

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université SAAD DAHLAB-BLIDA

FACULTE DE TECHNOLOGIE

Département de chimie industrielle

MEMOIRE DE MASTER PROFESSIONNEL

Par

NANTENAINJANAHARY Inous

**ÉTUDE DE LA MICROENCAPSULATION DES POLYPHÉNOLS
EXTRAITS DE MARRUBIUM VULGAR L.**

Soutenance prévue pour le 17 Juin 2015

Jury d'évaluation :

Mr A.BOUCHERIET

Maître de conférence B, UNIVERSITÉ DE BLIDA

Mr H.BOUTOUMI

Maître de conférence A, UNIVERSITÉ DE BLIDA

Mme AYACHI

Maître Assistant, UNIVERSITÉ DE BLIDA

Proposé et dirigé par :

Pr. HADJ-Ziane ZAFOR A.

Professeure, UNIVERSITÉ DE BLIDA

Mr. NAÏT Bachir Y.

Doctorant, UNIVERSITÉ DE BLIDA

2014-2015

A ma mère,

A ma grande sœur Nadine,

Avant-Propos

L'accomplissement du devoir fait la grandeur de l'Homme, chacun de nous doit vivre pour apporter quelque chose à la société pour ne pas être en plus. Certes l'Algérie m'a construit mais rien n'était possible sans ma famille. A travers cet ouvrage, j'aimerais bien dire que j'ai accompli mon devoir mais ce n'est pas du tout vrai car nous sommes les victimes d'un âge où les Hommes de science sont accrédités, et très peu d'entre eux ont la possibilité de s'adonner à une véritable recherche... Le peu de connaissances qu'ont les savants d'aujourd'hui est consacré à la poursuite de fins matérielles...

REMERCIEMENTS

Ces cinq années d'études ont été l'occasion de nombreuses rencontres et collaborations, il convient de commencer ce manuscrit par des remerciements envers toutes les personnes ayant collaboré de près ou de loin à réaliser ce modeste travail

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu pour la force et la patience qu'il m'a donné pour surmonter toutes les épreuves (bonheurs et malheurs) vécues au cours de réalisation ce mémoire. J'accorde une pensée particulière pour ma mère et ma grande sœur Nadine qui par leur sacrifice, leurs amours et leurs encouragements ont été à l'origine de la réussite de mon projet. Vous m'avez toujours soutenue dans tous mes objectifs. Merci maman, merci Nadine, tout ce que je suis est grâce à tout l'amour et le soutien que vous m'avez donné.

Ce travail de recherche s'est déroulé au sein du laboratoire de Génie Chimique. Je remercie son Directeur Pr. H.Khalaf et Pr. A.Hadj-Ziane, chef d'équipe au sein de ce laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma promotrice Pr A.Hadj-Ziane-Zafour, pour avoir autorisé à s'insérer dans son équipe de recherches ainsi qu'à mon Co-promoteur Mr NAÏT Bachir Yacine, Doctorant en Génie pharmaceutique au laboratoire de Génie Chimique pour m'avoir orienté et guidé durant toutes les expériences, pour les conseils et les bons moments passés ensemble au laboratoire.

Je tiens à remercier les professeurs qui m'ont fait confiance et qui ont cru en moi dès ma première année en licence de pharmacie Industrielle, jusqu'au master. Grâce à eux, j'ai pu continuer ce parcours quelque peu inhabituel.

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail, est d'optimiser l'extraction par Soxhlet des molécules bioactives du *MarrubiumVulgare L.* par un choix judicieux des conditions optimales d'extraction en variant la puissance et la durée d'extraction en utilisant un plan factoriel complet. L'effet du solvant (éthanol, dichlorométhane et éther de pétrole), de puissance d'extraction et de la durée d'extraction ont été étudiés. Le rendement, l'énergie d'extraction et les teneurs en polyphénols les plus élevées ont été obtenus dans les conditions suivantes : puissance 200W durant 140minutes. Les résultats de l'optimisation montrent que l'éthanol est le solvant le plus efficace pour l'extraction de molécules bioactives de *Marrubium Vulgare L.* Une étude phytochimique a été réalisée pour voir les molécules bioactives que renferme le *Marrubium Vulgare L.*

Afin de mieux valoriser notre extrait, nous avons choisi une forme microparticules, Une optimisation des conditions de préparation tout en choisissant les meilleurs ratios de polymères et des autres excipients a été réalisée. Pour la formulation de la microparticule, nous avons choisi la gélatine et la gomme arabique. Les extraits éthanoïques de *Marrubium Vulgare L.* sont donc enrobés dans ces polymères par coacervation complexe. Chacune des expériences faites est évaluée en termes de propriétés de capsules (rendement d'encapsulation et taux d'encapsulation).

Mot clé : Molécules bioactives, phytochimie, Soxhlet, activité biologique, microparticules.

ABSTRACT

The main goal of this analytical study was focused on extracted compounds and extraction conditions themselves. Soxhlet extractions were performed at two extraction time and with two Energy. Soxhlet extraction technique is employed for the extraction and separation of chemical constituents in the medicinal plant, *Marrubium Vulgar L.* We use a general full factorial design with two factors such us extraction time and the power of the extraction. The effects of solvent type (ethanol, dichloromethane and petroleum ether), power and extraction time were studied. High values of the yield, energy and total polyphenols were obtained at a power 200W during 140 minutes. The optimization results showed that the ethanol was the most efficient solvent for the *Marrubium Vulgare L.* molecules bioactive extraction. The phytochemical study allowed isolating the main metabolites including those who are major.

In the end, we encapsulate the *Marrubium Vulgare L.* extract by complex coacervation of whey proteins and arabic gum. It focuses on the coacervation of proteins and arabic gum in aqueous medium as well as the mechanisms involved in the formation of microcapsules by complex coacervation. The influence of protein / polysaccharide ratio and the other composition of the coacervate were studied. Every one of experiences was evaluated in term of capsules properties (yield and encapsulation efficiency).

Key word: bioactive molecule, phytochemical, Soxhlet, biological activity, microcapsules.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو تحسين استخراج بواسطة سوكلأيت الجزأئات النشطة ببولولجأا من *Marrubium vulgare L*. من خلال لأختيار الأءقأق للشروط استءراآ الأمثل من خلال آغأأر الوقت وقوة واستءراآ باسءءءاءم آصمأم مضروب الكامل. تم دراسة آأأأر المذأبأا (الأأأأر والبأترول مآشان كلورو آثنأأأ، الإأأانول) طاقة استءراآ و وقت الاستءراآ. الأءاء، الطاقة الاستءراآ و مءءوى البولأفأناول قء تم الءصول عأأها وقفا للشروط الآأأأة: 200 واط لمدة 140 ءقأقة. أظهرا النتائج الأمثل أن الإأأانول هو المذأب الأكلر فعأأة لاستءراآ الجزأئات النشطة ببولولجأا من *Marrubium vulgare L*. أآرأا دراسة كأمأاء النبات لرؤأة الجزأئات النشطة ببولولجأا الوارءة من *Marrubium vulgare L*.

من أجل آءسأنا قأمة لمسءآلص آءرنا شكل الجسأماء الأءققة المآهأة. لآءسأنا ظروف النءضأأر تم إآراء آءأأار أفضل نسب من البولأمررا و سواآ أآرأ. لآءظأأر الجسأماء الأءققة المآهأة آءرنا الجألاآأأنا والصمآ العأربأ. مسءآلص الإأأانول من *Marrubium vulgare L* المآلفة فأ هءه البولأمررا بواسطة آقوصر معقدة. كل الآآارب تم آقأأها (كفاءة الآلأأف و معدل الآلأأف).

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PRÉMIÈRE PARTIE : RÉVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : PHYTOTHÉRAPIE ET L'EXTRACTION, UNE MÉDICINE VIEILLE COMME LE MONDE	3
I.1.Définition de la phytothérapie	4
I.2.Différents types de la phytothérapie.....	5
I.3.Les avantages de la phytothérapie	6
CHAPITRE II : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE PLANTE SÉLECTIONNÉE.....	
II.1. MarrubiumVulgare	7
II.1.1.Taxonomie et Origine	7
II.1.2.Distribution géographique	8
II.1.2.1.Distribution mondiale.....	8
II.1.2.2.Distribution locale.....	8
II.1.3.État de l'art de MarrubiumVulgare.....	9
CHAPITRE III : L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE (CONCEPTION, RÉALISATION, OPTIMISATION ET MODÉLISATION)	15
III.1. Introduction	15
III.2. Définition.....	15
III.3.Les différents procédés d'extraction des molécules bioactives à partir des végétaux	15
➤ Techniques conventionnelles	15
➤ Techniques non conventionnelle.....	16
III.3.1.EXTRACTION PAR SOXHLET	16
III.3.2.EXTRACTION ASSISTÉE PAR ULTRA-SON.....	18
CHAPITRE IV : CARACTÉRISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES EXTRACTIONS NATURELLES	21
IV.1. Screening phytochimique.....	21

IV.1.2. Méthode chromatographique analytique	22
IV.1.2.1. Isolation et purification des molécules	22
IV.1.2.2. Détermination de la structure des molécules	23
CHAPITRE V : LA MICROENCAPSULATION ET LES PROCÉDÉS DE MICROENROBAGE, UN DÉFI POUR LA TECHNOLOGIE PHARMACEUTIQUE.....	25
V.1. Introduction	25
V.2. Les différents types de microparticules	25
V.3. Les différents procédés de microencapsulation	27
V.4. Microencapsulation par coacervation complexe	28
V.5. Mécanismes de formation de la membrane	29
DEUXIEME PARTIE : EXPÉRIMENTALE	
CHAPITRE VI : MATÉRIEL ET MÉTHODES	32
CHAPITRE VII : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	44
CONCLUSION GÉNÉRALE	76
RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE	78
ANNEXES	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau VI.1. Tableau récapitulatif des caractéristiques des solvants utilisés.....	36
Tableau VI.2. Tableau récapitulatifs de facteurs avec des niveaux choisis pour l'extraction.....	37
Tableau VI.3. Essais du plan d'expérience : matrice des facteurs et des réponses pris en considération dans le plan d'expériences de microencapsulation.....	41
Tableau VII.1. Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les deux facteurs étudiés en utilisant l'éthanol comme solvant : temps d'extraction et durée d'extraction. Les niveaux -1 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur et le niveau supérieur du domaine d'étude	44
Tableau VII.2. Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les deux facteurs étudiés en utilisant le dichlorométhane comme solvant : temps d'extraction et durée d'extraction. Les niveaux -1 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur et le niveau supérieur du domaine d'étude.....	50
Tableau VII.3. Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les deux facteurs étudiés : temps d'extraction et durée d'extraction. Les niveaux -1 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur et le niveau supérieur du domaine d'étude	54
Tableau VII.4. Aspects, couleurs et rendements des extraits de la partie aérienne de <i>MarrubiumVulgare L</i>	58
Tableau VII.5. Les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux.	59
Tableau VII.6. Distribution granulométrique des microcapsules sélectionnées.	64
Tableau VII.7. Les résultats de l'optimisation des procédés de microencapsulation ..	65

LSTE DES FIGURES

Figure II.1. MarrubiumVulgare L. dans son environnement d'origine	7
Figure III.1. Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet	17
Figure III.2. Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation.	18
Figure III.3. Évolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide... ..	19
Figure V.1. Types de microparticule (Microcapsule (a) et microsphère (b))	26
Figure V.2. Les différents procédés d'encapsulation.....	28
Figure V.3. Représentation schématique d'un diagramme de phase d'un système ternaire polymère/solvant/non- solvant où PC est le point critique, RP le point correspondant à la phase riche en polymère et PP le point correspondant à la phase pauvre en polymère (Kim et al., 1999)	30
Figure VI.1. Sechage de <i>MarrubiumVulgare L.</i> (A) : premier jour de séchage; (B) : quatrième jour de séchage.	33
Figure VI.2. Moulin utilisé pour le broyage	34
Figure VI.3. Un dispositif de Soxhlet.....	35
Figure VI.4. Cartouche pour Soxhlet.....	35
Figure VI.5. Rotavapor	35
Figure VI.6. La microscopie optique	43
Figure VII.1. Représentation coefficient de corrélation et de prédiction pour l'éthanol.	45
Figure VII.2. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur le rendement.	46
Figure VII.3. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur l'énergie d'extraction	46
Figure VII.4. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur le dosage de polyphénols.	47
Figure VII.5. Courbe d'iso réponse montrant la variation de rendement en fonction de la puissance et le temps d'extraction.	47

