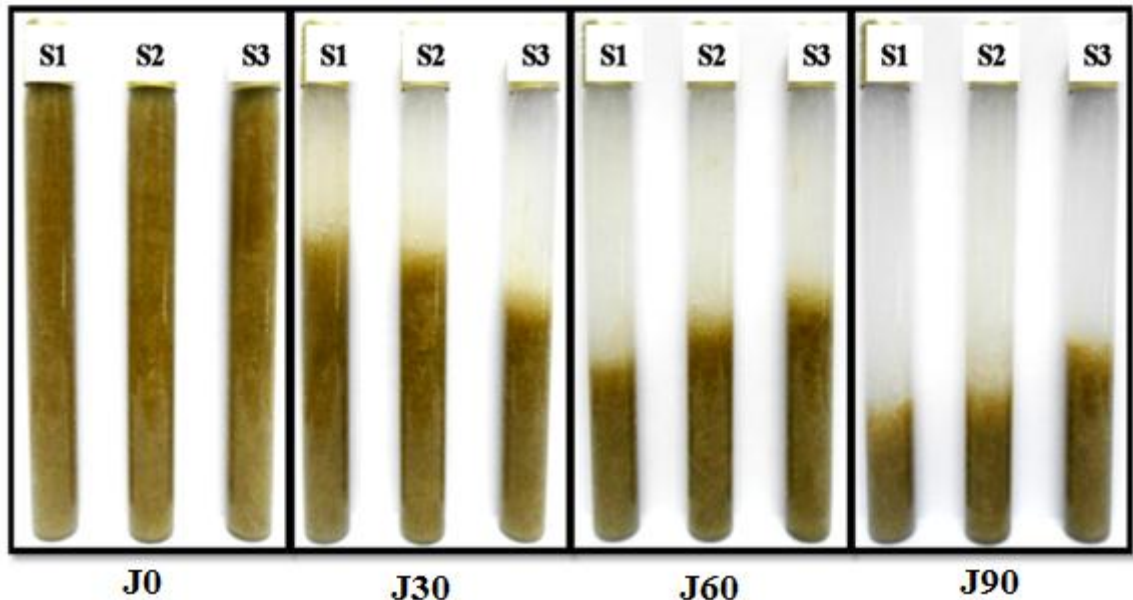
**Figure 8.6 :** Evolution de la viscosité des suspensions au cours du stockage.

### 8.3.3.2. Effet de la durée de stockage sur la sédimentation des microcapsules

La figure 8.7 représente des photographies des suspensions formulées, après 30, 60 et 90 jours de stockage à 25°C, montrant clairement l'évolution du phénomène de sédimentation.

La figure 8.8 représente l'évolution des volumes de sédimentations au cours du stockage pour chaque suspension. Après 30 jours, le volume de sédimentation pour la suspension S3 est plus faible que pour les suspensions S1 et S2, ce résultat est dû à la différence de viscosité. Lorsque la viscosité d'une dispersion augmente, la vitesse de sédimentation de particules dispersées diminue [507]. Après 90 jours de stockage, les suspensions S1 et S2 présentent un très faible volume de sédiment comparé à la suspension S3, ceci est dû au

diamètre plus important des microcapsules formant la suspension S3 et aux très grandes forces de répulsions entre les différentes microcapsules dues à leurs valeurs très importantes du potentiel zêta.



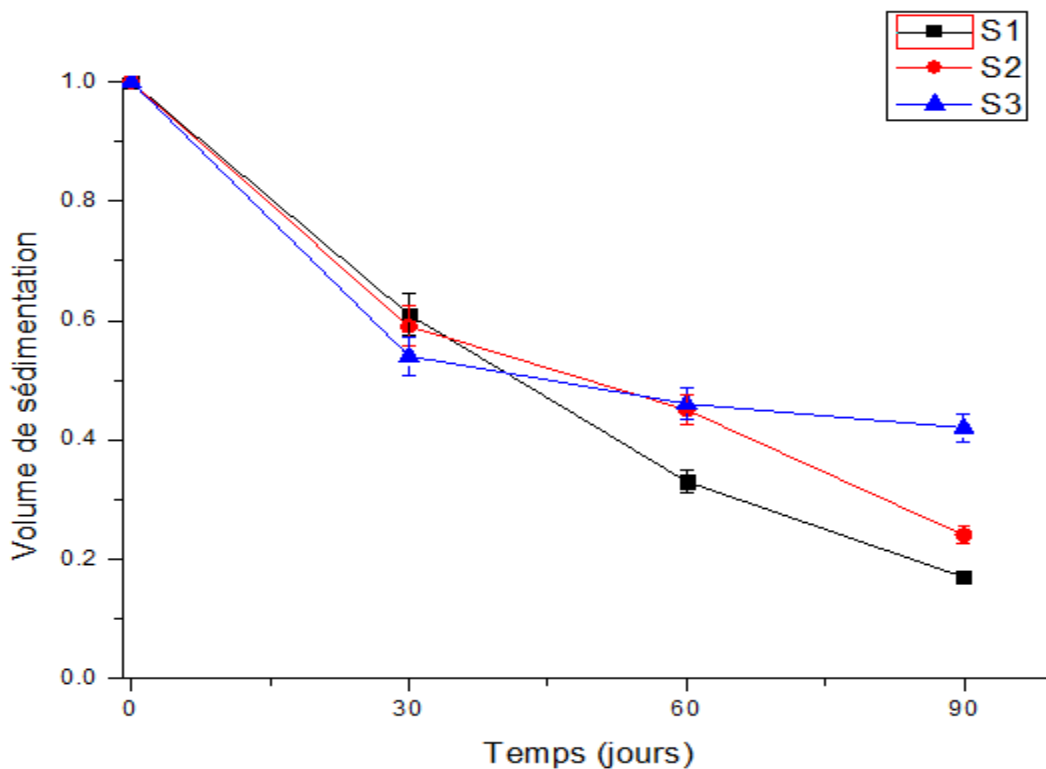
**Figure 8.7 :** Photographies des suspensions montrant l'évolution du phénomène de sédimentation.

### 8.3.3.3. Étude de la redispersibilité des microcapsules sédimentées et proposition des mécanismes de stabilisation des suspensions

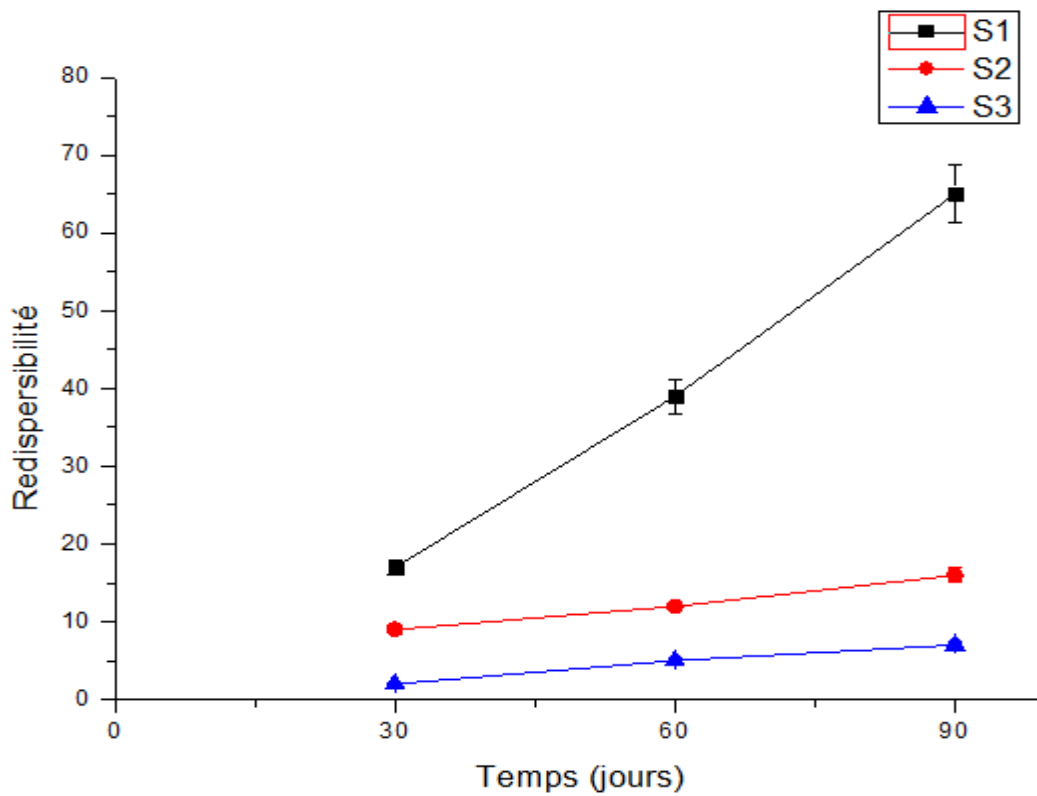
La figure 8.9 représente l'évolution de la redispersibilité des suspensions au cours du stockage. Les résultats montrent que plus la durée de stockage augmente, la redispersibilité devient plus difficile.

La suspension S3 présente une redispersibilité plus rapide comparée aux suspensions S1 et S2, car son volume de sédimentation est plus important.

Le mécanisme proposé pour la stabilisation de la suspension S3 par l'alginate de sodium est représenté dans la figure 8.10, il est basé sur la capacité de ces macromolécules de très grande charge négative à s'adsorber sur la surface des microcapsules, ce qui augmente leurs diamètres et leurs potentiels zêta d'où l'augmentation des forces de répulsions entre les particules et l'augmentation des espaces entre les particules sédimentées.



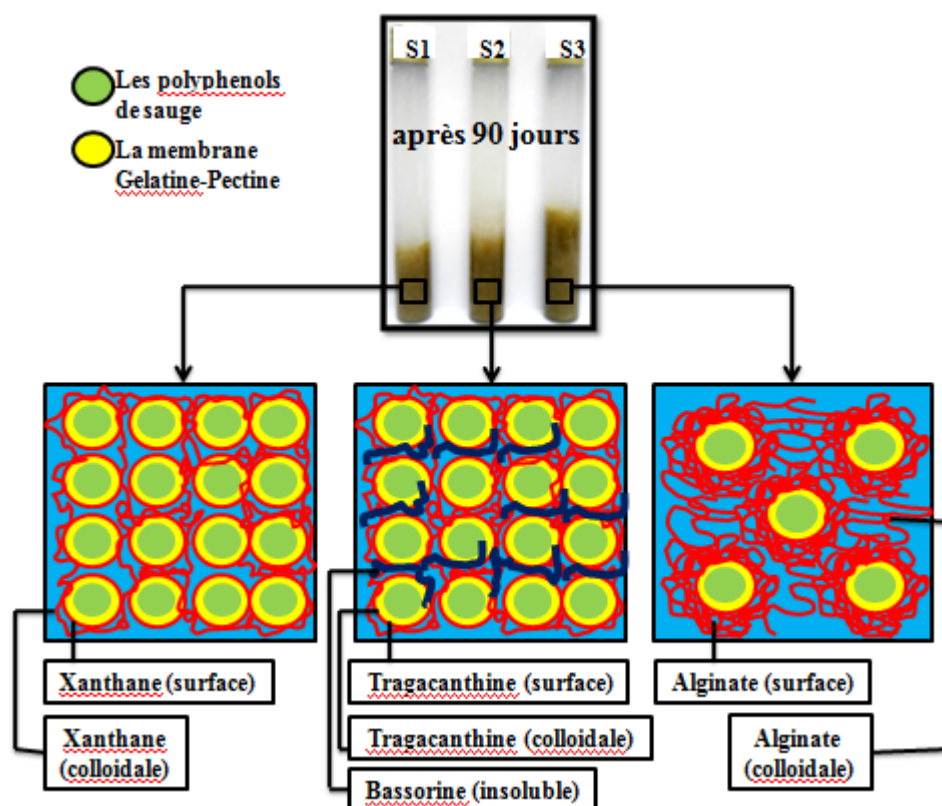
**Figure 8.8 :** Evolution des volumes de sédimentations des suspensions au cours du stockage.