Figure VII.6. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation de l'énergie d'extraction en fonction de la puissance et le temps d'extraction	48
Figure VII.7. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du dosage de polyphénols en fonction de la puissance et la durée d'extraction.....	49
Figure VII.8 : Représentation des valeurs de R^2 et Q^2 pour le dichlorométhane	51
Figure VII.9 : Représentation des valeurs de R^2 et Q^2 pour le plan d'expérience d'éther de pétrole	55
Figure VII.10. Droite d'étalonnage de polyphénols	60
Figure VII.11. Les expériences apres l'ajustement de pH = 4.	62
Figure VII.12. Après la filtration, les microparticules (filtrats) sont dans les boites à pétrie et les substances filtrées sont dans les tubes à essaies	62
Figure VII.13. Photo d'observation obtenue par microscope optique des huit expériences faites	63
Figure VII.14. Histogramme illustrant le pourcentage de microcapsules par classe granulométrique	64
Figure VII.15. Représentation des valeurs de R^2 et Q^2 pour les plans d'expériences	66
Figure VII.16. Coefficients du modèle pour le rendement.....	67
Figure VII.17. Coefficients du modèle pour le taux d'encapsulation	67
Figure VII.18. Courbes d'iso réponses obtenues montrant la variation du rendement en fonction du ratio corps : paroi et le ratio G : GA.	68
Figure VII.19. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du rendement en fonction du ratio G : GA et l'agent de durcissement	69
Figure VII.20. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du rendement en fonction du ratio corps : noyau et l'agent de durcissement.....	70
Figure VII.21. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du taux d'encapsulation en fonction du ratio corps : noyau et le ratio G : GA.	71

Figure VII.22.Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du taux d'encapsulation en fonction du ratio G : GA et l'agent de durcissement 72

Figure VII.23.Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du ratio corps : noyau et l'agent de durcissement 73

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimio diversité, avec souvent des structures très originales dont une synthèse totale et rentable (complexité structurale, stéréospécificité...) est souvent difficile à réaliser voire impossible. Ces dernières années, nous assistons à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Et ces principes actifs doivent être mis sous la forme la plus appropriée afin d'avoir une bonne administration et une efficacité optimale chez les patients [39].

La forme la plus appropriée et qui fait tant d'actualité est la microparticule. L'utilisation des microparticules à l'échelle mondiale est considérable et ne cesse de s'accroître notamment sur le plan médical, environnemental et industriel. Les microtechnologies constituent un champ de recherche et de développement important depuis le début du XXI^{ème} siècle. Les microparticules présentent de nombreux avantages comme systèmes de libération de principes actifs, tels que la biocompatibilité, la biodégradabilité, la stabilité physicochimique, le faible coût de fabrication, une capacité de charge importante de principes actifs (PA) aussi bien lipophiles, qu'hydrophiles, que macromoléculaires comme l'insuline, et un contrôle précis de la libération des principes actifs incorporés. L'utilisation des microparticules est aussi très diversifiée, telle qu'une utilisation par voie sous-cutanée, topique, orale, intramusculaire ou pulmonaire [40].

Pour notre part, notre choix s'est porté sur la microencapsulation des extraits de Marrube blanc ou *Marrubium vulgare L.* Le Marrube blanc est une source très riche en polyphénols que l'on rencontre dans les feuilles. Elle est largement utilisée dans le bassin méditerranéen pour ses nombreuses vertus thérapeutiques. Elle est employée par les

tradipraticiens contre le diabète, les infections des voies respiratoires et les troubles de la sécrétion biliaire, les affections bronchiques aiguës bénignes et les rhumes [41].

Ainsi donc, l'efficacité de cette forme innovante qu'est la microencapsulation et les effets de cette espèce endémique végétale sur les diverses pathologies nous ont donc poussés à valoriser le *Marrubium vulgare*. Pour ce faire, nous avons structuré notre travail comme suit :

- Après une introduction faisant le point sur l'extraction des molécules bioactives suivie par une étude phytochimique détaillée de la plante se basant notamment sur la caractérisation des molécules extraites majeures existant au niveau de la partie aérienne qui fera donc l'objet d'une première partie.

- Dans un deuxième volet, nous aborderons la microencapsulation des extraits obtenus en utilisant le procédé de coacervation complexe tout en les optimisant par le plan factoriel complet. Dans le but de mieux comprendre le phénomène de coacervation complexe au sein du couple de polymère gélatine/ gomme arabique. L'influence du ratio gélatine/ gomme arabique et de corps/ noyau ainsi que la quantité d'agent de durcissement a été étudiée. Des observations microscopiques ont été faites pour faire la caractérisation avant de faire des analyses granulométriques par traitement d'image. Ce dernier sera suivi d'une conclusion générale présentant une synthèse des résultats obtenus.

PREMIERE PARTIE

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette partie constitue une synthèse bibliographique des différentes notions abordées tout au long de cette étude.

Nous exposerons tout d'abord la place de la phytothérapie dans le monde actuel et les différents types d'extraction. Ensuite, l'extraction solide-liquide pour la matière végétale en abordant la question de la cinétique d'extraction. Puis, la caractérisation physico-chimique des extraits naturels. Enfin pour terminer, la microencapsulation et les procédés de microenrobage.

CHAPITRE I: PHYTOTHÉRAPIE ET L'EXTRACTION, UNE MÉDICINE VIEILLE COMME LE MONDE

Marrun Abbud disait «La science, après tout, n'est rien d'autre que l'expérience».

Depuis des années l'humanité ne cesse pas d'évoluer, de développer sa condition de vie. Les hommes préhistoriques ont pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins tel que, nourriture, abris. Ils découvraient très tôt dans leur évolution que ces plantes ne représentaient pas uniquement une source d'alimentation mais pouvaient également soulager voire guérir certaines maladies. Les plantes soignent, parfois très rapidement, non seulement la fatigue, l'insomnie, les maux de tête, la grippe, la toux, les rhumatismes, mais aussi de très nombreuses maladies chroniques parmi lesquelles on cite le diabète, la leishmaniose. Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, beaucoup d'études ont montré que ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études [1].

Le continent africain possède une diversité des plantes médicinales. Au travers des âges, beaucoup de ces plantes ont été identifiées en fonction de leurs vertus thérapeutiques et beaucoup d'entre elles se sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies. Aujourd'hui les principes actifs des plantes sont des composants essentiels d'une grande partie de nos médicaments et produits de soins [2]. Malgré les multiples progrès de la médecine moderne, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de la phytothérapie. Selon OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé [3]. En effet sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique ont des vertus médicinales [4].

I.1.Définition de la phytothérapie :

Traitement ou prévention des maladies par l'usage des plantes, la phytothérapie fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces. Ces molécules bioactives extraites des plantes grâce à leurs activités biologiques sont une réponse concrète à plusieurs maladies qui touchent l'humanité.

I.2.Différents types de la phytothérapie :

- **Phytothérapie pharmaceutique :** utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Ces extraits sont dosés en quantités suffisantes pour avoir une action soutenue et rapide. Ils sont présentés sous forme de sirop, de gouttes, de gélules, de lyophilisats... [5].
- **Homéopathie :** a recours aux plantes d'une façon prépondérante, mais non exclusive; les trois quarts des souches sont d'origine végétale, le reste étant d'origine animale et minérale.
- **Aromathérapie :** est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou huiles essentielles, substances aromatiques secrétées par de nombreuses familles de plantes, ces huiles sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- **Gemmothérapie :** se fonde sur l'utilisation d'extrait alcoolique de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules.
- **Herboristerie :** correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. L'herboristerie se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit une partie de celle-ci (écorce, fruits, fleurs). La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération. Ces préparations existent aussi sous forme plus moderne de gélule de poudre de plante sèche que le sujet avale.

I.3. Les avantages de la phytothérapie

Actuellement, l'humanité s'oriente de plus en plus vers la phytothérapie. Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont pas eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite [6].

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

Aujourd'hui les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes [6].

Aujourd'hui, la thérapeutique continue de recourir aux plantes de deux façons :

1. pour l'extraction industrielle de substances naturelles pures, destinées le plus souvent à des indications thérapeutiques majeures : prise en charge de la douleur (morphine), traitement des cancers (paclitaxel, vinblastine), traitement

du paludisme (artémisinine), etc.

2. en nature ou sous la forme de médicaments familiales simples ou plus innovantes (poudres, extraits, etc.), généralement utilisées dans les pathologies mineures ou en thérapeutique d'appoint : c'est le champ actuel de la phytothérapie. " Médecine douce " pour les uns, " placébothérapie " pour les autres, elle connaît un large succès. Après évaluation clinique, et sous réserve que la balance bénéfices-risques soit favorable, divers médicaments de phytothérapie constituent une possibilité parmi d'autres de prise en charge de certaines de ces pathologies du quotidien.

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine. Face aux limites thérapeutiques, des antibiotiques classiques ont poussé les scientifiques à orienter les recherches vers des nouvelles voies et surtout l'utilisation des principes actifs des plantes (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles etc.).

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale Méditerranéenne, Sahara et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartiennent à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémique [7]. Ce qui a donnée à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Parmi celle-ci, Marrubium Vulgare L., sujet de ce mémoire, ont été choisies pour leurs vertus thérapeutiques dans le but d'évaluer de ces extraits par microencapsulation.

CHAPITRE II : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES PLANTES SÉLECTIONNÉES

II.1. *Marrubium Vulgare*

Le genre *Marrubium* appartient à la famille des lamiacées, comprenant plus de 30 espèces différentes largement distribués dans les régions d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie [8].

Le *Marrube vulgaire* est une Arbuste, d'aspect blanchâtre très rameux, à poils laineux appliqués, a feuilles petites en coin à la base et portant quelque dents au sommet, fleurs en petites glomérules à l'aisselle des paires de feuilles, corolle petite par rapport au calice tubuleux, celui-ci s'accroissant considérablement par sa partie supérieure en formant autour du fruit une auréole membraneuse [9].



Figure II.1. *Marrubium Vulgare* L. dans son environnement d'origine

II.1.1. Taxonomie et Origine

Tableau II.1. Selon Judd et al. (2002) la position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* est :

Règne	Végétale
Embranchement	Angiosperme
Classe	Eudicotylédones
Sous-classe	Gamopétale

Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	Marrubium
Espèce	Marrubium Vulgare L.

Les noms donnés à la plante sont les suivants : en Algérie est connue par le nom Marriouth (Quezel et Santa, 1963), Merrîwt au Maroc (Bellakhdar, 1997), Marroubia en Tunisie (Boukef, 1986). En Anglais : Harehound, en Italien : Marrubio. Selon (Bonnier, 1909), le Marrube est composé de deux mots hébreux : mar, rob, suc amer.

II.1.2. Distribution géographique

Elle pousse dans toute l'Afrique du Nord et presque dans toute l'Europe, au centre et au Sud-ouest de l'Asie et aux Canaries. Elle est naturalisée dans l'Amérique du Nord et dans l'Amérique du Sud [10].

II.1.3. État de l'art de Marrubium Vulgare

II.1.3.1. Utilisation traditionnelle et usage thérapeutique

Dans l'Égypte de la haute Antiquité, le Marrube blanc était déjà reconnu pour ses propriétés apaisantes contre la toux. On s'en servait également comme insectifuge et comme antidote contre plusieurs poisons. Les Grecs de l'Antiquité l'utilisaient contre les morsures de chiens enragés. En médecine ayurvédique (Inde), chez les aborigènes d'Australie et les Amérindiens d'Amérique du Nord, le Marrube servait à traiter les infections des voies respiratoires.

Selon la commission allemande, elle est utilisée dans le traitement des dyspepsies et la perte d'appétit. Selon la commission européenne elle est efficace dans les cas de bronchites, les catarrhes des voies respiratoires, les dyspepsies et la perte d'appétit.

Cette plante est traditionnellement utilisée dans le traitement symptomatique de la toux et au cours des affections bronchiques aiguës et bénignes. Elle est considérée comme expectorante et fluidicatrice des sécrétions bronchiques en cas de toux

productive. Elle donne des résultats satisfaisants dans le cas des bronchites et les inflammations de la gorge, elle pourrait être antispasmodique et tonique amer.

Selon les populations anciennes, le Marrube aurait une action hypoglycémiant [11-12]. Cependant, les résultats d'un essai conduit récemment au Mexique sur 43 sujets diabétiques qui résistaient au traitement classique révèlent que le Marrube n'a pas eu d'effet significatif sur la glycémie [13]. La prudence s'impose tout de même pour l'heure. Il n'y a pas eu sur le Marrube d'essais cliniques en double aveugle. Ses usages sont des usages traditionnels bien établis et des études pharmacologiques sur l'animal.