**Figure 8.9 :** Evolution de la redispersibilité des suspensions au cours du stockage.

La suspension S2 présente une redispersibilité plus rapide comparée à la suspension S3. Le mécanisme proposé pour la stabilisation de la suspension S2 par la tragacanthine est représenté dans la figure 8.10, il est basé sur la composition chimique de la tragacanthine. La tragacanthine est composée de deux polysaccharides, la tragacanthine qui est un hydrocolloïde soluble dans l'eau qui permet d'augmenter la viscosité de la suspension et les bassorines qui sont insolubles dans l'eau et qui se sédimentent en même temps que les microcapsules [508,509]. Les bassorines sédimentées permettent une séparation mécanique entre les différentes microcapsules, ce qui évite les phénomènes de floculation et d'agrégation des microcapsules sédimentées, et qui permet aussi de faciliter leur redispersibilité.

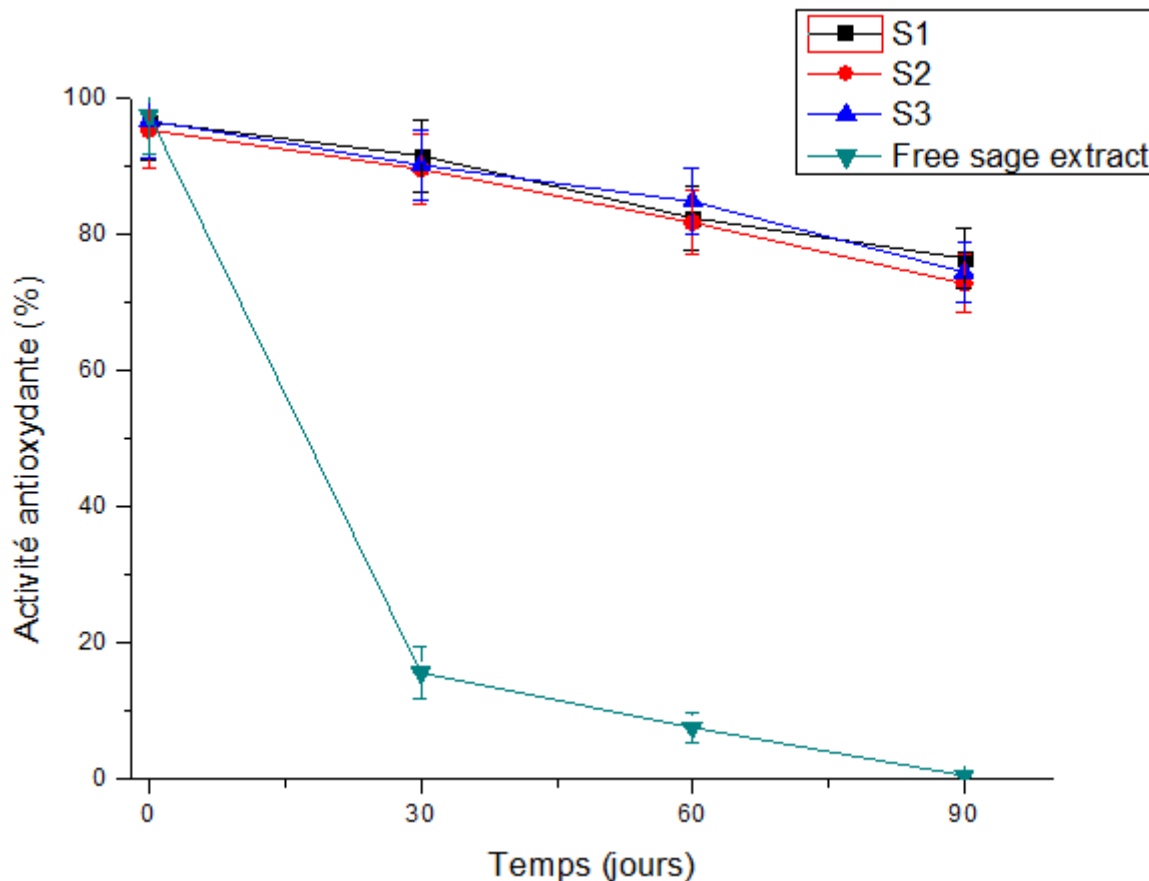
La suspension S1 stabilisée par la gomme xanthane est celle qui représente la plus difficile redispersibilité. Cette difficulté est due au mécanisme de stabilisation de la suspension S2 par la gomme xanthane qui est basée principalement sur le pouvoir viscosifiant du polymère (figure 8.10) qui permet de ralentir au maximum la sédimentation, mais une seule fois les microcapsules sont sédimentées, elles commencent à former des agrégats [510] et leurs redispersibilité devient très difficile.



**Figure 8.10 :** Mécanismes de stabilisation proposés pour chaque agent dispersant.

### 8.3.3.4. Effet de la durée de stockage sur la dégradation de l'activité antioxydante

La figure 8.11 représente l'évolution de la dégradation de l'activité antioxydante des suspensions et de l'extrait de sauge au cours du stockage.



**Figure 8.11** : Evolution de la dégradation de l'activité antioxydante des suspensions et de l'extrait de sauge libre au cours du stockage.

Les suspensions présentent une faible dégradation de l'activité antioxydante comparées à l'extrait de *salvia officinalis* libre.

Les valeurs des constantes cinétiques du premier ordre « K », des coefficients de corrélations «  $R^2$  » et des temps de demie vie «  $t_{1/2}$  » sont données dans le tableau 8.7, on remarque que leurs valeurs pour les trois suspensions se rapprochent beaucoup, tandis que pour l'extrait libre, la valeur de la constante cinétique « K » augmente et la valeur du temps de demie vie «  $t_{1/2}$  » diminue d'une manière très importante. Les résultats obtenus concordent parfaitement avec les travaux réalisés par [511-513].



La diminution de l'activité antioxydante de l'extrait de sauge est due à l'oxydation des polyphénols par l'eau et l'oxygène, et ces réactions sont catalysées par les conditions environnementales comme la lumière et la température [514,515].

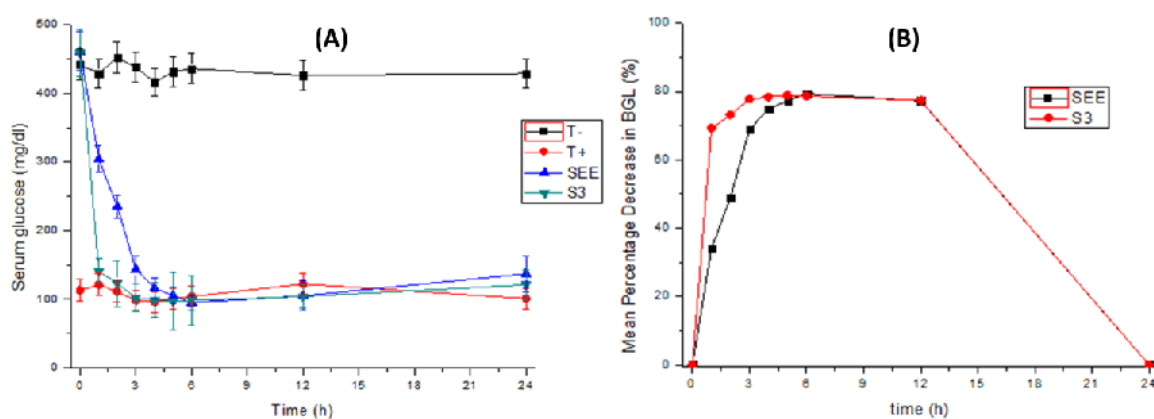
Les suspensions contenant l'extrait encapsulé dans une membrane à base de gélatine-pectine entourées par les agents stabilisants (gomme xanthane, tragacathe ou l'alginate de sodium) exerce un effet protecteur sur les molécules bioactives contenues dans l'extrait de sauge contre les agressions environnementales.

**Tableau 8.7** : Les valeurs des constantes « K » et des temps de demie vie «  $t_{1/2}$  » pour les suspensions et l'extrait libre.

	K (jours <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (jours)
Suspension S1	0.00268	0.97859	258.63700
Suspension S2	0.00301	0.97330	230.28145
Suspension S3	0.00282	0.95030	245.79687
Extrait de sauge libre	0.05437	0.93323	12.74870

#### 8.3.4. Évaluation de l'activité antidiabétique avant et après formulation

Les évolutions de la glycémie chez les différents rats au cours du temps sont données dans la figure 8.12.



**Figure 8.12** : Evolution de la glycémie chez les rats des différents lots.

La glycémie pour les rats non diabétiques (groupe 1) et les rats diabétiques non-traités (groupe 2) est stable durant toute la durée des expériences, a des valeurs de 101mg/dl et 429mg/dl, respectivement.

Les caractéristiques pharmacocinétiques (diminution maximale de la glycémie, temps de réponse maximal, temps de demi-vie et la surface de diminution de la glycémie) des différents traitements testés sur les rats diabétiques (groupe 3 et 4) sont données dans la figure 8.12 (B) et le tableau 8.9.

#### 8.3.4.1. Diminution maximale de la glycémie

La formulation S3 représente une diminution maximale de la glycémie de 79.3% qui est plus importante que celle de l'extrait de sauge libre qui est égale à 78.74%. L'augmentation de cette activité antidiabétique peut être justifiée par l'augmentation de la solubilité in-vitro de la substance active qui correspond à l'augmentation de la biodisponibilité in-vivo [516-519].

#### 8.3.4.2. Temps de réponse maximal

Le temps de réponse maximal est estimé à 6h pour le SEE et la S3, ce temps de réponse retardé est dû à la nature des molécules contenues dans l'extrait éthanolique, principalement des diterpènes et triterpènes. Effectivement, la solubilité de ces molécules organiques contenant un grand nombre de carbones sont solubilisées lentement dans les milieux aqueux et leur biodisponibilité est très lente [520].