II.1.3.2. Quelques travaux réalisés sur *Marrubium Vulgare*

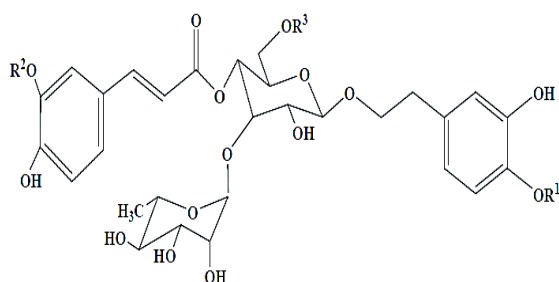
II.1.3.2.1. Quelques molécules isolées de *Marrubium vulgare*

L'espèce *Marrubium vulgare* est très intéressante du point de vue chimique, des recherches ont été effectuées ce qui a permis d'isoler un grand nombre de substances connues pour leurs diverses activités biologiques, à titre d'exemples, les diterpènes, les flavonoides, les huiles essentielles, les iridiodes glycosilés.

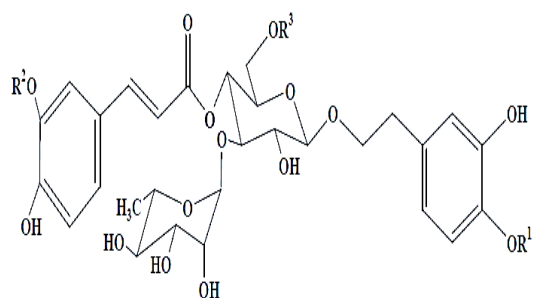
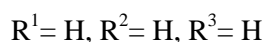
II.1.3.2.1.1. Les diterpenes et les phenyléthanoides glucosidiques

Une recherche bibliographique exhaustive faite sur l'espèce *Marrubium vulgare* nous a permis de révéler la présence des diterpènes et les phenyléthanoides glucosidiques où elle contient un principe amer dû à la présence de γ -lactone [14].

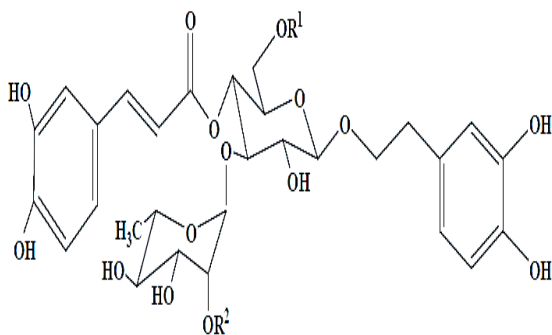
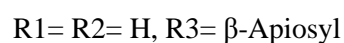
Françoise et collaborateur [15] ont pu isoler cinq composés phenyléthanoides glucosidiques. Les mêmes résultats ont été obtenus par Sevser et collaborateur (Finar, I., 1994). Ces structures sont : Acteoside (voire structure II.1.), Forsythoside B (voire structure II.2.), Aenarioside (Structure II.3.), ballotetroside (Structure II.4.), et un phenylethanoide non glucosidique ; (+) E-Caffeoyl-L-malique acide (structure II.5.). Ces composés ont été trouvés dans les parties aériennes de l'extrait butanolique.



Structure II.1. Acteoside

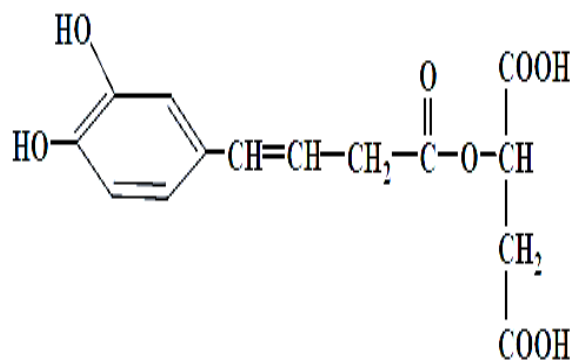


Structure II.2. Forsythoside



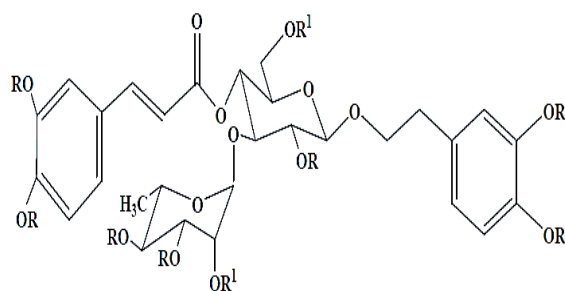
Structure II.3. Aenarioside: $R^1 = \beta\text{-D-Xylose}, R^2 = H$

Structure II.4. ballotetriside : $R^1 = \beta\text{-D-Apiose}, R^2 = \alpha\text{-L-Arabinose}$



Structure II.5(+) E-Caffeoyl-L-malique acide

Une autre étude plus récente effectuée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes du *Marrubium vulgare* (Sevser.S., et al 2002) a révélé deux produits phenylethanoidique le premier: 3,4-dihydroxy- β -phenylethoxy-O-[β -Dapiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -Lrhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-[β -Dapiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)]-4-O-caffeoyl- β -D-glucopyranoside Structure II.6 = Marruboside, le deuxième composé est Marruboside acétylé Structure II.7.



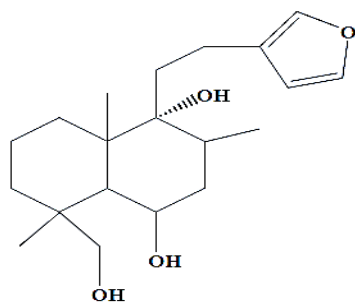
Structure II.6. Marruboside: R=H, R1= β -D-Apiose

Structure II.7. Marruboside acétylé: R=Ac, R1= β -D-Apiose

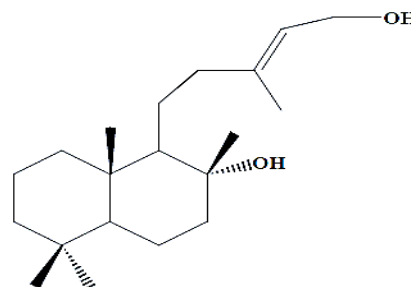
Ces structures sont identifiées par les différentes méthodes d'analyse spectroscopique UV, RMN et spectrométrie de masse ESI-MS.

Popa et collaborateur [16] ont pu isoler deux composées diterpénique : Marrubiol

Structure II.8, 13-Labdene-8, 15-diol ;(5 β , 8 α , 13E)-form Structure II.9.



Structure II.8 : Marrubiol



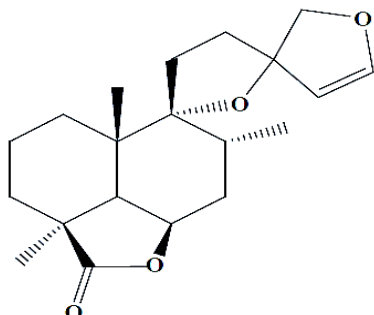
Structure II.9 13-Labdene-8, 15-diol ;(5 β , 8 α , 13E)-form

Ces structures ont été identifiées par IR spectroscopie.

Un autre travail récent réalisée par Sanae et collaborateur [17] a permis de déterminée l'activité de relaxation du marrubiol.

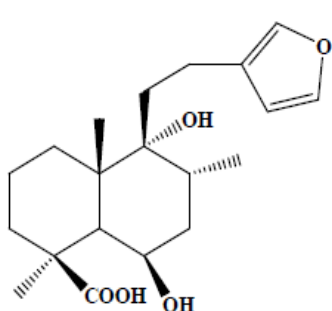
M.S.Henderson et collaborateur (*Marrubium vulgare* L. J.Chem. Soc. (C), **2014-2015**, 1969) ont pu isoler un produit majoritaire de l'extrait acétonique des parties aériennes.

Il s'agit de : Premarrubiin Structure II.10, comme on peut le l'obtenue par une petite conversion de la Marrubiin par la chaleur.

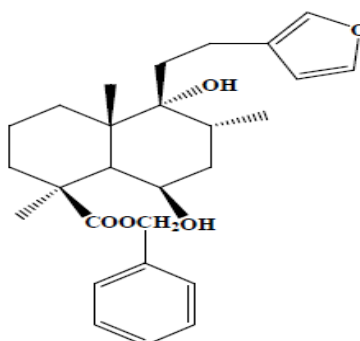


Structure II.10 : Marrubiin

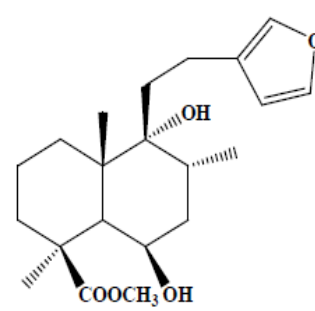
Les dérivés Marrubiiniques sont : Acide Marrubiinique structure II.12, Marrubenol (structure II.8), Acide Marrubiinique benzyle ester structure II.13, Acide Marrubiinique méthyle ester structure II.14.



Structure II.12. Acide marrubiinique



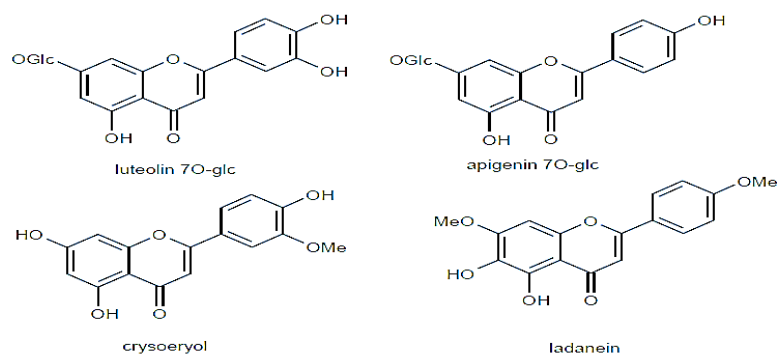
Structure II.13. Acide Marrubiinique benzyle ester



Structure II.14. Acide Marrubiinique méthyle ester

II.1.3.2.1.2. Les flavonoïdes

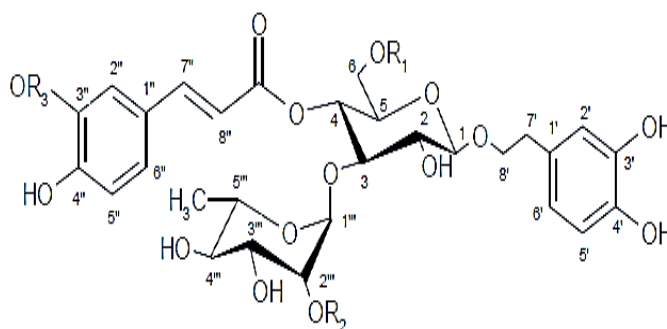
Nawwar M.A.M., et al., a pu isoler apigénine et lutéoline dans leur œuvre intitulé Flavonoïd lactates from leaves of Marrubium Vulgare en 1989.



Structure II.15. les Flavonoïdes du Marrubium vulgare

II.1.3.2.1.3. Phénylpropanoïdes esters

Papoutis Z., et al., a isolé les verbascosides en 2006 dans leur œuvre qui s'intitule Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties.



Structure II.16. R1 = R2 = R3 = H: verbascoside (acteoside)

II.1.3.2.2. Activités biologiques de Marrubium Vulgare

Les vertus curatives de l'espèce *Marrubium vulgare* sont sans doute liées à l'existence de certaines substances chimiques dans la totalité de la plante.

En Décembre 1990, Ezoubeiri et Aïcha ont fait une étude sur la contribution à l'étude phytochimique et antibiotique de marrubium vulgare, ils l'ont publié dans l'Istitut Marocain de l'Information Scientifique et Technique (IMIST).

En Mars 2002, Sevser Sahpaz et al ont fait une étude tout en publiant dans **Journal of ethnopharmacology** d'Elsevier sur l'isolation et l'activité pharmacologique des

esters de phenylpropanoïdes de *Marrubium Vulgare L.*

En 2007, Dellile L. et al., a mentionné dans **les plantes médicinales d'Algérie** que le *Marrubium Vulgare L.* est aussi employé pour combattre la cellulite et l'obésité.

En 2011, Adel Kadri et al., ont publié dans **African Journal of Biotechnology** sur les compositions chimiques et les activités antioxydants de l'huile essentielle de *Marrubium Vulgare L.* d'origine Tunisien.

En 2012, Boudjelal A. et al, ont publié dans une revue **Fitoterapia** sur l'analyse des compositions chimiques et l'activité antidiabétique de *Marrubium vulgare L.* infusé, ils ont vu que le marrube blanc est considéré comme antidiabétique.

Plusieurs études ont été effectuées sur le *Marrubium Vulgare*, en 2014, Mohammad Bokaeian et al, a fait des publications dans **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences** en traitant des analyses phytochimiques et les activités antibactériens in vitro sur les *Staphylococcus aureus*.

Une étude faite depuis 1842 (*Marrubium vulgare L.* J.Chem. Soc. (C), **2014-2015**, 1969) indique la présence d'un composé majoritaire le Marrubiin dans le *M.vulgare*, mais les études sont encore en cours par les chimistes brésilien C.Meyre-Silva et collaborateur [18] pour déterminer l'effet analgésique potentiel du Marrubiin et ses dérivés.

CHAPITRE III. EXTRACTION DES MOLÉCULES BIOACTIVES

CHAPITRE III.1. L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE

III.1. Introduction

Parmi les différentes étapes que constituent l'analyse et l'identification de molécules bioactives, l'étape d'extraction, qui a pour but la désorption des molécules d'intérêt des sites actifs de la matrice végétale, est primordiale puisqu'elle déterminera la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès des étapes suivantes. L'extraction de produits naturels est généralement de type solide-liquide, c'est-à-dire qu'un solide, la matrice végétale, est mélangé avec un liquide, le solvant d'extraction. Des méthodes dites traditionnelles, comme la macération, le Soxhlet, l'hydrodistillation et l'extraction par percolation ou par reflux, étaient jusqu'ici utilisées et considérées comme techniques de choix pour extraire les composés naturels.

III.2. Définition :

L'extraction solide-liquide est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer, de dissoudre soit par immersion soit par percolation d'un liquide, un ou plusieurs composants (liquide ou solide) mélangés à un solide. C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction [19].

La complexité de la structure et la variabilité (avec les saisons, les récoltes, . . .) de la matière végétale ainsi que la large variété des composés à extraire (différents poids moléculaires, polarité, lien avec la structure, . . .) ont conduit à l'apparition d'une grande variété de technologies d'extraction.

III.1.3. Les différents procédés d'extraction des molécules bioactives à partir des végétaux

III.1.3.1. Méthodes d'extraction conventionnelle

L'extraction est une séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide des solvants sélectifs,

traditionnellement de l'eau. Beaucoup de techniques ont été utilisées depuis toujours comme : infusion, décoction, macération et la distillation.

III.1.3.2. Méthodes d'extractions innovantes

Plusieurs méthodes d'extraction vont être décrites ci-dessous y compris celles par fluide supercritique, par ultrasons et enfin par micro-ondes. Ce sont des techniques qui répondent à bon nombre d'exigences actuelles en termes de durabilité, de répétabilité et de respect de l'environnement, de vitesse et d'automatisation.

III.1.4.LES MÉTHODES D'EXTRACTIONS SÉLECTIONNÉES

III.1.4.1.EXTRACTION PAR SOXHLET

L'extraction par Soxhlet, qui a été employé pendant longtemps, est une technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. L'extraction par Soxhlet est une technique générale et bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles [20].

Dans un système conventionnel de Soxhlet comme montré dans la figure III.1, la matière végétale est placée dans une cartouche, et remplie de solvant frais condensé à partir d'un ballon à distiller. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc. Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée.

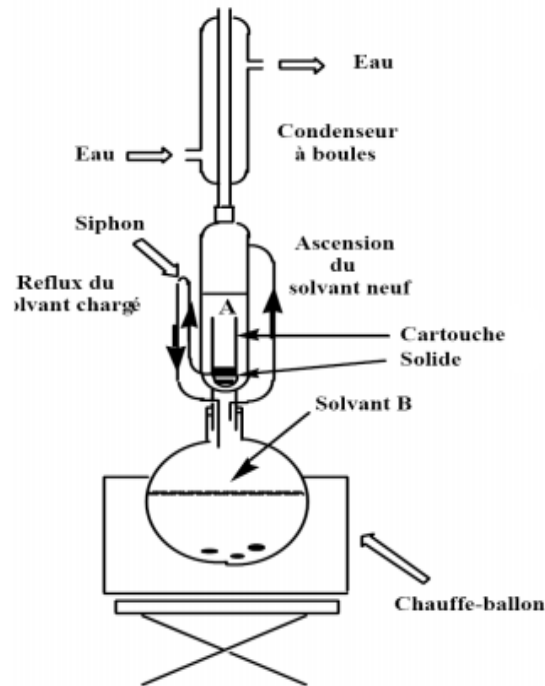


Figure III.1. Dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet

L'extraction par Soxhlet dépend fortement des caractéristiques de la matrice solide et de la dimension des particules vu que la diffusion interne est souvent l'étape limitante pendant l'extraction.

Les avantages de l'extraction par Soxhlet incluent :

- Le déplacement de l'équilibre de transfert en mettant à plusieurs reprises le solvant frais en contact avec la matrice solide,
- Le maintien d'une température relativement élevée d'extraction avec la chaleur du ballon à distiller,
- Aucune nécessité de filtration après l'extraction. En outre, la méthode de Soxhlet est très simple et bon marché.

Cependant, cette méthode présente des inconvénients :

- Le temps d'extraction est long,
- Une grande quantité de solvant est nécessaire,
- Il est impossible d'accélérer le processus par agitation,
- La grande quantité de solvant utilisée exige une étape d'évaporation / concentration,
- La possibilité de dégradation thermique des composés cible ne peut pas être

ignorée vu que l'extraction s'opère habituellement au point d'ébullition du solvant pendant un temps assez long.

La grande quantité de solvant ainsi que la longue durée de l'opération ont conduit à de larges critiques de cette méthode.

III.1.4.2. EXTRACTION ASSISTÉE PAR ULTRA-SONS

III.1.4.2.1. Principe d'Extraction

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 molécules est augmentée et au-dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression (Fig. III.3). La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie.

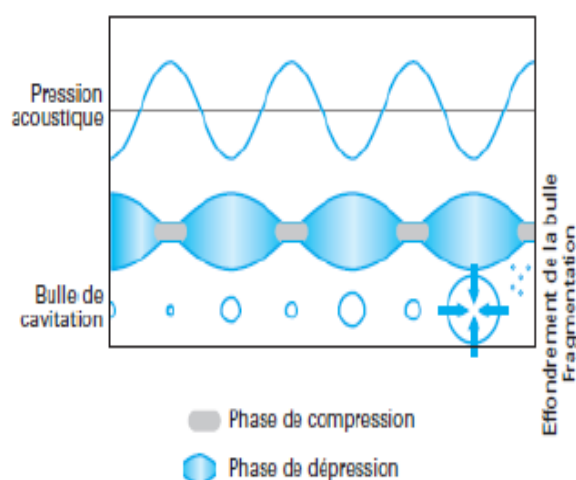


Figure III.2. Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation.

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide (Fig. III-2) 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 III.3. Évolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide.

L'UAE est une technique peu onéreuse, 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 ultra-sons - ce qui par-ailleurs permet d'effectuer plusieurs extractions simultanément - ou via une sonde ultrasonore combinée à un agitateur. 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 d'extraction 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 subit les ultrasons est alors restreinte à une zone localisée près de l'émetteur ce qui peut réduire le rendement d'extraction.

III.1.4.2.2.Appareillage d'Extraction Assistée par Ultra-son

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.

L'extraction par ultrason est une alternative peu coûteuse, simple et efficace aux techniques conventionnelles d'extraction. Les principaux avantages de l'utilisation des ultrasons dans l'extraction de solide-liquide incluent :

- L'augmentation de la cinétique et du rendement d'extraction,
- Réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles,

- Faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération par comparaison à d'autres nouvelles techniques d'extraction telles que l'extraction assistée par micro-ondes,
- Possibilité d'utilisation de n'importe quel solvant ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels.

Cependant, les effets des ultrasons sur l'extraction en termes de rendement et de cinétique sont liés à la nature de la matrice végétale. La présence d'une phase dispersée contribue à l'atténuation de vague d'ultrasons et la partie active des ultrasons à l'intérieur de l'extracteur est limitée à une zone située dans la proximité immédiate de l'émetteur ultrasonique. Par conséquent, ces deux facteurs doivent être considérés soigneusement dans la conception des extracteurs ultrasons.

L'extraction par ultrason a été employée pour extraire à partir des plantes des molécules actives telles que des huiles essentielles et des lipides [21,20].

CHAPITRE IV : CARACTÉRISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DES EXTRACTIONS NATURELLES

La complexité des extraits de plantes nécessite des techniques de séparation efficaces pour identifier les diverses molécules d'intérêt, avant d'étudier les différentes activités biologiques d'une plante. Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, afin de faire la mise en évidence des molécules existantes dans la plante, nous procéderons au screening phytochimique.

IV.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique met en évidence la présence des familles de molécules actives, c'est une étude qualitative utilisée pour connaître la composition chimique globale des extraits [22].

IV.1.1. Dosages des différentes familles des molécules bioactives

IV.1.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols a été effectué au centre de mesure de chimie à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visible à double faisceaux, la technique à double faisceaux nous aide à éliminer l'absorbance du blanc et donner directement la densité optique de l'échantillon. Pour s'assurer que les résultats sont fiables, le dosage de chaque composé phénolique a été réalisé en trois essais, après on a calculé la moyenne des densités optique mesurées.

IV.1.1.2. Dosage des tanins condensés

Les tanins sont dosés selon la méthode colorimétrique de Folin Denis, décrite par Joslyn, 1970. Il est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique et tungstique en milieu alcalin, en présence de tanins pour donner une coloration bleue dont l'intensité est mesurée à 760 nm sous 1 cm d'épaisseur.

IV.1.2.Méthode de séparation et identification des biomolécules

IV.1.2.1.Méthode chromatographique analytique

IV.1.2.1.1. GC-MS

Cette méthode de couplage est beaucoup utilisée dans de nombreux domaines : agroalimentaire (aliment, eau), produits naturels (pharmaceutiques, médecine, cosmétiques) et c'est très efficace [23].

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Dans ce dernier cas, on distingue l'ionisation chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN).

IV.1.2.1.2.HPLC-UV

La détection UV-vis est le mode de détection couplé à la chromatographie liquide qui est de loin le plus utilisé aujourd'hui pour l'analyse des produits naturels possédant un ou plusieurs chromophores. Les détecteurs UV-vis les plus communément utilisés sont des détecteurs à barrette de diodes (DAD, Diode Array Detector), qui permettent de suivre une analyse à plusieurs longueurs d'ondes simultanément, et d'enregistrer les spectres d'absorption de chaque composé élué par la phase mobile [24].

IV.2.Méthode d'isolation et de purification

IV.2.1. Chromatographie sur colonne

Alors que toutes les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse, la séparation ou la purification de faibles quantités de produits, la C.C peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes [25].

IV.2.2. La recristallisation

C'est une méthode de purification utilisée dans la plupart des cas pour les composés pouvant se présenter sous forme de cristaux. Elle s'utilise même sur de petites quantités mais n'est pas utilisable avec les huiles et d'autres composés liquides. Le principe de cette technique est basé sur la solubilité des mélanges à séparer. En effet, lorsqu'on veut isoler ou purifier un composé présent dans un mélange par cette technique, la première étape consiste à trouver le meilleur solvant de recristallisation. On appelle meilleur solvant de recristallisation, le solvant dans lequel le produit à cristalliser est peu soluble à froid et très soluble à chaud alors que les impuretés sont solubles à chaud et à froid. Par chauffage suivi immédiatement de filtration, on élimine une partie des impuretés insolubles à chaud. Le refroidissement permet au produit de cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid [26].

Remarque : Après la purification des différents composés d'un extrait naturel, il est obligatoire de déterminer la structure moléculaire.