#### 8.3.4.3. Le temps de demi-vie et la surface de diminution de la glycémie

Le temps de demi-vie diminue et la surface de diminution de la glycémie augmente après la formulation de l'extrait. Ces changements sont dus à l'augmentation de la solubilité des molécules bioactives contenues dans l'extrait au contrôle de leur diffusion à travers la membrane polymérique de la formulation.

**Tableau 8.9** : Les caractéristiques pharmacologiques des différentes formulations.

Paramètres pharmacocinétiques	Traitements	
	SEE	S3
Diminution maximale de la glycémie (%)	78.74	79.3
Temps de réponse maximal (h)	6	6
Temps de demi-vie (h)	1.57	1.03 h
Surface de diminution de la glycémie (%.h)	1277	1348.91

#### 8.4. Conclusion

L'extrait de *Salvia officinalis* composé principalement de polyphénols (acide caféique, acide rosmarinique, quercitine et rutine), peut être encapsulé dans une membrane à base de gélatine et de pectine en utilisant un procédé de coacervation complexe.

Ce travail a permis de proposer les mécanismes de stabilisation des suspensions à base des microcapsules préparées, en utilisant la gomme xanthane, la tragacathe et l'alginate de sodium comme agent dispersant. Le nombre important de charges négatives sur les chaînes polymériques de l'alginate de sodium et sa grande capacité à s'adsorber sur les surfaces chargées positivement, lui permet d'assurer la stabilisation de la dispersion durant 120 jours à 25°C.

L'activité antioxydante de l'extrait de sauge augmente de manière significative après sa formulation, de plus la dégradation de cette activité au cours du stockage a diminué de manière considérable grâce à l'effet protecteur des polymères utilisés sur les molécules bioactives composant l'extrait de sauge.

De plus, l'évaluation de l'activité antidiabétique in-vivo de l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis* et de la formulation à base de microsystèmes contenant l'extrait a montré que cette efficacité thérapeutique augmente de manière significative après formulation.

Le présent travail peut être une base pour le développement des produits commerciaux contenant des extraits de plantes ayant une activité biologique, afin de retarder leurs dates d'expiration, prolonger leurs durées d'utilisation et augmenter leurs efficacités biologiques simultanément.

## CHAPITRE 9

### EFFET DE LA FORMULATION SUR LE STRESS OXYDATIF ET L'INFLAMMATION

#### 9.1. Introduction

Le diabète, cette maladie ravageuse du siècle dernier est encore très mal prise en charge par les traitements actuels, et la plus grande preuve de cette mauvaise prise en charge et le nombre de patients qui subissent quotidiennement des complications dus à cette hyperglycémie chronique [521,522]. Parmi ces nombreuses complications on compte deux complications principales : la première complication est l'ensemble des phénomènes inflammatoires chez les diabétiques qui sont la première cause des ulcères, des hémorragies, du retardement de la cicatrisation et surtout des amputations ; la deuxième complication est la quantité de toxines libérées dans le corps du diabétique (stress oxydatif) qui est secondaire au mauvais métabolisme du glucose dans le sang, le stress oxydatif est la première cause des hépatites, des néphrites et des acidoses.

Le stress oxydatif est une complication physiopathologique qui induit des changements des structures et des fonctions de manière irréversibles sur les différents organes et tissus des êtres humains et des animaux, ce phénomène est en même temps un facteur permettant l'induction du diabète (destruction des îlots de Langerhans par les radicaux libres) et une complication du diabète (dans un organisme diabétique, l'hyperglycémie continue et permanente favorise la formation des radicaux libres) [523].

*Salvia officinalis* est une plante médicinale traditionnellement utilisée pour le traitement de plusieurs maladies et ces propriétés antioxydantes ont largement été étudiées dans la bibliographie. L'activité anti-inflammatoire de la sauge a été étudiée pour la première fois en 2001 [524] en utilisant le protocole de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton sur les souris, ce n'est qu'en 2010 que ces études ont été reprises pour confirmer que cette plante a une très bonne activité anti-inflammatoire, plusieurs modèles in-vivo et in-vitro ont été utilisés à cet effet notamment le modèle des macrophages stimulées par les lipopolysaccharides [525,526], l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton [527] la culture in-vitro des cellules HGF-1 [528], la péritonite du rat [529], l'œdème de la patte induit par le glutamate et la capsaïcine [530], et l'œdème de la patte induit par la carraghénine sur les rats [527,531-533].

Lors de cette dernière partie de la thèse, nous allons étudier l'effet de la formulation (la microencapsulation) sur les propriétés anti-inflammatoires, anti-ulcéreugénique, hépatoprotectrice et néphroprotectrice de l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis*. Nous allons commencer par étudier cet effet sur l'inflammation de la patte de la souris (activité anti-inflammatoire in-vivo), ensuite sur un modèle de cicatrisation plus complexe sur le rat (activité anti-ulcéreugénique in-vivo), et enfin sur le stress oxydatif provoqué par le tétrachlorure de carbone sur le rat (activité hépatoprotectrice et néphroprotectrice).

## 9.2. Matériels et méthodes

### 9.2.1. Effet de la formulation sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez la souris

#### 9.2.1.1. Matériel animal

Dans notre étude nous avons utilisé 24 souris Swiss albinos dont le poids varie entre 18 à 22 g. Les animaux à jeun depuis 18h ont été réparties en 4 groupes de 6 souris, comme il est indiqué dans le tableau 9.1.

**Tableau 9.1** : Procédure expérimentale de l'étude de l'activité anti-inflammatoire.

<b>Groupe</b>	<b>Indication</b>	<b>Gavage a T0</b>	<b>Traitement</b>
Groupe 1	Témoin négatif	0.5 ml d'eau physiologique	Pas de traitement
Groupe 2	Témoin positif	0.5 ml de Dichlofénac sodique	50 mg/kg Dichlofénac sodique
Groupe 3	Avant encapsulation	0.5 ml d'extrait	50 mg/kg d'extrait
Groupe 4	Après encapsulation	0.5 ml de microcapsules	Equivalent de 50 mg/kg d'extrait

#### 9.2.1.2. Étude de l'œdème de la patte induit par la carraghénine

La méthode utilisée est celle décrite par [534] avec quelques modifications.

Au temps  $t_0$  (gavage) : nous avons administré par voie intra-gastrique 0.5 ml de traitement pour chaque groupe (tableau 9.1).

Au temps  $t_0 + 30$  min : toutes les souris ont reçu 0.025 ml de solution de carraghénine à 1%, par injection sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche.

Au temps  $t_0 + 4h$  : les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale, puis les deux pattes postérieures (gauches et droites) sont coupées à hauteur de l'articulation et pesées à l'aide d'une balance analytique.

Le pourcentage d'augmentation de l'œdème (PAO) est calculé par la formule (9.1).

$$PAO = \frac{\text{poids de patte droite} - \text{poids de patte gauche}}{\text{poids de patte droite}} \times 100 \quad (9.1)$$

Le pourcentage de réduction de l'œdème (PRO) est calculé par la formule (9.2).

$$PRO = \frac{PAO_{\text{témoin négatif}} - PAO_{\text{lot traité}}}{PAO_{\text{lot traité}}} \times 100 \quad (9.2)$$

## 9.2.2. Effet de la formulation sur l'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez le rat

### 9.2.2.1. Evaluation de l'activité anti-ulcérogénique in-vivo

#### Matériel animal et procédure expérimentale

30 rats wistar femelles sont répartis en 5 lots de 6 rats chacun, les animaux sont maintenus à jeûne durant 18H avant l'expérimentation. Le protocole utilisé pour l'évaluation de l'activité anti-ulcérogénique est celui décrit par [535] avec quelques modifications.

À  $t_0$  chaque groupe reçoit un traitement par gavage intragastrique comme il est indiqué dans le tableau 9.2.

Une heure après l'administration du traitement les rats sont gavés par 1ml d'éthanol. Une heure après l'administration de l'éthanol les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale sous anesthésie kétamine à 50mg/ml. Les estomacs sont immédiatement récupérés, ouverts par la grande courbure et rincés à l'eau physiologique isotonique (solution aqueuse de 9/1000 d'NaCl).

Des photographies des estomacs sont prises pour la détermination des pourcentages de l'ulcère et des pourcentages d'inhibition, ensuite elles sont directement introduites dans le formol pour l'étude histopathologique.

**Tableau 9.2** : Procédure expérimentale de l'activité anti-ulcéreugénique in-vivo.

Groupes	Nom	Nombre de rats	Gavage a t <sub>0</sub> (traitement)	Gavage a t <sub>0</sub> +30min (éthanol)
Groupe 1	Physiologique	6	Non	Non
Groupe 2	témoin négatif	6	Non	Oui
Groupe 3	témoin positif	6	oméprazol a 50mg/Kg	Oui
Groupe 4	Traitement 1	6	extrait de <i>Salvia officinalis</i> (100mg/Kg)	Oui
Groupe 5	Traitement 2	6	Microcapsules (équivalent de 100mg/Kg d'extrait de <i>Salvia officinalis</i> )	Oui

#### Détermination des pourcentages de l'ulcère et des pourcentages d'inhibition

Les photographies prises des différents estomacs sont analysés par traitement d'image en utilisant le logiciel image-J afin de déterminer les pourcentages de l'ulcère (PU) en utilisant l'équation (9.3).

$$PU = \frac{\text{surface de l'ulcer}}{\text{surface totale de l'estomac}} \cdot 100 \quad (9.3)$$

Les pourcentages d'inhibitions de l'ulcère sont calculés pour chaque groupe en utilisant l'équation (9.4).

$$PI = \frac{PU_{\text{témoin négatif}} - PU_{\text{groupe traité}}}{PU_{\text{témoin négatif}}} \cdot 100 \quad (9.4)$$

#### Etude histopathologique

Les estomacs sont récupérés, fixé au formol durant 48H, déshydratés, ensuite des coupes histologiques de 6µm sont réalisées, enfin les lames sont colorées par une coloration HE [439]. Les lames préparés sont observé au microscope optique pour évalué les différents caractéristiques histologiques de l'ulcère selon la méthode décrite par [536] avec quelques modifications. Les cinq caractéristiques histologiques sont:

- 1- les Desquamations épithéliale.
- 2- Destruction des glandes.
- 3- œdèmes de la sous-muqueuse.
- 4- Infiltration des éosinophiles.
- 5- Hémorragies.

Les scores des caractéristiques histologiques des estomacs de chaque lot sont attribué en utilisant le système suivant : Absence (-), légère présence (+), présence (++) et forte présence (+++).