IV.3.Méthode de détermination de la structure moléculaire de l'extrait

IV.3.1.Spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible

L'absorption des radiations lumineuses par la matière dans la plage spectrale s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1 100 nm, a été abondamment étudiée d'un point de vue fondamental. Cette partie du spectre est désignée par l'« UV/Visible », parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'œil humain. D'une manière générale elle apporte peu d'informations structurales, mais elle a, en revanche, beaucoup d'applications en analyse quantitative. Les calculs de concentration qui découlent de la loi de Beer et Lambert ont donné naissance à la méthode connue sous le terme général de colorimétrie. Cette méthode apparaît comme le cheval de labour de tout laboratoire d'analyses. Celle-ci s'applique non seulement aux composés qui possèdent un spectre d'absorption dans le visible mais aussi à tous ceux qui conduisent au moyen d'un réactif spécifique à un dérivé permettant une mesure d'absorbance. Les mesures d'absorption peuvent se faire avec tout un choix

d'appareils qui vont des comparateurs de couleurs et autres colorimètres visuels simples, aux spectrophotomètres automatiques adaptés à l'analyse multicomposants.

Les spectromètres UV/Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance, ou de l'absorbance, en fonction des longueurs d'onde repérées en abscisses, en nanomètres.

IV.3.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

C'est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques ; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules. Dans cette optique les données de la littérature constituent une base intéressante permettant la comparaison avec les valeurs des déplacements chimiques du carbone 13 des composés absents de nos bibliothèques de données, mais aussi elles proposent les valeurs de déplacements chimiques de molécules « modèles » à partir desquelles des reconstitutions de spectres sont possibles. La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale du squelette flavonoïque ainsi que les différents substituants [27].

CHAPITRE V : LA MICROENCAPSULATION ET LES PROCÉDÉS DE MICROENROBAGE, UN DÉFI POUR LA TECHNOLOGIE PHARMACEUTIQUE

V.1. Introduction

Ces dernières années, les microparticules ont fait leur apparition dans de nombreux domaines d'application aussi divers et variés que l'industrie pharmaceutique, les cosmétiques, l'agroalimentaire, les encres ou bien encore les engrais [28,29]. La microencapsulation fait l'objet d'un nombre croissant de publications dans le monde scientifique depuis les années 1970.

La microencapsulation est une technologie à laquelle a recours un grand nombre d'industries impliquées dans la fabrication de produits formulés; elle consiste à incorporer une plusieurs molécules dans des petites sphères creuses ou poreuses de 10 à 500 micromètres de diamètre. Ces molécules sont alors protégées de l'environnement et peuvent être libérées hors de la microsphère, pendant des temps plus ou moins longs variant de quelques heures à plusieurs mois, dans des conditions précises de pH, de température, ou d'autres contraintes spécifiques. L'encapsulation étant coûteuse, il faut justifier son utilisation [30].

Les buts de l'encapsulation peuvent être multiples : protéger une substance, masquer une odeur ou bien encore permettre de contrôler, de déclencher et / ou de cibler la libération d'un principe actif. La microencapsulation s'applique à de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, la pharmacie, les cosmétiques ou bien encore les catalyseurs. Selon les propriétés d'usages recherchées des microparticules, les techniques d'obtention peuvent varier.

Les avantages de la microencapsulation sont sa grande efficacité d'action, son action longue durée, sa commodité d'utilisation, sa réactivité retardée, la protection du principe actif, la transformation de l'aspect de la substance (passage de l'état liquide à l'état solide), la possibilité de transporter un agent thérapeutique de façon sélective sur un site donné sans oublier le faible coût du procédé.

V.2. Différents types de microparticules

Les microparticules sont des systèmes colloïdes développés principalement en vue de leur utilisation thérapeutique. Selon la nature des éléments qui constituent

et leur structure, il est possible de distinguer les liposomes, les microsphères, et les microcapsules [31; 32].

Les procédés de microencapsulation permettent de préparer des microparticules de deux types: (figure V.1.)

- 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 [33].

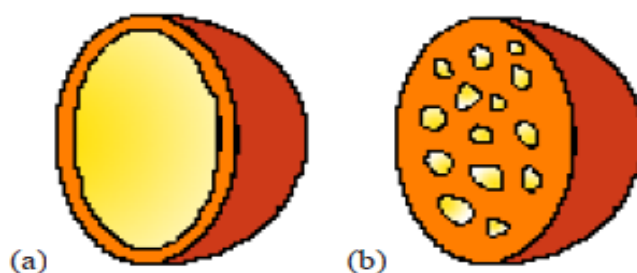


Figure V.1. Types de microparticule (Microcapsule (a) et microsphère (b))

Les microparticules sont des structures réservoirs et sphériques. Elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres. Le principe actif est également dissous dans le cœur huileux, mais peut aussi être absorbé à la surface des microcapsules. Dans cette géométrie, les taux d'encapsulation peuvent être particulièrement élevés : entre 85 et 90 % de masse de matière active par rapport à la masse de microparticules [33].

Les microsphères sont des structures matricielles, de forme sphérique, constituées de polymères de préférence (bio) dégradables. Les premières microsphères ont été développées par Birrenbach et Speider (1976) en utilisant le polyacrylamide réticulé, un polymère non biodégradable. Par la suite, les systèmes biodégradables, à base de

poly (alkylcyanoacrylate) (PACA), ont été développés par Couvreur et al. (1979). Dans le cas de microsphères, le principe actif est soit incorporé à l'intérieur du réseau polymère durant la formation des microsphères, soit adsorbé à leur surface par l'intermédiaire de liaisons de types hydrophobe, électrostatique ou covalente. Il est libéré par simple diffusion ou à la suite de la biodégradation du polymère dans l'organisme. Dans ce cas, les teneurs en matière active sont moindres : de l'ordre de 20 à 35 %, mais parfois ce taux peut atteindre 50% [33].

V.3.Procédés d'encapsulation

Il existe plusieurs manières de classer les procédés industriels d'encapsulation suivant différents critères [33].

- L'utilisation ou non de solvant organique,
- La nature du milieu dispersant : liquide, gazeux ou à l'état supercritique,
- L'utilisation de polymères préformés, de lipides ou de monomères,
- Le procédé utilisé pour réaliser la microencapsulation.

Cette dernière manière de classer les procédés industriels est la plus couramment utilisée. Nous les distinguons comme résume la figure V.2. :

-Les procédés physico-chimiques, basés sur la maîtrise de paramètres tels que la solubilité et la précipitation des polymères en fonction de l'ajout d'un non-solvant, du pH ou de la température mais aussi sur la maîtrise des changements d'état (fusion, solidification) des polymères.

-Les procédés chimiques, basés sur la formation in situ du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation anionique d'unités monomères. De ce fait, ils se distinguent des méthodes physico-chimiques et mécaniques qui utilisent des matériaux enrobant préformés (polymères. Lipides).

-Les procédés mécaniques qui mettent en œuvre des techniques de pulvérisation, de formation de gouttes ou de gouttelettes et d'extrusion.

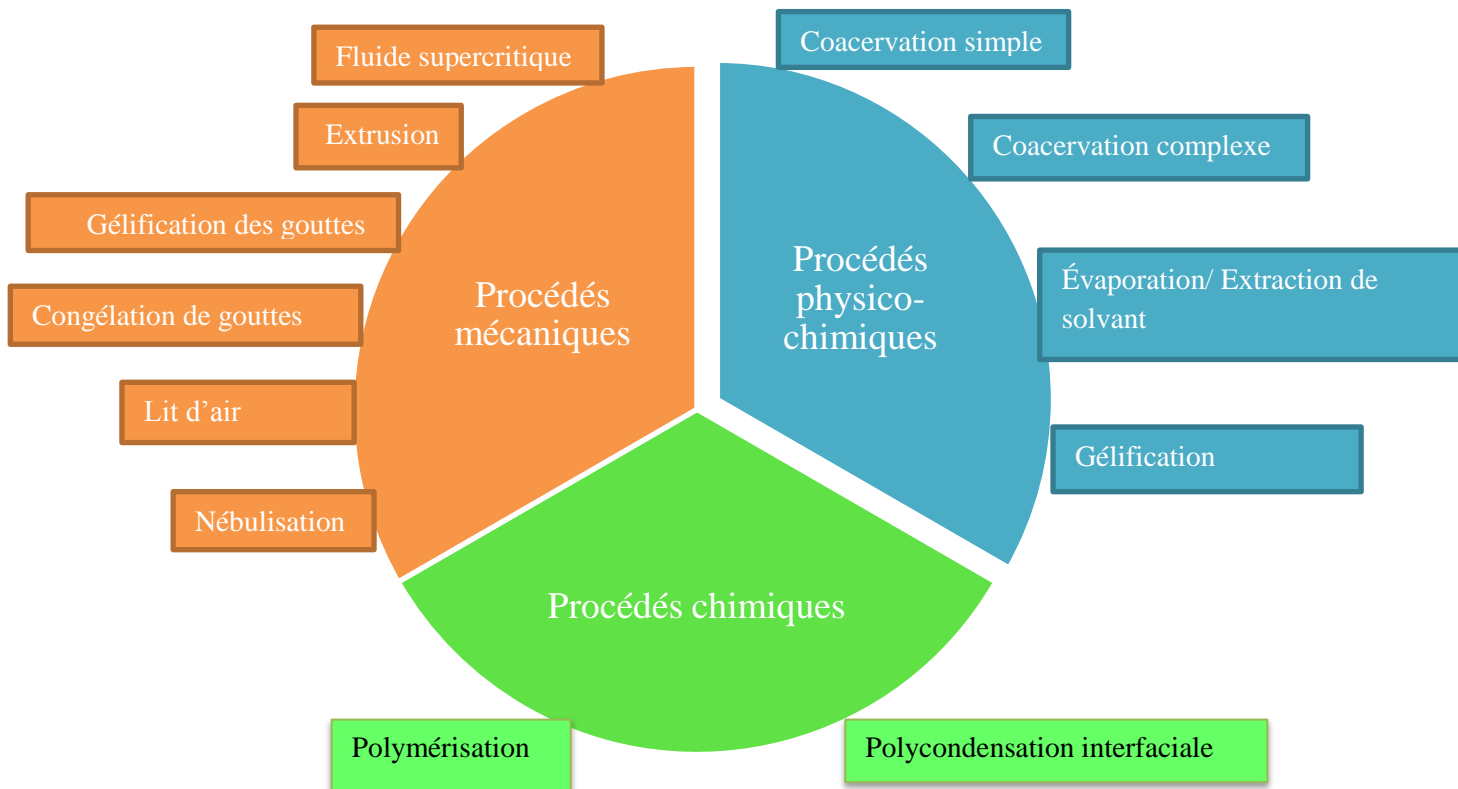


Figure V.2. Les différents procédés d'encapsulation

V.4. Microencapsulation par coacervation complexe :

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

Le procédé de microencapsulation par coacervation complexe se déroule de la façon suivante :

- 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 [33].

Le polyélectrolyte chargé positivement qui est généralement utilisé est la gélatine de haut point isoélectrique (gélatine de type A telle que la gélatine de peau de porc). Les polyanions les plus souvent utilisés sont la gomme arabique, les alginates, les carraghénanes. La carboxyméthylcellulose, les polyphosphates et d'autres.

Les particules obtenues sont des microcapsules. Leur taille varie de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres. Les taux d'encapsulation peuvent être très élevés, de l'ordre de 80%.

La microencapsulation par coacervation complexe est largement utilisée dans de nombreux secteurs industriels. Dans le milieu pharmaceutique, cette technique est également mise en œuvre pour la microencapsulation de paraffine liquide, d'huiles essentielles utilisées en aromathérapie [33].

V.5.Mécanismes de formation de la membrane

La structure de la membrane résulte de l'inversion de phase du solvant va amener la solution de polymère initialement stable jusqu'à l'état instable. La séparation de phase d'une solution de polymère peut-être induite par différents procédés :

- Tremper une solution à une plus basse température,
- Immerger la solution dans un bain de non-solvant,
- Mettre en contact la solution de polymère avec une vapeur de non- solvant,
- Évaporer le solvant.

Pour la formation de membrane, le principe d'immersion/précipitation est le procédé le plus utilisé et le plus étudié. Les procédés de séparation de phase par évaporation ou par contact avec une vapeur de non-solvant sont très proches de celui d'immersion /précipitation car ils sont aussi induits par la diffusion.

La formation de la membrane est un phénomène excessivement rapide. Il ne faut qu'une dizaine de secondes pour que le solvant et le non solvant diffusent

suffisamment pour induire la formation de la membrane [34].

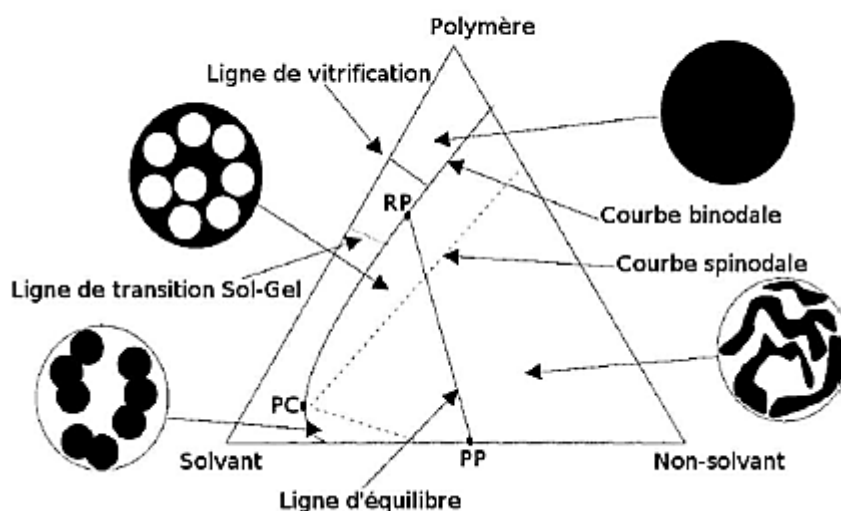


Figure V.3. Représentation schématique d'un diagramme de phase d'un système ternaire polymère/solvant/non-solvant où PC est le point critique, RP le point correspondant à la phase riche en polymère et PP le point correspondant à la phase pauvre en polymère (Kim et al., 1999).

Quand une solution homogène devient thermodynamiquement instable, par exemple, grâce à l'introduction d'un non-solvant, la solution originelle subit une séparation de phase en se séparant en deux phases liquides de composition différente. L'état des solutions de polymère et la composition à l'équilibre peuvent être bien décrits par le diagramme ternaire de phase. Ainsi, les compositions indiquées par les points entre les phases, une riche en polymère et une pauvre en polymère (figure V.3). Cela est appelé la séparation de phase liquide-liquide.

Il existe deux chemins cinétiques pour que la séparation de phase liquide-liquide se produise :

- La nucléation et croissance,
- La décomposition spinodale.

Une fois que la solution de polymère est immergée dans le non-solvant, ce dernier va diffuser à l'intérieur de la solution de polymère et le solvant va diffuser vers le bain.

Les molécules de polymère sont moins mobiles et ne vont se déplacer que sur une très faible distance. Ainsi, le polymère est supposé immobile. Des modèles de transfert massique pour décrire les processus de diffusion spécialement pour les premiers instants de l'immersion ont été développés entre autre Reuvers et al. (1987) et Cohen et al. (1979). De tels modèles cinétiques aboutissent à un chemin de composition sur le diagramme de phase ternaire. Ce chemin représente l'évolution de la composition d'un petit volume de membrane dans le temps. Combiné avec la thermodynamique des équilibres du système, nous pouvons déterminer où et quand le chemin de composition va couper la binodale. Il est alors possible de prédire à quel moment après l'immersion la séparation de phase va commencer près de l'interface et quel va être le profil de concentration de la solution de polymère à cet instant.

DEUXIEME PARTIE

ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

Cette partie constitue les différentes études expérimentales abordées tout au long de ce travail en s'appuyant sur les résultats obtenus.

Dans cette optique, nous allons voir expérimentalement, dans un premier volet l'optimisation des différents paramètres influençant l'extraction par Soxhlet. Ensuite, nous allons faire les dosages des polyphénols que renferme cette plante. Enfin, nous entamerons la microencapsulation de l'extrait obtenu.

CHAPITRE VI : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre travail a été effectué au sein du laboratoire de recherche génie chimique à la faculté des sciences de la technologie à l'université de Blida 1. Le laboratoire s'occupe de l'extraction, la caractérisation et l'analyse des extraits végétaux des plantes ainsi que la détermination de leur activité biologique. L'objectif de ce travail est l'optimisation des paramètres d'extraction et détermination des caractéristiques physico-chimiques de l'extrait.

Ce sixième chapitre est consacré à l'optimisation des paramètres d'extraction des substances constituantes de *Marrubium Vulgare L.* afin de faire la microencapsulation des substances obtenues.

VI.1.MATÉRIEL

VI.1.1.Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude expérimentale est une espèce végétale appartenant à la famille des Lamiacées *Marrubium vulgare*, sa taxonomie et toutes les données la concernant ont été détaillées précédemment. L'organe végétal choisi pour la réalisation des expérimentations de cette étude est la partie aérienne puisque c'est à son niveau que se trouve la majorité des principales substances actives, en d'autre terme, c'est le lieu de synthèse et de la mise en réserve temporaire des principaux composés du métabolisme primaire et secondaire.

VI.1.1.1. La cueillette de Marrubium Vulgare

La partie aérienne de la matière végétale a été cueillie le 24 Février 2014 à 14 °C (journée légèrement nuageuse), à Koléa dans la wilaya de TIPAZA la matinée vers 10 heures. Les plantes sont placées dans des sacs en plastique puis transportées immédiatement au laboratoire en vue du séchage et des analyses.

VI.1.1.2.Prétraitement de Marrubium Vulgare

Le *Marrubium Vulgare L.* cueilli doit être prétraité avant d'entamer l'extraction en passant par un lavage, un séchage et enfin un broyage.

VI.1.1.2.1.Le lavage

Après avoir cueilli la plante, les parties aériennes sont soumises à un rinçage à l'eau de robinet pour éliminer les corps étrangers aux plantes ou les impuretés avant de la faire sécher.

VI.1.1. 2.2. Le séchage

Après avoir rincé, Les parties aériennes sont étendues en couches minces à l'ombre, à bonne aération pendant deux semaines. Après le séchage à l'ombre. Une fois séchées, les feuilles sont broyées afin d'obtenir une poudre prête à l'emploi.



(A)

(B)

Figure VI.1.Séchage de *Marrubium Vulgare L.* (A) : premier jour de séchage; (B) : quatrième jour de séchage.

VI.1.1.2.3.Broyage de la plante

Les plantes séchées doivent être broyées afin d'obtenir une poudre. Pour ce, nous avons utilisé un moulin en acier inoxydable avec couvercle par Original Kaiser Backform permet de saupoudrer les plantes grâce à la toile métallique.



Figure VI.2.Moulin utilisé pour le broyage

VI.1.2. Les produits chimiques utilisés

Au cours de cette optimisation, nous avons utilisé des solvants organique principalement l'éthanol (fournis par QUIMICA PANREAC, Barcelone, 96%), le dichlorométhane (fournis par QUIMICA PANREAC, 98%) et l'éther de pétrole (QUIMICA PANREAC, Barcelone, 60-80°C PA). Nous avons aussi utilisé la gélatine B (GL) (fourni par le groupe pharmaceutique SAIDAL) et la gomme arabique (GA) (Merck Chemicals, Allemagne) pour la microencapsulation.

VI.1.3.Systèmes et dispositifs de l'extraction

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé quelques systèmes à savoir un soxhlet avec ses cartouches et le rotavapor dont nous allons voir ci-après leurs caractéristiques.

VI.1.3.1.Soxhlet

Le Soxhlet que nous avons utilisé est de marque Riviera dont la capacité est de 200 ml. Ce soxhlet est constitué par un condenseur dont le système de refroidissement est assuré par l'entrée d'eau froide depuis le robinet.

Au cours de l'extraction par Soxhlet, nous avons utilisé de papier filtre comme la cartouche.



Figure VI.3. Un dispositif de Soxhlet



Figure VI.4. Cartouche pour Soxhlet

VI.1.3.2. Rotavapor

Afin d'avoir notre propre extrait et de récupérer le solvant, nous avons utilisé un rotavapor de la marque Heidolph lustruments dont la température de bain peut aller jusqu'à 260°C.



Figure VI.5. Rotavapor

VI.2. EXTRACTIONS DES MOLÉCULES BIOACTIVES A PARTIR DE *MARRUBIUM VULGARE L.*

Depuis toujours, le plus grand rôle de l'ingénieur est d'optimiser les procédés afin d'augmenter les bénéfices et surtout de diminuer les coûts, c'est pour cela que lors de cette première étape, nous allons étudier l'optimisation des paramètres d'extraction des molécule bioactives de *Marrubium Vulagare L.*, à savoir la durée d'extraction et la puissance électrique utilisée, En utilisant la méthode des plans d'expérience.

VI.2.1. Optimisations des procédés d'extraction par Soxhlet en utilisant un Plan d'expérience

Nous avons adopté une optimisation par plan d'expériences à deux niveaux avec deux facteurs pour développer la technique d'extraction avec le solvant. Des expériences préliminaires ont été effectuées pour déterminer les paramètres influant et délimiter le domaine d'étude du plan d'expériences. Cette méthodologie va permettre de diminuer le nombre d'expériences à réaliser, tout en augmentant le nombre de renseignements obtenus sans altérer la qualité des résultats.

L'extraction par Soxhlet est réputée comme la technique d'extraction qui favorise l'extraction relativement complète des métabolites présents dans la matrice végétale. Elles ont été effectuées de façon séquentielle, en utilisant des solvants de polarité décroissante.

Les joints du montage étaient recouverts de ruban de téflon pour empêcher les fuites et diminuer les pertes de solvant. Le montage a été réalisé à l'aide d'un ballon de 500 ml rempli avec 350ml de solvant, d'un Soxhlet, d'un réfrigérant ainsi que d'une cartouche faite en papier filtre contenant la matière végétale broyée.

Les solvants utilisés étaient l'éthanol, le dichlorométhane et l'éther de pétrole.

Tableau VI.1. Tableau récapitulatif des caractéristiques des solvants utilisés

Solvant	Formule semi-développée	Point d'ébullition (°C)	Moment dipolaire(D)
Éthanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	78,37	1,69
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	39,6	1,60
Éther de pétrole	CH ₃ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₃	34,6	1,09

VI.2.1.1.. Les paramètres expérimentaux du plan d'expériences (facteurs)

Différents facteurs peuvent influencer sur la qualité d'une extraction par Soxhlet. Dans notre étude, les paramètres expérimentaux qui seront pris en compte dans l'optimisation sont le temps d'extraction et la puissance d'extraction, les valeurs de niveau haut et de niveau bas pour ces deux facteurs en fonction des solvants utilisés sont donnés dans le tableau VI.2. La masse de matière végétale à extraire a été fixée à 20 g pour trois raisons: pour être compatible avec le volume du Soxhlet (le rapport 1 :10 entre la matière végétale et le volume total du Soxhlet), pour assurer une bonne homogénéité des échantillons à extraire, et pour obtenir un volume d'extrait suffisant pour son analyse.

Tableau VI.2. Tableau récapitulatifs de facteurs avec des niveaux choisis.

Facteurs		Solvants		
		Éthanol	Dichlorométhane	Éther de pétrole
Facteur 1 (Puissance)	Niveau haut (+1)	200W	160 W	160 W
	Niveau bas (-1)	140W	120W	120W
Facteur 2 (Durée)	Niveau haut (+1)	140min	80 min	80 min
	Niveau bas (-1)	115min	60 min	60 min

VI.2.1.2.Évaluation de la réponse

Pour optimiser une technique d'extraction la réponse conventionnelle est avant tout le rendement d'extraction qui estime la masse de molécules extraites par rapport au matériel de départ et ensuite nous avons choisi comme réponse l'énergie d'extraction et le dosage de polyphénols. Toutefois dans notre étude, l'extraction à de faibles valeurs de temps et de puissance de chauffage mené à de très faibles quantités extraites ce qui rend l'estimation du rendement d'extraction et de manière répétable, difficile. Par ailleurs, l'objectif de notre étude est de développer une méthode d'extraction qui permette d'obtenir un extrait le plus riche possible en composés phénoliques.

En résumé, nous avons choisi trois réponses principales pour notre plan d'expérience qui sont : le rendement de l'extraction (en pourcentage), l'énergie de l'extraction (en Kilojoule par gramme) et enfin le taux de polyphénols extraits (en équivalent gramme d'acide gallique).

VI.2.1.3. Modélisation mathématiques du plan d'expériences

Afin d'étudier l'influence des facteurs sur les réponses choisies, nous nous sommes orientés vers la réalisation d'un plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux. Toutes les combinaisons des différents niveaux de facteurs sont réalisées au cours de l'expérience.