#### 9.2.2.2. Activité inhibitrice de l' $H^+,K^+$ ATPase

##### Isolation de l'enzyme $H^+,K^+$ ATPase

L'enzyme  $H^+,K^+$  ATPase est isolé a partir de muqueuses gastriques de lapins en utilisant la méthode de l'ultracentrifugation et la séparation par gradient décrite par [537]. Une partie du corps de l'estomac est sectionné et la muqueuse qui la tapisse est délicatement gratté, 10g de cette muqueuse est mélangé a 100ml de tampon pH7.4 composé de 250 mM de saccharose, 2 mM de  $MgCl_2$ , 1 mM d'acide éthylène glycol tétracétique et 2 mM de Hepes.

Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un pilon, ensuite il est centrifugé à 20.000 RPM durant 20 minutes. Le surnagent est récupéré puis centrifugé a 100.000RPM durant 60 minutes. Le culot est récupéré et remis en suspension dans une solution tampon pH7.4 à 30% de sucrose puis centrifugé à 100.000RPM durant 60 minutes, les membranes sédimentés sont utilisées comme fraction vésiculaires contenant l' $H^+/K^+$  ATPase gastrique. Toutes les manipulations ont été effectuées à des températures inférieures ou égales à 4°C (entre 2 et 4°C). Le produit obtenu est lyophilisé, congelé et stocké à -80°C jusqu'à l'utilisation.

Le dosage des protéines dans le produit a été déterminé en utilisant la méthode décrite par [538] en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

##### Détermination de l'activité inhibitrice de l' $H^+,K^+$ ATPase

L'activité inhibitrice de l' $H^+,K^+$  ATPase a été réalisé in-vitro en utilisant la méthode décrite par [539]. Brièvement, 1ml du milieu réactionnel contenant 2mM/ml  $MgCl_2$ , 40mM/ml Tris-HCl, 1mM/ml ATP et 20mM/ml KCl est mélangé a 5µg d' $H^+/K^+$  ATPase



gastrique (en présence ou absence de l'extrait de *Salvia officinalis* libre ou encapsulé). Les milieux sont incubés à 37°C durant 20min, la réaction est inhibée en ajoutant 1ml de solution froide d'acide trichloracétique à 10%. Le dosage colorimétrique du phosphate inorganique libéré par l'enzyme est effectué en utilisant le protocole décrit par [540].

L'IC50 est déterminé après l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase d'une gamme de solutions d'extrait de *Salvia officinalis* dilué dans le diméthylsulfoxyde (de 25, 50, 75, 100, 125, 150µg/ml). L'IC50 de l'oméprazol (utilisé comme standard) est déterminé de la même manière. La concentration du diméthylsulfoxyde ne doit pas dépasser 1% du milieu réactionnel (pour ne pas affecté l'activité enzymatique). Toutes les expériences sont réalisées en triple.

#### 9.2.2.3. Activité anti-hélicobacter pylori

L'activité anti-hélicobacter pylorie a été réalisé in-vitro en utilisant la méthode de dilutions sur gélose, décrite par le Comité National pour les Normes de Laboratoire Clinique [541].

La souche d'*Helicobacter pylori* utilisé est issu d'isolement clinique à partir d'une endoscopie ressee au laboratoire de microbiologie du centre hospitalo-universitaire de Mustafa Bacha (Alger, Algérie), une suspension de *H. pylori* a été préparée dans du BHIB à une opacité de 3 à 4 selon les standards McFarland (environ 109 UFC/ml).

Pour la détermination de la CMI une série de dilutions de l'extrait de *Salvia officinalis* libre ou encapsulé dans la gélose Mueller Hinton additionnée de 10% de sang de cheval ont été réalisés (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 et 0.01µg/ml), les gélises préparés sont directement coulés dans les boîtes de Petri.

Après refroidissement et solidification, les boîtes de Petri ont été inoculées avec la suspension de *H. pylori*; ensuite elles ont été incubées dans un environnement microaérophile (5% d'O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> et 85% de N<sub>2</sub>) dans un récipient anaérobie utilisant BD GasPak EZ Pouch Systems, pendant 48 heures.

La concentration de l'extrait de *Salvia officinalis* la plus faible ne montrant aucune croissance sera identifiée comme étant la CMI. Toutes les expériences sont réalisées en triple.

### 9.2.3. Effet de la formulation sur le stress oxydatif

#### 9.2.3.1. Matériel animal et procédure expérimentale

Nous avons évalué les activités hépato-néphroprotectrice sur les rats Wistar en utilisant le protocole de l'intoxication au tétrachlorure de carbone [542]. L'intoxication a été réalisée par une injection unique de CCl<sub>4</sub> et la durée du traitement était de 7 jours, comme il est indiqué dans le tableau 9.3.

**Tableau 9.3** : Procédure expérimentale de l'étude de l'activité hépato-néphroprotectrice.

Groupes	Nom	Nombre de rats	Traitement	Injection de CCl <sub>4</sub> en IP (0.025 ml)
Groupe 1	Physiologique	6	Non	Non
Groupe 2	témoin négatif	6	Non	Oui
Groupe 3	Traitement 1	6	extrait de <i>Salvia officinalis</i> (100mg/Kg)	Oui
Groupe 4	Traitement 2	6	Microcapsules (équivalent de 100mg/Kg d'extrait de <i>Salvia officinalis</i> )	Oui

Avant le sacrifice, les souris ont été mises à jeun pendant 24 heures avec accès libre à l'eau. Les animaux ont été anesthésiés par l'éther diéthylique, ensuite le prélèvement sanguin a été réalisé par ponction intracardiaque. Ensuite les autopsies ont été réalisées sur les rats afin de prélever les foies pour les analyses biochimiques et anatomopathologiques.

#### 9.2.3.2. Étude biochimique des prélèvements sanguins

Les activités sériques de l'alanine aminotransférase (ALT) et de l'aspartate aminotransférase (AST) dans le sang ont été déterminées à l'aide d'un analyseur automatique Hitachi 747.

#### 9.2.3.3. Étude biochimique des prélèvements hépatiques

Le niveau d'équilibre du malondialdéhyde (MDA), un produit final de peroxydation lipidique, a été analysé en mesurant le taux de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 535 nm, selon la méthode rapportée par [543] en utilisant le 1,1,3,3-tétraéthoxypropane comme norme. Le niveau total de glutathion a été mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de

412 nm, avec de la levure glutathion réductase, 5,5-dithio-bis (acide 2-nitrobenzoïque) et NADPH [544].

#### 9.2.3.4. Étude anatomopathologique et histologique

Elle comporte une observation macroscopique des foies entiers et un examen microscopique des coupes histologiques des foies des rats. Après le sacrifice, l'exérèse des foies entiers est aussitôt réalisée. L'observation macroscopique est qualitative se limite aux caractéristiques externes du foie (couleur, consistance et texture).

Après fixation au formole a 10% durant 48H, suivie d'une déshydratation des prélèvements de foies, des coupes histologiques de 6µm d'épaisseur sont réalisées. Les coupes passent par une étape de coloration à l'hématocriane/éosine [439] avant d'être observées sous microscope optique.

#### 9.2.4. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été analysés par ANOVA en utilisant le test de Student, les résultats sont statistiquement significatifs pour une valeur de  $P < 0.05$ .

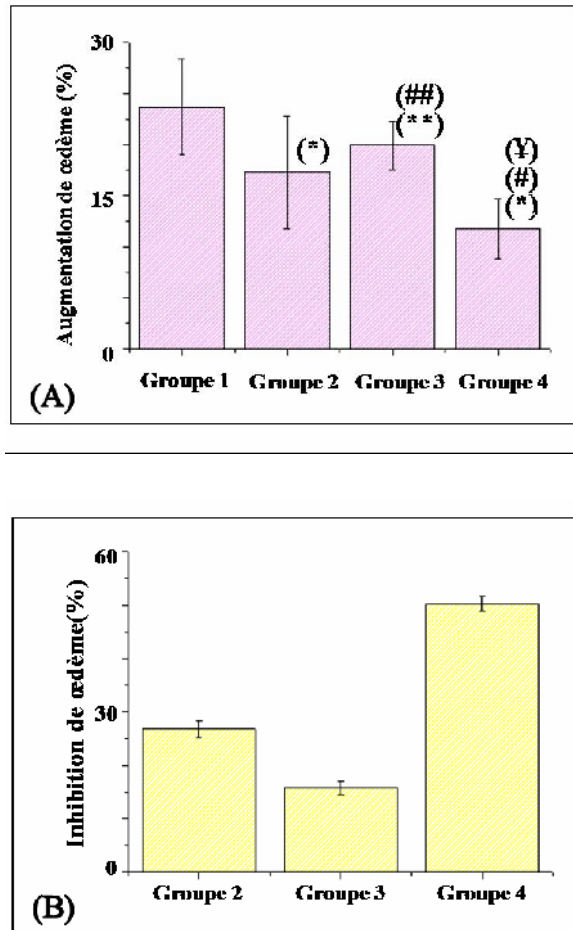
### 9.3. Résultats et discussions

#### 9.3.1. Effet de la formulation sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez la souris

La figure 9.1 (A) représente les pourcentages d'augmentation de l'œdème de la patte pour chaque groupe. Les groupes 1, 2, 3 et 4 représentent des pourcentages d'augmentation de l'œdème de  $23.65 \pm 11.48\%$ ,  $17.32 \pm 13.09\%$ ,  $19.92 \pm 5.73\%$  et  $11.76 \pm 7.16\%$ , respectivement.

Les pourcentages d'augmentation de l'œdème pour les groupes traités sont plus faibles comparés au groupe non-traité. Ce pourcentage diminue d'une manière significative ( $P < 0.05$ ) pour le groupe 2 (traité avec le diclofénac) et le groupe 4 (traité avec les microcapsules) par contre il diminue d'une manière non-significative ( $P > 0.05$ ) pour le groupe 3 (traité avec l'extrait de *Salvia officinalis*). Le pourcentage d'augmentation de l'œdème diminue d'une manière significative ( $P < 0.05$ ) pour le groupe 4 comparé au groupe 2 (traité avec le diclofénac) et le groupe 3 (traité avec l'extrait de *Salvia officinalis*).

La figure 9.2 (B) représentant les pourcentages d'inhibition de l'œdème de la patte pour chaque groupe. Les groupes 2, 3 et 4 représentent des pourcentages d'augmentation de l'œdème de  $26.77 \pm 13.09\%$ ,  $15.75 \pm 5.73\%$  et  $50.25 \pm 7.16\%$ , respectivement.



**Figure 9.1:** (A) Histogrammes représentant les pourcentages d'augmentation de l'œdème de la patte pour chaque groupe, (B) Histogrammes représentant les pourcentages d'inhibition de l'œdème de la patte pour chaque groupe. (\*) L'œdème augmente de manière significative comparé au groupe 1, (\*\*) l'œdème augmente de manière non-significative comparé au groupe 1, (#) l'œdème augmente de manière significative comparé au groupe 2, (##) l'œdème augmente de manière non-significative comparé au groupe 2, (¥) l'œdème augmente de manière significative comparé au groupe 3.