L'effet des facteurs et de leurs interactions de premier ordre ont été modélisés par l'équation suivante:

$$Y = \beta_0 + \beta_T X_T + \beta_P X_P + \beta_{TP} (X_T \times X_P)$$

Forme adimensionnelle des termes utilisés :

$$X_T = \frac{X_T - \frac{X_{MAi} - X_{Mi}}{2}}{\frac{X_{MAi} - X_{Mi}}{2}}$$

$$X_P = \frac{X_P - \frac{X_{MAi} - X_{Mi}}{2}}{\frac{X_{MAi} - X_{Mi}}{2}}$$

- Y est la réponse
- β_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude, noté 0
- β_i est l'effet du facteur i
- β_{ij} est l'effet de l'interaction entre les facteurs i et j
- X_i est le niveau attribué au facteur i.

Les expériences ont été réalisées dans un ordre aléatoire afin de minimiser des contraintes extérieures inconnues.

VI.2.1.4. Détermination du rendement

Le poids en extraits secs est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après élimination du solvant par évaporation rotatif) et le poids du ballon vide.

Le rendement d'extraction se calcule par :

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

Où :

m_{ext} : masse de l'extrait après l'évaporation du solvant (g);

m_v : la masse végétale initiale dans la cartouche (g).

VI.2.1.5. Détermination de l'énergie d'extraction

L'énergie d'extraction se calcule par :

$$E = \frac{P.t}{m_v} \text{ (J/g)}$$

Où :

P : la puissance de chauffage (W);

t : la durée d'extraction (s);

m_v : la masse végétale (g).

VI.3. Dosage de polyphénols de l'extrait de *Marrubium Vulgare L.*

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits de la partie aérienne de *Marrubium Vulgare L.*, a été effectué spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu [36]. Le réactif est formé d'acide phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_4$) qui sont réduits lors de l'oxydation des composés phénoliques en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3).

Principe :

Les composés phénoliques totaux sont déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre de marque SHIMADZU à UV (Ultra-Violets) visible après 2 heures d'incubation à température ambiante par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 768 nm. La quantification est faite selon une gamme-étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (0 à 100 µg/ml). Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique par ml d'extrait.

VI.4. Microencapsulation de l'extrait

VI.4.1.2. Préparation des microcapsules

La méthode de microencapsulation utilisée dans la présente étude est basée essentiellement sur la procédure décrite dans la littérature [37,38]. La désolvation simultanée de deux polymères de type polyélectrolytes hydrosolubles de charge opposée Gélatine (G) et Gomme Arabique (GA) est provoquée, suite à une modification du pH du milieu réactionnel et à l'attraction électrostatique induite des deux polymères. Une fois le coacervat formé et déposé autour du PA (mélange de molécules lipophiles et hydrophiles), la température est abaissée à 5°C afin d'obtenir une gélification de l'enrobage. La réticulation des microcapsules obtenues se fait par ajout de formaldéhyde, ce qui permet de solidifier les particules.

VI.4.1.3. Optimisation du procédé de microencapsulation :

L'objectif de ce travail est de déterminer les conditions optimales de coacervation du système protéines du gélatine/gomme arabique, dans le but de l'utiliser dans un procédé d'encapsulation de l'extrait de *Marrubium Vulgare L.*

Nous avons utilisé un plan factoriel complet à deux niveaux avec trois:

- Facteur 1 : le ratio gélatine : gomme arabique
- Facteur 2 : le ratio noyau : paroi
- Facteur 3 : la quantité de l'agent de durcissement (ml)

Réponses prise en considération dans le plan d'expérience :

- Réponse 1 : Le rendement de la coacervation (%)
- Réponse 2 : L'efficacité d'encapsulation (%)

Les essais du plan d'expériences sont présentés dans le tableau VI.3.

Tableau VI.3 : Essais du plan d'expérience : matrice des facteurs et des réponses pris en considération dans le plan d'expériences

Récapitulatif des facteurs

Essais	le ratio noyau : paroi	Ratio gélatine/ gomme acacia	Agent de durcissement (ml)
1	-1	+1	+1
2	+1	-1	+1
3	-1	-1	+1
4	+1	+1	+1
5	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1
7	+1	-1	-1
8	-1	+1	-1

vi.2.Les niveaux haut et bas des facteurs

Facteurs :	le ratio noyau : paroi	Ratio gélatine/ gomme acacia	Agent de durcissement (ml)
niveau haut = 1	1/3	5/2	2
niveau bas = -1	1/4	5/3	1

Dans le cadre de cette étude, nous utilisons le plan d'expérience afin d'optimiser le procédé de formulation des microparticules. Nous résumons dans cette partie les

notions principales nécessaires à la réalisation de cette microencapsulation.

VI.4.1.4. Caractérisation des microcapsules

Dans le but de caractériser les microcapsules formulées et d'optimiser la procédure de préparation, plusieurs paramètres de formulation et de procédé sont étudiés.

VI.4.1.4.1. Le rendement de la coacervation

Le rendement de la coacervation est déterminé à partir de la masse des coacervats obtenus en fonction de la masse totale des ingrédients utilisés.

Le rendement de la coacervation se calcule par :

$$R(\%) = \frac{m(\text{encapsulée})}{(m(\text{PA}) + m(\text{G}) + m(\text{GA}))} \times 100$$

Où :

R = Rendement (%);

m : microparticules obtenu après le séchage (g);

m(PA) : masse de principe actif utilisé (g) ;

m(G) : masse de gélatine utilisé (g);

m(GA) : masse de gomme arabique utilisé (g).

VI.4.1.4.2. L'efficacité d'encapsulation des polyphénols

L'efficacité d'encapsulation, représente le pourcentage du PA (la teneur en PA) présent dans les microcapsules, et obtenu par spectroscopie SHIMADZU pour UV-Visible de 300 à une longueur d'onde de 800 nm.

Comme nous avons encapsulé les polyphénols, le taux d'encapsulation a été effectué spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu. Pour cela, nous avons ajusté la solution surnageant à un volume connu (dans notre cas, nous avons ajusté à 150 ml) et puis nous faisons la lecture UV-Visible ; en connaissant la concentration et le volume, nous pouvons tirer directement la masse.

$$\text{Taux d'encapsulation(\%)} = \frac{m(\text{initiale}) - m(\text{non encapsulée})}{m(\text{initiale})} \times 100$$

Où :

m (initiale) : la masse de PA initiales à encapsuler

m (non encapsulée) c'est la masse de PA non encapsulés (resté en solution dans le filtrat).

VI.4.1.4.3. Analyse microscopique

Après avoir obtenu les microcapsules, nous avons effectué une caractérisation par microscopie optique afin de voir leur taille et leur structure.



Figure VI.6. Microscope optique Olympus BX60

VI.4.1.4.4. Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique est très importante dans le domaine pharmaceutique. Plus elle est uni modale (taille homogène), plus elle est stable. Dans notre travail, nous avons utilisé un logiciel Mesurim afin de fournir une échelle pour une photographie réalisée sous microscope.

Pour cela il est nécessaire de réaliser dans les mêmes conditions d'observation (même grossissement), une photographie d'une préparation dont les dimensions sont connues.

CHAPITRE VII. RESULTATS ET DISCUSSION

VII.1.Optimisation des paramètres d'extractions

Les extractions de Marrubium Vulgare L. ont été effectuées avec un Soxhlet de 200ml contenant 20g de matrice végétale par des différents solvants de polarité différente afin de les optimiser.

VII.1.1.Extraction éthanoïque

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux en utilisant l'éthanol sont représentés sous forme de tableau (Tableau VII.1).

Tableau VII.1. Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les deux facteurs étudiés : temps d'extraction et durée d'extraction. Les niveaux -1 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur et le niveau supérieur du domaine d'étude

Puissance	Durée	Rendement	Énergie d'extraction	Dosage des polyphénols
Watt	minutes	%	kJ/g	EAG
-1	-1	19,88	48,3	13,38
+1	-1	25,11	69	17,63
-1	+1	22,32	58,8	58,57
+1	+1	34,15	84	67,63

Tableau vii.1.Les niveaux haut et bas des facteurs

Facteurs :	La durée d'extraction (min)	Puissance d'extraction (Watt)
niveau haut = 1	140	200
niveau bas = -1	115	140

VII.1.1.1. Coefficient de corrélation et de répétabilité

Sur l'histogramme suivant (VII.1), nous représentons les coefficients de corrélation et

de prédiction pour chacune des réponses.

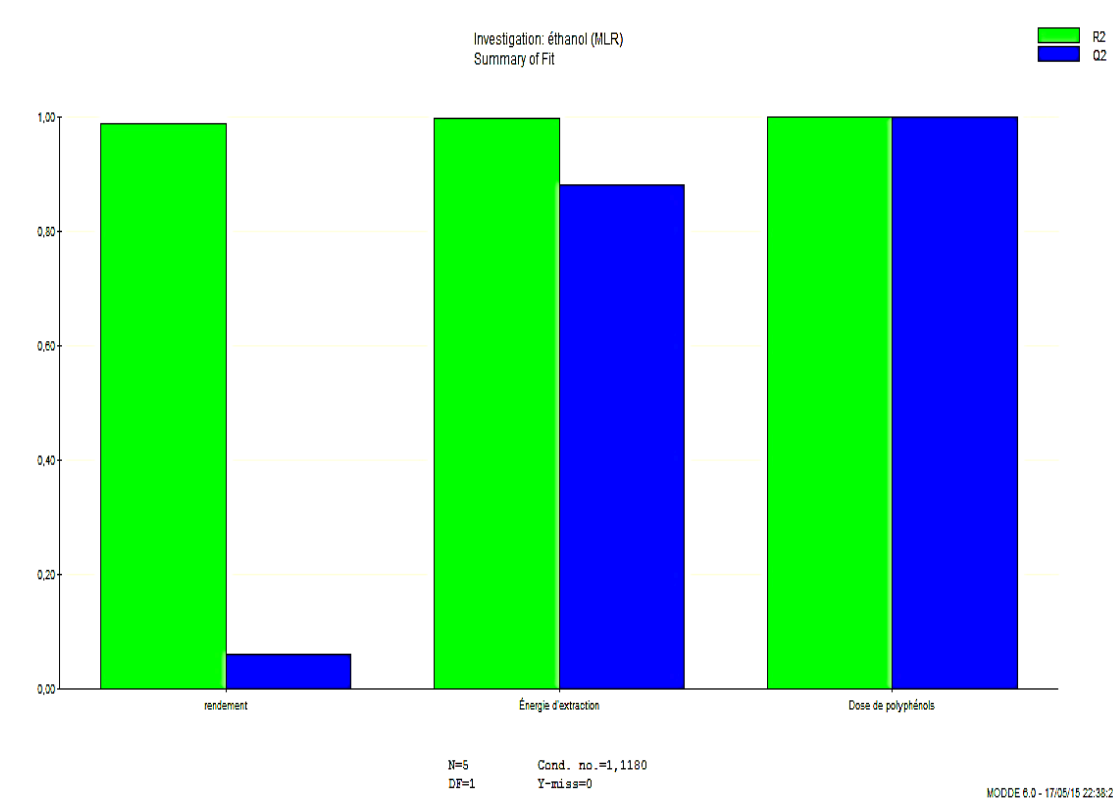


Figure VII.1. Représentation des coefficients de corrélation et de prédiction pour l'éthanol.

Au vu de ces résultats, nous pouvons déduire que les modèles choisis expliquent en grande partie les variations observées. Les coefficients de prédiction est assez faible dans le cas de rendement. La qualité de prédiction du modèle est bonne puisque dans les deux cas les valeurs de Q^2 sont positives et proche de 1.

VII.1.1.2. Effets des facteurs étudiés sur les réponses

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux sont représentés sous forme de histogramme, qui classent les effets contribuant à chacune des réponses par ordre décroissant d'importance.

Le graphe VII.2. Suivant représente influence de temps et de puissance sur le rendement.

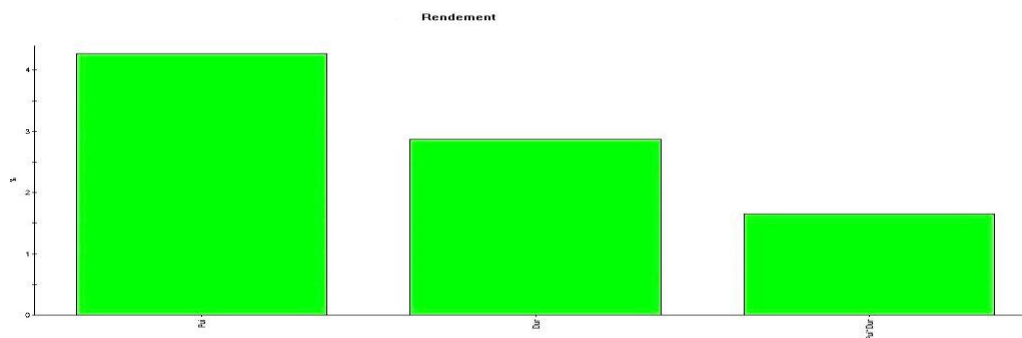


Figure VII.2. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur le rendement.