Les souris traitées par le diclofénac de sodium (groupe 2) représentent un pourcentage d'inhibition de l'œdème plus important que les animaux traités avec l'extrait de *Salvia*

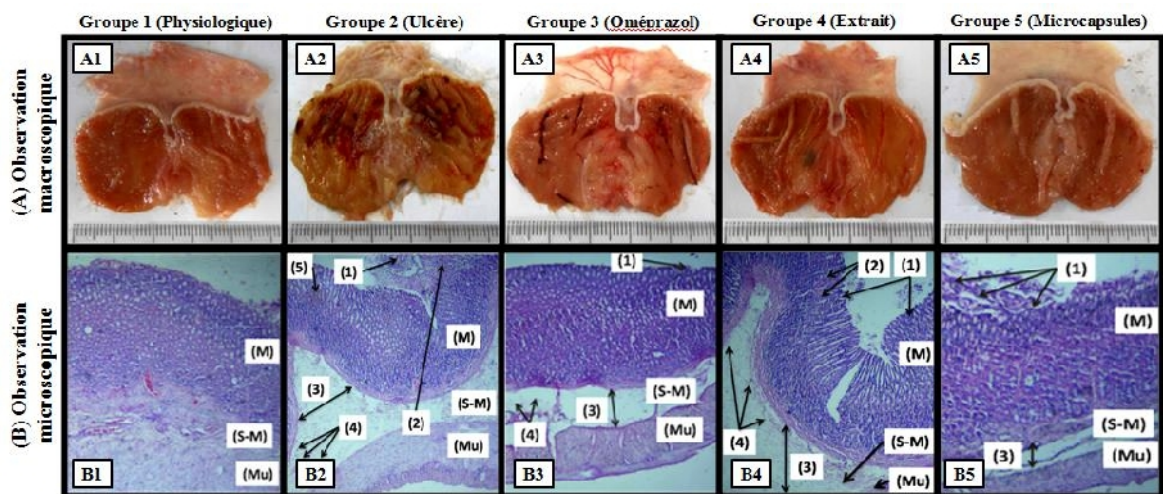
*officinalis* mais les animaux traités avec les microcapsules présentent un pourcentage d'inhibition de l'œdème plus important que celui présenté par les animaux du groupe 2.

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait de *Salvia officinalis* a augmenté d'une manière significative après sa microencapsulation. Cette augmentation de l'activité biologique correspond à l'augmentation de la biodisponibilité des molécules bioactives encapsulées. Effectivement, lors de la microencapsulation des molécules bioactives dans des membranes de polyelectrolytes, leur solubilité dans les milieux biologiques augmente ce qui favorise leur absorption par la muqueuse intestinale et augmente leur biodisponibilité et donc leurs effets thérapeutiques [545].

### 9.3.2. Effet de la formulation sur l'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez le rat

#### 9.3.2.1. Évaluation de l'activité anti-ulcéreogénique in-vivo

La figure 9.2 représente la structure macroscopique (A) et microscopique (B) des différents estomacs (physiologique, ulcéré et traité). Le tableau 9.3 représente les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des ulcères.



**Figure 9.2 :** Photographies des structures macroscopiques (A) et microscopiques (B) des différents estomacs, (A1 et B1) estomac physiologique, (A2 et B2) estomac du témoin négatif, (A3 et B3) estomac traité à l'oméprazole, (A4 et B4) estomac traité à l'extrait de *salvia officinalis*, (A5 et B5) estomac traité avec les microcapsules. Les légendes sur les structures histologiques (B) représentent : (M) muqueuse, (S-M) sous-muqueuse, (Mu) musculueuse, (1) desquamations épithéliales, (2) destruction des glandes, (3) œdèmes de la sous-muqueuse, (4) infiltration des éosinophiles et (5) hémorragies.

**Tableau 9.3** : Caractéristiques macroscopiques et microscopiques des ulcères.

Groupes	Macroscopiques		Microscopiques				
	Pourcentages de l'ulcère (%)	Pourcentages d'inhibitions (%)	D.Epith	D.Glan	Œ.SM	I.Eosi	H.Ragi
Groupe 1			-	-	-	-	-
Groupe 2	10.25± 0.17		+++	+++	+++	++	++
Groupe 3	4.73± 0.18 <sup>a</sup>	53.85±1.61	+	+	++	+	-
Groupe 4	2.9± 0.26 <sup>a,b</sup>	71.71±2.43	++	+	+++	+	-
Groupe 5	1.05± 0.25 <sup>a,b,c</sup>	89.76±2.54	+	-	+	-	-

<sup>a</sup> : résultats très significatifs ( $p < 0.01$ ) comparé au groupe 2.

<sup>b</sup> : résultats très significatifs ( $p < 0.01$ ) comparé au groupe 3.

<sup>c</sup> : résultats très significatifs ( $p < 0.01$ ) comparé au groupe 4.

D.Epith : Desquamations épithéliales.

D.Glan: Destruction glandulaires.

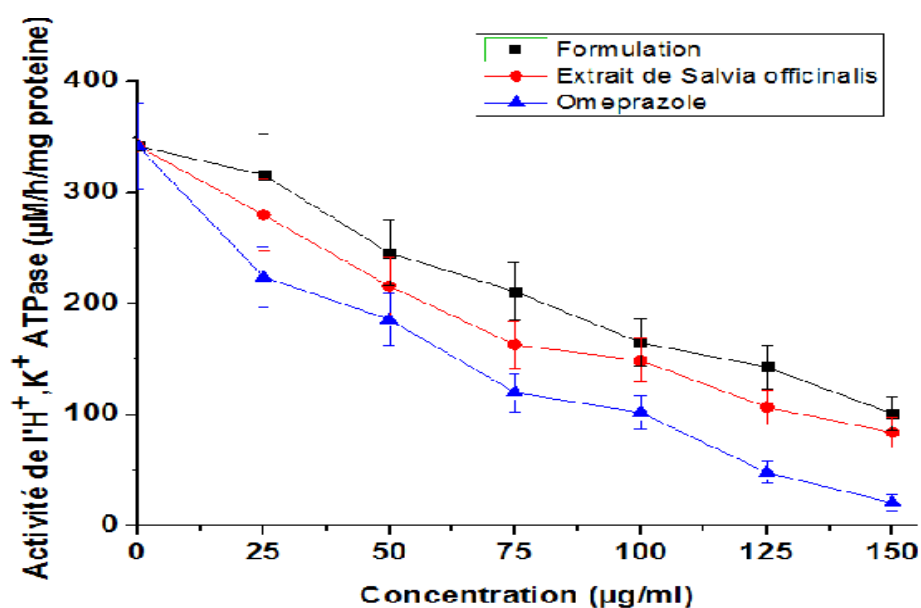
Œ.SM: Œdème de la sous muqueuse.

I.Eosi: Infiltration des éosinophiles.

H.Ragi: Hémorragies.

### 9.3.2.2. Évaluation de l'activité inhibitrice de l' $H^+/K^+$ ATPase

La figure 9.3 représente l'évolution de l'activité inhibitrice de l' $H^+/K^+$  ATPase en fonction de la concentration, pour l'extrait de *Salvia officinalis* libre, les microcapsules et l'oméprazole.



**Figure 9.3** : Evolution de l'activité inhibitrice de l' $H^+/K^+$  ATPase en fonction de la concentration pour l'extrait de *Salvia officinalis* libre, les microcapsules et l'oméprazole.

Les IC50 pour l'extrait de *Salvia officinalis* libre, les microcapsules et l'oméprozol sont  $86.08 \pm 8.69$ ,  $103.90 \pm 10.44$  et  $57.43 \pm 5.78$   $\mu\text{M/h/mg}$  de protéine, respectivement.

### 9.3.2.3. Evaluation de l'activité anti-Helicobacter pylori

Les CMI de l'helicobacter pylori pour l'extrait de *Salvia officinalis* libre, les microcapsules, et le métronidazol sont toutes de **50 $\mu\text{g/ml}$**  par contre l'ammoxiciline a présenté une CMI de **0.01 $\mu\text{g/ml}$** . L'activité anti-helicobacter pylori a montré une CMI de 50 $\mu\text{g/ml}$ , similaire pour l'extrait et les microcapsules.

### 9.3.2.4. Proposition d'un mécanisme d'action de la formulation contre l'ulcère gastrique

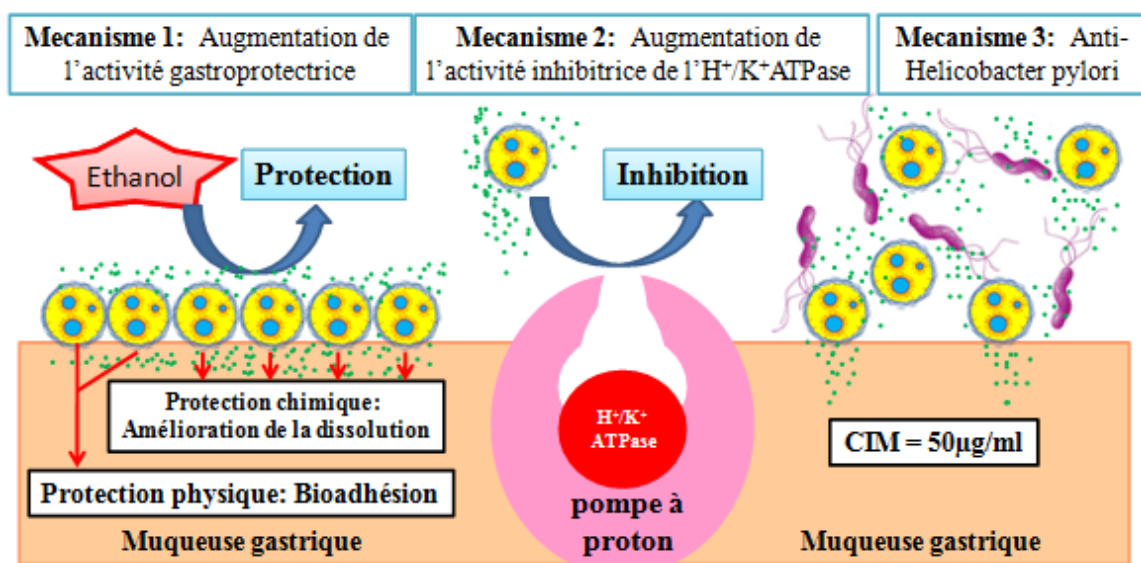
La formulation a permis d'améliorer les propriétés anti-ulcéreugénique de l'extrait de *Salvia officinalis*. Effectivement, la formulation à présenter un plus grand effet gastroprotecteur in-vivo et une plus grande inhibition de l' $\text{H}^+/\text{K}^+$  ATPase in-vitro, tout en préservant pouvoir anti-helicobacter pylori.

Notre étude nous a permis de proposer 3 mécanismes différents grace aux quels la formulation a permis d'améliorer les propriétés anti-ulcéreugénique de l'extrait de *Salvia officinalis*.

Mécanisme 1 (augmentation de l'activité gastro-protectrice in-vivo): le mécanisme proposer pour cette amélioration de l'activité gastro-protectrice de l'extrait de sauge après sa microencapsulation est basé sur deux phénomènes (figure 9.4).

Le premier phénomène est la bioadhésion ; Les propriétés bioadhésives des biopolymères composant la formulation (gélatine, pectine et alginate de sodium) [546,547] permettent aux microcapsules d'adhérer a la muqueuse gastrique et la protéger physiquement contre les agents ulcèreugènes (dans notre étude c'est l'éthanol).

Le deuxième phénomène est l'augmentation de la solubilité des molécules bioactives contenus dans l'extrait de sauge. Effectivement, l'augmentation de cette dissolution in-vitro après l'encapsulation de l'extrait de sauge correspond a l'augmentation de la biodisponibilité in-vivo et donc a une augmentation des propriétés pharmacologiques [548].



**Figure 9.4** : Mécanisme d'action des microcapsules bioadhésive contenant l'extrait de *Salvia officinalis* pour le traitement de l'ulcère.

Mécanisme 2 (augmentation de l'activité inhibitrice de l'H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in-vitro): l'augmentation de cette activité après la microencapsulation de l'extrait de sauge est due à l'augmentation des interactions entre les microcapsules contenus dans la formulation et les pompes à protons qui portent les enzymes H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (figure 9.4). Selon les études bibliographiques antérieures, les particules de petites tailles utilisées pour la délivrance des médicaments présentent un plus grand effet thérapeutique que les molécules de médicaments libres, car ces particules présentent une meilleure pénétration des tissus vivants et une plus grande interaction avec les systèmes biologiques [549].

Mécanisme 3 (préservation de l'activité anti-Helicobacter pylori): l'extrait de sauge ainsi que la formulation présentent une même anti-Helicobacter pylori. Cette activité n'a pas présenté de variation car elle n'est pas dépendante des facteurs physiques comme la solubilité ou la bioadhésion mais plutôt de la nature des pharmacophores qui agissent sur l'helicobacter pylori [550].

### 9.3.3. Effet de la formulation sur le stress oxydatif

#### 9.3.3.1. Effet de la formulation sur les paramètres biochimiques lors de l'hépatonéphrotoxicité aigue induite au CCl<sub>4</sub>

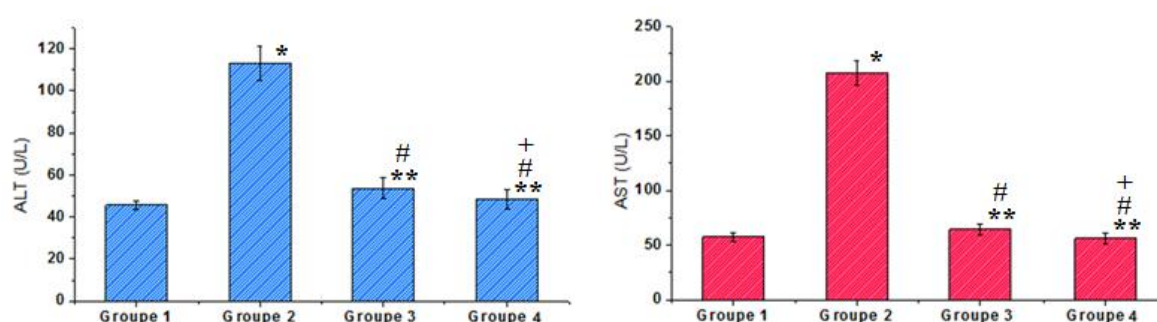
Les paramètres biochimiques étudiés sont réparties en deux types, les paramètres biochimiques sanguins et hépatiques. Les paramètres biochimiques sanguins sont les



activités sériques de l'alanine aminotransférase (ALT) et de l'aspartate aminotransférase (AST), les paramètres biochimiques hépatiques sont le niveau d'équilibre du malondialdéhyde (MDA) et le niveau total de glutathion.

#### Effet de la formulation sur les paramètres biochimiques sanguins (ALT et AST)

Comme le montre la figure 9.5, l'administration d'une dose unique de  $\text{CCl}_4$  de l'ordre de 0,025 ml (groupe 2) entraîne une élévation significative des taux d'ALT et d'AST comparés avec les taux du témoin positif (groupe 1), par contre ces taux deviennent plus normal après administration des traitements et se rapprochent des valeurs physiologiques.

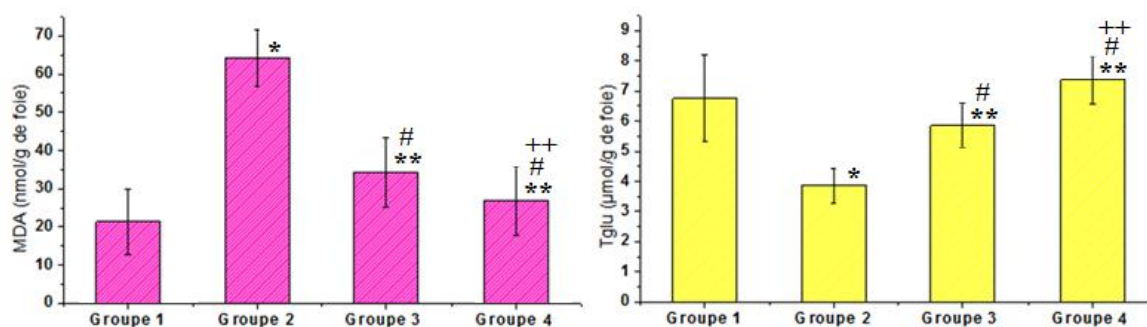


**Figure 9.5:** Variation des taux d'ALT et d'AST chez les souris des 3 groupes. (\*) Augmente de manière significative comparé au groupe 1, (\*\*) augmente de manière non-significative comparé au groupe 1, (#) augmente de manière significative comparé au groupe 2, (+) augmente de manière non-significative comparé au groupe 3.

Les taux d'ALT et d'AST des rats traités avec la formulation (groupe 4) sont légèrement plus élevés que ceux des souris traitées avec l'extrait libre (groupe 3), mais cette différence n'est pas significative ( $P > 0.05$ ).

#### Effet de la formulation sur les paramètres biochimiques hépatiques (MDA et Tglu)

D'après la figure 9.6, nous constatons que le taux du MDA du groupe intoxiqué (groupe 2) est le plus élevé en le comparant aux ceux des deux autres groupes. Le groupe traité avec la formulation présente un taux du MDA légèrement plus élevé que ceux des groupes physiologique et traité avec l'extrait (les groupes 1 et 3). Le taux de Tglu du groupe intoxiqué (groupe 2) est le plus faible contrairement aux trois autres qui présentent des taux plus importants. Les valeurs de Tglu pour le groupe 4 (traiter avec la formulation) augmentent de manière significative comparée à tous les autres groupes.



**Figure 9.6:** Variation des taux d'MDA et de Tglu chez les souris des 3 groupes. (\*) Varie de manière significative comparé au groupe 1, (\*\*) varie de manière non-significative comparé au groupe 1, (#) varie de manière significative comparé au groupe 2, (+) varie de manière non-significative comparé au groupe 3, (++) varie de manière significative comparé au groupe 3.

La toxicité du  $\text{CCl}_4$  est principalement due à la formation de deux radicaux libres les  $\text{CCl}_3\bullet$  et le  $\text{CCl}_3\text{O}\bullet$  [551,552], ces derniers vont interrompre les processus physiologiques des différents organes (principalement le foie, les reins, les poumons et la rate) [553]. Ces interruptions vont provoquer des troubles des bilans biochimiques et des destructions des tissus viscérales.

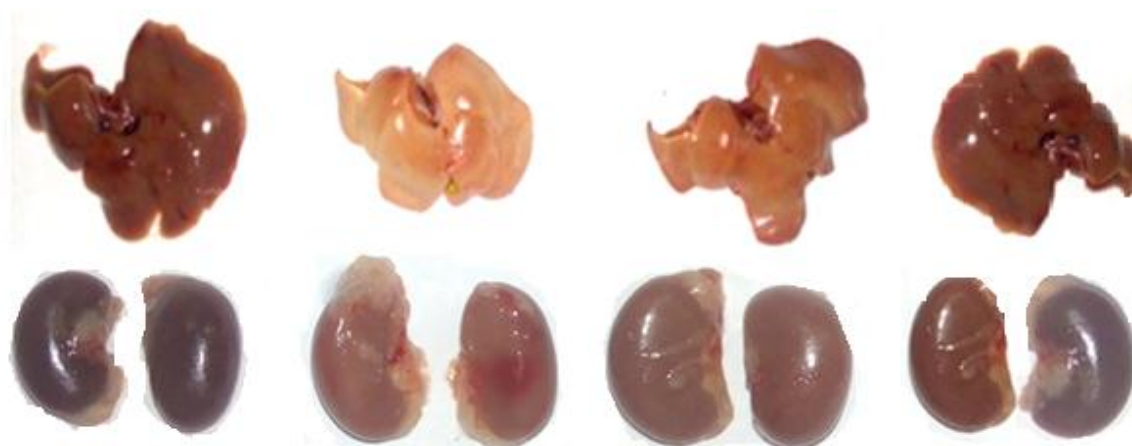
L'utilisation des plantes médicinales comme *Salvia officinalis* dans le traitement des intoxications au  $\text{CCl}_4$  est due à leur grand pouvoir antioxydant [309-327]. Effectivement dans la partie précédente du présent travail (chapitre 7) l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis* a montré un excellent pouvoir antioxydant par la méthode du piégeage du radical DPPH.

### 9.3.3.2. Effet de la formulation sur les caractéristiques anatomique et histologique des organes lors de l'hépto-néphrotoxicité aigüe induite au $\text{CCl}_4$

#### Étude macroscopique

Les résultats de l'étude macroscopique des foies (figure 9.7) ont montré que les animaux du groupe 1 (témoin positif) présentent des foies à aspect normal de couleur rouge brune et d'une consistance molle et ferme au touché. Quant au groupe 2 (témoin négatif), ils présentent des caractéristiques d'un foie pathologique de couleur jaunâtre, granité, friable au touché avec des ponctuations rougeâtres. L'aspect de foie d'atrophie jaune le plus souvent observé est caractéristique des foies ayant subi une atteinte toxique [554,555]. Les

animaux des groupe 3 et 4, ceux qui ont subi le traitement préventif (traité et intoxiqué) présentent des foies en meilleur état que ceux des foies des rats du groupe 2, de couleur rouge brune claire, fermes au toucher avec des lésions moindres. Le traitement par les microcapsules nous a donné une amélioration plus importante (pratiquement une régénération totale de la couleur du foie) comparé à l'extrait non encapsulé. Le même résultat est observé pour les reins des rats étudiés (figure 9.7).



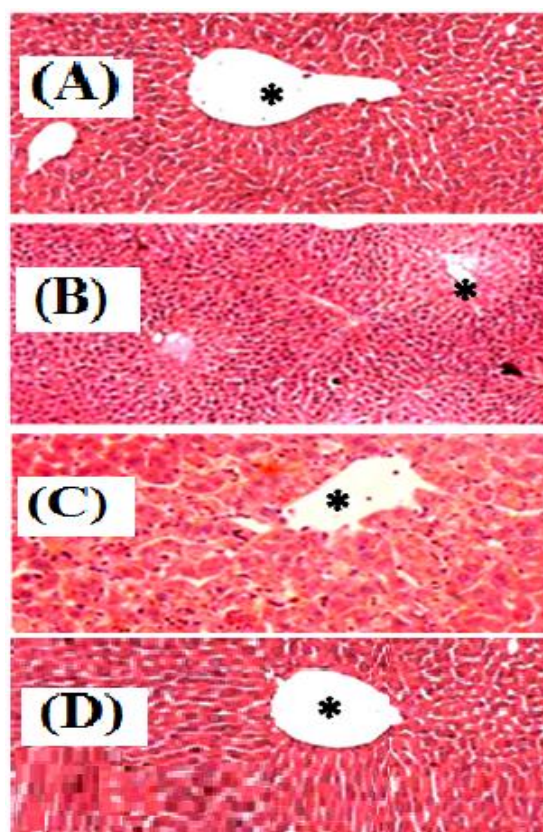
**Figure 9.7 :** Photographies des foies et des reins pour les différents lots (de gauche à droite : organes physiologique, organes CCl<sub>4</sub>, organes CCl<sub>4</sub> + traitement avec l'extrait et enfin foie CCl<sub>4</sub>+ traitement avec la formulation).

### Étude microscopique

**Groupe 1 (témoin positif):** Les coupes observées montrent l'organisation histologique d'un foie normal. Les hépatocytes sont disposés en travées centrées autour des veines centro-lobulaires. La veine porte est située au milieu (figure 9.8 A).

**Groupe 2 (témoin négatif):** L'observation des coupes réalisées montre un aspect de foie d'hépatite toxique aiguë, massive, nécrosante, congestive et une infiltration des cellules inflammatoires. L'architecture des hépatocytes est méconnaissable. La veine porte est invisible, elle s'est rétrécie et ça est dû à la ballonnisation des hépatocytes (figure 9.8 B).

**Groupes 3 et 4 (traités et intoxiqués):** Grâce à l'administration des traitements les foies des souris traitées puis intoxiquées présentent des lésions moindres que celles observées sur les foies des souris intoxiquées. La nécrose hépatique bien que systématisée n'aboutit pas à une désorganisation complète de l'organisation histologique du foie telle qu'observée chez les souris intoxiquées (figure 9.8 C et D).



**Figure 9.8** : Microphotographies montrant les structures histologiques des tissus hépatiques des différents lots, (A) lot physiologique 1, (B) lot 2 témoin négatif traité par le CCl<sub>4</sub> et (C) lot 3 traité par le CCl<sub>4</sub> + 200mg/kg d'extrait, (D) lot 4 traité par le CCl<sub>4</sub> + un équivalent de 200mg/kg de formulation, (\*) représente des inflammations portales.

#### 9.4. Conclusion

La suspension à base de microcapsules contenant l'extrait de *Salvia officinalis* a permis d'augmenter l'activité anti-inflammatoire in-vivo de cet extrait, mais également d'augmenter son activité anti-ulcéreugénique et d'accélérer le processus de cicatrisation de la muqueuse gastrique. L'utilisation de l'extrait de *Salvia officinalis* et la formulation permet la normalisation des activités sériques de l'alanine aminotransférase et de l'aspartate aminotransférase ainsi que la diminution du niveau d'équilibre du malondialdéhyde et l'augmentation du niveau total de glutathion. Les résultats de cette étude ont révélé que l'extrait présente une très bonne action hépatoprotectrice qui permet la réduction des lésions hépatocellulaires induites par CCl<sub>4</sub>. De plus, la microencapsulation de l'extrait permet d'obtenir de meilleurs résultats sur le plan biochimique et histologique.

## CONCLUSION

Au cours de la réalisation de cette thèse de doctorat, des domaines multidisciplinaires ont été exploités et différents axes de recherches ont été abordés afin de pouvoir traiter notre problématique qui est l'augmentation de l'efficacité pharmacologique et la préservation des molécules bioactives d'origine végétale.

Une enquête ethnobotanique sur le traitement du diabète dans la région de la Mitidja nous a permis d'établir une liste de 27 plantes antidiabétique, testées et approuvées par les patients. L'évaluation de l'activité antidiabétique in-vitro des extraits aqueux et éthanoliques pour les plantes récoltées a confirmé les résultats de notre enquête ethnobotanique et a mis en évidence la plante ayant l'activité antidiabétique la plus importante ; il s'agit de *Salvia officinalis*.

L'optimisation des paramètres d'extraction des molécules bioactives de *Salvia officinalis* nous a permis de conclure que l'éthanol est le solvant d'extraction adéquat pour cette plante, l'extrait obtenu est principalement composé de polyphénols. L'activité antidiabétique in-vivo de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle a montré que ces molécules bioactives ont un mécanisme d'action complexe sur la régulation du métabolisme glucidique, le métabolisme lipidique ainsi que les enzymes antioxydantes.

L'utilisation des nanoepanges à base de  $\beta$ -cyclodextrine de naphthalène dicarboxyliqueacide, permet la préparation de nanoémulsions stables contenant l'huile essentielle de sauge. L'activité antidiabétique in-vivo de cette huile ainsi que sa cinétique de dissolution in-vitro, augmentent de manière significative après formulation.

La microencapsulation de l'extrait de sauge dans une membrane de gélatine/pectine par coacervation complexe a été réalisée avec succès. La stabilisation de ces microcapsules dans les milieux aqueux et le maintien de leur dispersion homogène ont été réalisés en utilisant l'alginate de sodium comme agent stabilisant. Le système dispersé ainsi formulé a permis de préserver l'activité antioxydante de l'extrait encapsulé, d'augmenter sa cinétique de dissolution in-vitro ainsi que son activité antidiabétique in-vivo.

La suspension à base de microcapsules contenant l'extrait de *Salvia officinalis* montre clairement que l'activité anti-inflammatoire in-vivo de cet extrait a augmenté, ainsi que l'activité anti-ulcéreugénique et le processus de cicatrisation de la muqueuse gastrique.

L'activité hépato-néphro-protectrice de l'extrait étudié a aussi augmenté et son efficacité contre les intoxications aux radicaux libres comme le tétrachlorure de carbone a été nettement améliorée.

Les présents travaux contenus dans cette thèse ont confirmé que les nano/microsystèmes présentent une stratégie très efficace pour la délivrance (augmentation de l'efficacité pharmacologique) et la préservation (protection des pharmacophores) des molécules bioactives d'origine naturelle.

Les résultats obtenus dans cet axe de recherche peuvent enrichir le panel existant des plantes médicinales. La formulation proposée est très prometteuse comparée à d'autres stratégies et le peu de travaux disponibles dans la littérature nous confirme que ces systèmes innovants sont l'avenir de la délivrance/préservation simultanée des substances bioactives naturelles.

Ce travail est loin d'être achevé et cette modeste contribution a mis en avance l'innovation dans la conception des médicaments et surtout le recours aux micro/nanotechnologies qui peuvent résoudre des problèmes considérables dans le secteur de la santé publique.

Pour la continuité de cette recherche très motivante et passionnante, on suggère de réaliser une étude clinique de notre formulation sur des diabétiques à un stade avancé (avec des complications inflammatoires et oxydatives) pour vérifier son efficacité et pouvoir la commercialiser.

APPENDICE A : les traitements du diabète.

<b>Insulin</b>	<b>Sensitizers</b>	<b>Biguanides</b>	Metformin Buformin Phenformin		
		<b>TZDs/"glitazones" (PPAR)</b>	Pioglitazone, Rivoglitazone Rosiglitazone Troglitazone		
		<b>Dual PPAR agonists</b>	Aleglitazar Muraglitazar Tesaglitazar		
	<b>Secretagogues</b>	<b>K+ ATP</b>	<b>Sulfonylureas</b>	<i>1st generation:</i> Acetohexamide, Carbutamide, Chlorpropamide, Metahexamide, Tolbutamide <i>2nd generation:</i> Glibenclamide (Glyburide) Glibornuride, Glipizide, Gliquidone, Glisoxepid Glimepiride, Gliclazide	
			<b>Meglitinides/"glinides"</b>	Nateglinide Repaglinide Mitiglinide	
		<b>GLP-1 agonists</b>	Exenatide Liraglutide Taspoglutide <sup>†</sup> Albiglutide <sup>†</sup> Lixisenatide		
		<b>DPP-4 inhibitors</b>	Alogliptin Gemigliptin Linagliptin Saxagliptin Sitagliptin Vildagliptin		
	<b>Analogs/other insulins</b>	<i>fast-acting</i> (Insulin lispro Insulin aspart Insulin glulisine) <i>short-acting</i> (Regular insulin) <i>long-acting</i> (Insulin glargine Insulin detemir NPH insulin) <i>ultra-long-acting</i> (Insulin degludec) <i>inhalable</i> Exubera			
	<b>Other</b>	<b>Alpha-glucosidase inhibitors</b>	Acarbose, Miglitol, Voglibose		
		<b>Amylin analog</b>	Pramlintide		
<b>SGLT2 inhibitors</b>		Canagliflozin Dapagliflozin, Empagliflozin Remogliflozin Sergliflozin Tofogliflozin			
<b>Other</b>		Benfluorex Tolrestat			

APPENDICE B : Le questionnaire utilisé lors de l'enquête ethnopharmacologique.

Questionnaire

1. Informant:

Prénom :

Âge :

Sexe :

Poids :

2. Information pour le diabète:

Type de diabète :

Traitements (nom du médicament utilisé) :

Complications :

3. Information sur les plantes antidiabétiques:

Nom de la plante :

Parties utilisés :

Méthodes de préparation des traitements :

4. Estimation des résultats de leur phytothérapie (par rapport à la clinique):

- Bon
- Moyen
- variable.



APPENDICE C : Liste des symboles et des abréviations.

AG	Acide gallique
ALT	alanine aminotransférase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANOVA	Analysis of variance
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
BHI	Brain heart infusion
CCl <sub>4</sub>	Tétrachlorure de carbone
CI50	Concentration inhibitrice médiane
CMI	Concentration minimale inhibitrice
D.Epith	Desquamations épithéliales
D.Glan	Destruction glandulaires
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
Glu	Glutathion
H.Ragi	Hémorragies
HBP	Helicobacter pylori
HE	Hématochiline Eosine
I.Eosi	Infiltration des éosinophiles
MDA	malondialdehyde
MPUP	Matières premières à usage pharmaceutique
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Œ.SM	Œdème de la sous muqueuse
OMS	Organisation mondiale de la santé
p	Valeur-P
PI	Pourcentage d'inhibition de l'ulcère
PU	Pourcentages de l'ulcère
RPM	Rounds per minute
t	Temps
TBARS	Acide thiobarbiturique
UFC	Unité formant colonie
C/S	Le ratio Core/Shell
G/P	Le ratio Gelatin/Pectine
HA	La quantité de l'agent de durcissement

UV	Ultraviolet
H <sub>s</sub>	La hauteur du sédiment
H <sub>0</sub>	La hauteur initiale de la suspension
t <sub>1/2</sub>	Temps de demi-vie
MC	Microcapsules
NE	Nanoémulsion
NS	Nanosuspension

## REFERENCES

1. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
2. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
3. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
4. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
5. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
6. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
7. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
8. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
9. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
10. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
11. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
12. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
13. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
14. Starms, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
15. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpenoid cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
16. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
17. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
18. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
19. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
20. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
21. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
22. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.

23. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
24. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
25. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
26. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
27. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
28. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
29. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
30. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
31. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
32. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
33. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
34. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
35. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
36. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
37. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
38. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
39. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
40. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
41. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
42. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
43. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
44. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
45. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
46. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
47. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.

48. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold- pressed Valencia orange essential oil on methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
49. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
50. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
51. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
52. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
53. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
54. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
55. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
56. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
57. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
58. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
59. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
60. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
61. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
62. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
63. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
64. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
65. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
66. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
67. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
68. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
69. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
70. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
71. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.

72. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
73. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
74. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
75. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
76. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
77. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
78. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
79. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
80. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
81. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
82. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
83. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
84. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
85. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
86. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
87. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
88. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
89. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
90. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
91. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
92. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
93. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
94. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
95. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.

96. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
97. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
98. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
99. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
100. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
101. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
102. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
103. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
104. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
105. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
106. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
107. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
108. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
109. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
110. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
111. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
112. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
113. Starman, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
114. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
115. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
116. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
117. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
118. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
119. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.

120. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
121. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
122. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
123. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
124. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
125. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
126. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
127. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
128. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
129. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
130. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
131. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
132. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
133. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
134. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
135. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
136. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
137. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
138. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
139. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
140. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
141. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
142. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
143. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
144. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.



145. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
146. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
147. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
148. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
149. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
150. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
151. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
152. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
153. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
154. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
155. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
156. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
157. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
158. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
159. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
160. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
161. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
162. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
163. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
164. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
165. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
166. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
167. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
168. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.

169. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
170. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
171. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
172. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
173. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
174. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
175. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
176. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Processing* 90.1 (2012): 9-16.
177. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
178. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
179. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
180. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
181. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
182. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
183. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
184. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
185. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
186. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
187. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
188. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
189. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
190. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
191. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
192. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
193. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.

194. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
195. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
196. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
197. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
198. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
199. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
200. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
201. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
202. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
203. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
204. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
205. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
206. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
207. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
208. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
209. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
210. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
211. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
212. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
213. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpenoid cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
214. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
215. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
216. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
217. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.

218. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
219. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
220. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
221. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
222. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
223. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
224. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
225. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
226. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
227. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
228. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
229. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
230. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
231. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
232. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
233. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
234. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
235. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
236. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
237. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
238. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
239. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
240. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
241. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
242. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.

243. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
244. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
245. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
246. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
247. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
248. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
249. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
250. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
251. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
252. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
253. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
254. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
255. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
256. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
257. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
258. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
259. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
260. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
261. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
262. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
263. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
264. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
265. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
266. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.

267. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
268. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
269. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
270. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
271. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
272. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
273. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
274. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
275. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
276. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
277. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
278. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
279. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
280. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
281. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
282. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
283. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
284. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
285. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
286. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
287. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
288. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
289. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
290. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
291. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.

292. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
293. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
294. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food Chemistry* 172 (2015): 543-550.
295. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
296. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
297. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
298. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
299. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
300. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
301. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
302. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
303. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
304. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
305. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
306. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
307. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
308. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
309. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
310. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
311. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
312. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpenoid cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
313. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
314. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
315. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.

316. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
317. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
318. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
319. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
320. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
321. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
322. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
323. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
324. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
325. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
326. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
327. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
328. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
329. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
330. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
331. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
332. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
333. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
334. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
335. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
336. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
337. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
338. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
339. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
340. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.



341. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
342. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
343. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
344. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
345. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
346. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
347. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
348. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
349. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
350. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
351. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
352. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
353. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
354. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
355. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
356. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
357. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
358. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
359. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
360. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
361. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
362. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
363. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
364. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.

365. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
366. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
367. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
368. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
369. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
370. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
371. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
372. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
373. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
374. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
375. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
376. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
377. Starman, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
378. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
379. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
380. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
381. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
382. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
383. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
384. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
385. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
386. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
387. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
388. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.

389. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
390. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
391. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
392. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
393. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
394. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
395. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
396. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
397. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
398. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
399. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
400. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
401. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
402. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
403. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
404. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
405. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
406. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
407. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
408. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
409. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
410. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
411. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
412. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
413. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.

414. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
415. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
416. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
417. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
418. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
419. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
420. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
421. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
422. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
423. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
424. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
425. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
426. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
427. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
428. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
429. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
430. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
431. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
432. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
433. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
434. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
435. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
436. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
437. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
438. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.

439. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
440. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
441. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
442. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
443. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
444. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpenoleless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
445. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
446. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
447. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
448. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
449. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
450. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
451. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
452. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
453. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
454. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
455. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
456. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
457. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
458. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
459. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
460. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
461. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
462. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.

463. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
464. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
465. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
466. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
467. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
468. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
469. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
470. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
471. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
472. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
473. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
474. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
475. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
476. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
477. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpenoid cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
478. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
479. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
480. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
481. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
482. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
483. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
484. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
485. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
486. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).

487. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
488. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
489. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
490. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
491. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
492. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
493. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
494. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
495. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
496. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
497. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
498. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
499. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
500. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
501. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
502. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
503. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.
504. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
505. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
506. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Processing* 90.1 (2012): 9-16.
507. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
508. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
509. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
510. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
511. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.

512. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
513. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
514. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
515. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
516. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
517. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
518. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
519. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
520. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
521. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
522. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.
523. Mubarak, M., A. Shaija, and T. V. Suchithra. "A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production." *Algal Research* 7 (2015): 117-123.
524. Chemat, Farid, et al. "Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review." *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017): 540-560.
525. Chen, Mingshun, Yi Zhao, and Shujuan Yu. "Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses." *Food chemistry* 172 (2015): 543-550.
526. Vinatoru, M., T. J. Mason, and I. Calinescu. "Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2017).
527. Sharif, K. M., et al. "Experimental design of supercritical fluid extraction—A review." *Journal of Food Engineering* 124 (2014): 105-116.
528. da Silva, Rui PFF, Teresa AP Rocha-Santos, and Armando C. Duarte. "Supercritical fluid extraction of bioactive compounds." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016): 40-51.
529. Modenesi, P. "Skull lichens: A curious chapter in the history of phytotherapy." *Fitoterapia* 80.3 (2009): 145-148.
530. Ramawat, K. G., S. Dass, and Meeta Mathur. "The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants." *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine* (2009): 7-32.
531. Shahidi, Fereidoon, Priyatharini Ambigaipalan, and Anoma Chandrasekara. "Recent Advances in Phytochemicals in Fruits and Vegetables." *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, 2nd Edition* (2018): 1323-1356.
532. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, Volume 86, (août 2008): 577-656.
533. Ernst, Edzard. "Adulteration of Chinese herbal medicines with synthetic drugs: a systematic review." *Journal of internal medicine* 252.2 (2002): 107-113.
534. Artuso, Anthony. *Drugs of natural origin: Economic and policy aspects of discovery, development, and marketing*. Psychology Press, (1997).
535. Adessi, Celine, and Claudio Soto. "Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability." *Current medicinal chemistry* 9.9 (2002): 963-978.
536. Wang, Wenping, et al. "Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of Ginkgo biloba extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion." *Fitoterapia* 102 (2015): 189-197.



537. Zheng, Bin, et al. "Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of Ginkgo biloba extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 77 (2015): 254-264.
538. Gullón, Beatriz, et al. "Rutin: a review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability." *Trends in Food Science & Technology* 67 (2017): 220-235.
539. Gong, Ying, et al. "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology." *Food and Bioprocess Technology* 90.1 (2012): 9-16.
540. Fiehn, Oliver, et al. "Metabolite profiling for plant functional genomics." *Nature biotechnology* 18.11 (2000): 1157.
541. Roessner, Ute, et al. "Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems." *The Plant Cell* 13.1 (2001): 11-29.
542. Starmans, Dick AJ, and Herry H. Nijhuis. "Extraction of secondary metabolites from plant material: a review." *Trends in Food Science & Technology* 7.6 (1996): 191-197.
543. Muthaiyan, Arunachalam, et al. "Antimicrobial effect and mode of action of terpenoid cold-pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of applied microbiology* 112.5 (2012): 1020-1033.
544. Ozel, Mustafa Z., and Hilal Kaymaz. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*." *Analytical and bioanalytical chemistry* 379.7-8 (2004): 1127-1133.
545. Masango, Phineas. "Cleaner production of essential oils by steam distillation." *Journal of Cleaner Production* 13.8 (2005): 833-839.
546. Jamshidi, R., Z. Afzali, and D. Afzali. "Chemical composition of hydrodistillation essential oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 5.1 (2009): 78-81.
547. Shirsath, S. R., S. H. Sonawane, and P. R. Gogate. "Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—a review of current status." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53 (2012): 10-23.
548. Craveiro, A. A., et al. "Microwave oven extraction of an essential oil." *Flavour and Fragrance Journal* 4.1 (1989): 43-44.
549. Khajeh, Mostafa, et al. "Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods." *Food chemistry* 86.4 (2004): 587-591.
550. Herrero, Miguel, Alejandro Cifuentes, and Elena Ibañez. "Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review." *Food chemistry* 98.1 (2006): 136-148.
551. Zhang, Hua-Feng, Xiao-Hua Yang, and Ying Wang. "Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: current status and future directions." *Trends in Food Science & Technology* 22.12 (2011): 672-688.
552. Kraft, Karin, and Christopher Hobbs. *Pocket guide to herbal medicine*. Georg Thieme Verlag, (2004).
553. Koyama, Kazuya, Nami Goto-Yamamoto, and Katsumi Hashizume. "Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*)." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.4 (2007): 958-965.
554. Singh, J. "Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants." *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants* 67 (2008): 32-35.
555. De Castro, MD Luque, and L. E. Garcia-Ayuso. "Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future." *Analytica chimica acta* 369.1-2 (1998): 1-10.