Nous observons une influence positive de la durée et une influence doublement positive de puissance sur le rendement, l'interaction entre les deux facteurs présente une influence faible presque la moitié de celle de durée.

L'augmentation du temps et de la puissance d'extraction ensemble donne moins de rendement par rapport à leur effet séparément.

Le graphe VII.3. Représente influence de temps et de puissance sur l'énergie d'extraction.

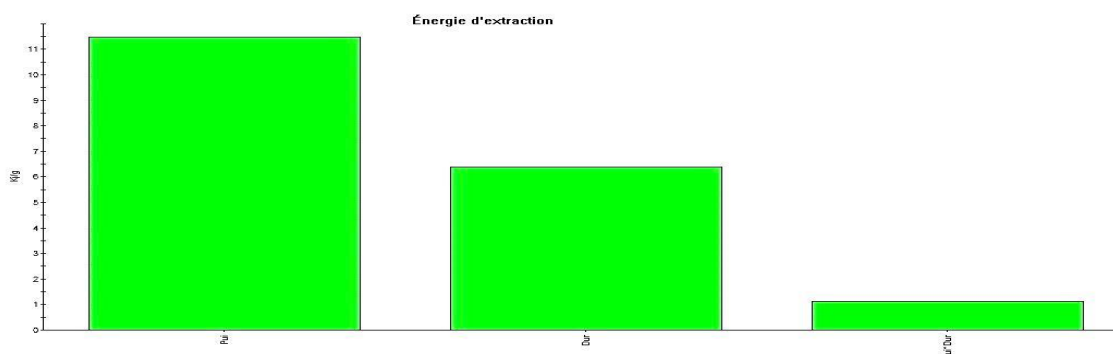


Figure VII.3. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur l'énergie d'extraction.

A travers cet histogramme, nous observons une influence positive de la durée et une influence doublement positive de puissance sur l'énergie d'extraction, l'interaction entre les deux facteurs présente une influence très faible.

Le graphe VII.4. Représente influence de temps et de puissance sur le dosage de polyphénol.

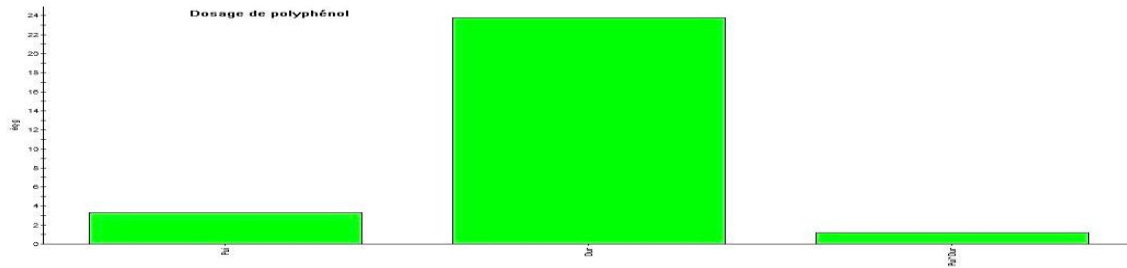


Figure VII.4. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur le dosage de polyphénols.

Nous observons à travers cet histogramme une influence positive de la puissance mais qui est très faible et une influence doublement positive de durée sur le dosage de polyphénols, l'interaction entre les deux facteurs présente une influence très faible.

VII.1.1.3. Estimation des effets principaux, des effets et des interactions sur les réponses

VII.1.1.3.1. Influence des facteurs sur le rendement

Nous représentons sur la figure ci-après la variation de ces deux réponses sur le rendement

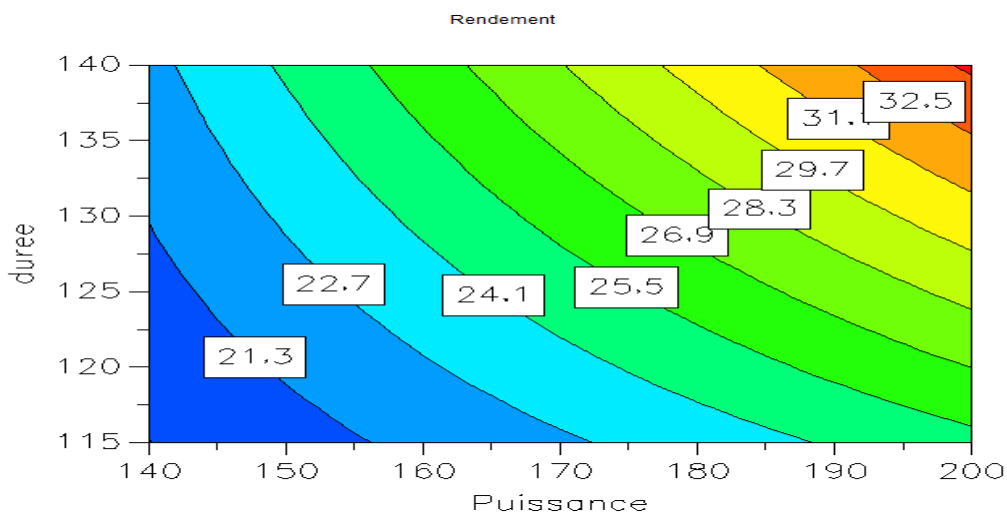


Figure VII.5. Courbe d'iso réponse montrant la variation de rendement en fonction de la puissance et le temps d'extraction pour l'éthanol.

Nous remarquons l'augmentation du rendement en fonction du temps et de la puissance jusqu'à atteindre un seuil de 32,5 %. L'augmentation du rendement est due

en premier lieu, au temps de séjour de la matrice végétale dans le solvant et ce, en augmentant la durée, permettant son épuisement et en second lieu, l'éthanol est un solvant polaire qui peut extraire toutes les molécules bioactives ce qui implique l'augmentation du rendement.

VII.1.3.2. Influence des facteurs sur l'Énergie d'extraction

La variation de l'énergie d'extraction en fonction de durée et de la puissance d'extraction est représentée dans le graphe suivant.

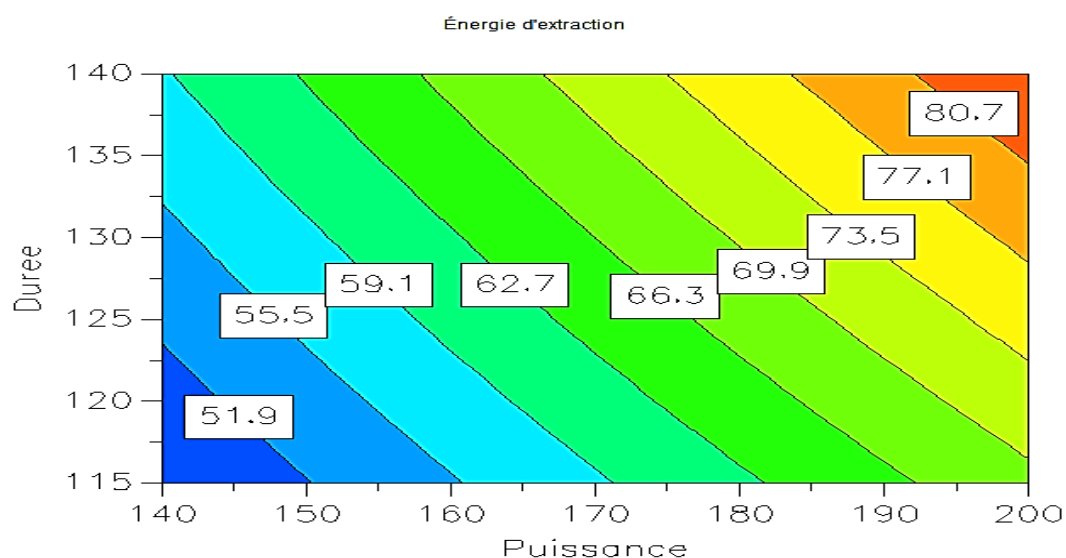


Figure VII.6. Courbes d'iso réponse montrant l'effet de la puissance et de la durée d'extraction sur l'énergie d'extraction pour l'éthanol.

Nous remarquons une augmentation de l'énergie consommée par notre plante qui est de 80,7 KJ/g à ce qui correspond à l'augmentation de la puissance et celle de temps. Ici nous remarquons que l'énergie d'extraction varie avec la puissance et la durée d'extraction.

Ceci peut s'expliquer par le fait que plus nous augmentons la puissance et la durée, plus l'évaporation de l'éthanol demande de l'énergie.

VII.1.1.3.2. Influence des facteurs sur le dosage de polyphénols

Le graphe suivant représente l'effet de variation de dosage de polyphénol en fonction de durée et de la puissance d'extraction.

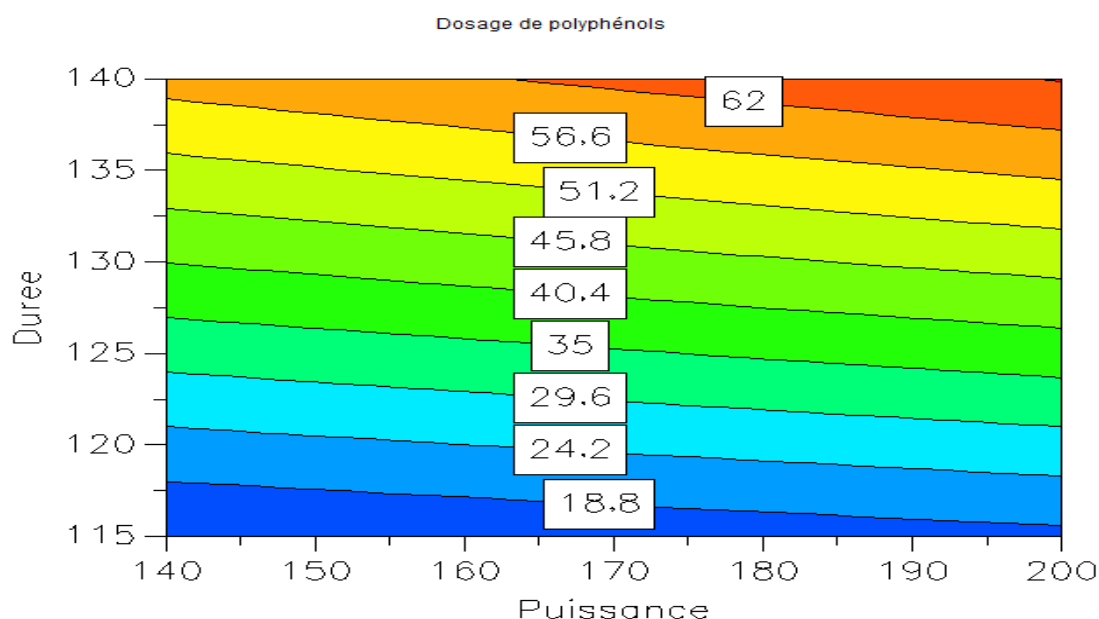


Figure VII.7. Courbes d'iso réponses obtenues, montrant l'effet de la durée et de la puissance sur les polyphénols.

La quantité en composés phénoliques augmente considérablement lorsqu'on augmente la puissance et la durée d'extraction. Ainsi il semble que la durée d'extraction augmente la quantité de composés phénoliques extraits. A 170 W, les polyphénols extraits se stabilisent cependant plus nous augmentons la durée de l'extraction, plus les polyphénols extraits augmentent dont le maximum en est 62 Éq-g d'acide gallique. Ce qui signifie, 170 W est la puissance seuil d'extraction cependant l'augmentation du temps permet son épuisement.

VII.1.1.4. Modélisations mathématiques de l'extraction de *Marrubium Vulgare L.* de l'extrait éthanoïque

En analysant par ANOVA, nous avons obtenu pour chacune des réponses étudiées les modèles mathématiques suivants respectivement pour le rendement, l'énergie d'extraction et le dosage de polyphénols:

$$Y_1 = 25,365 + 4,265X_P + 2,87X_T + 1,68 X_P X_T$$

$$Y_2 = 65,025 + 11,475X_P + 6,375X_T + 1,125 X_P X_T$$

$$Y_3 = 39,302 + 3,327X_P + 23,797X_T + 1,202X_P X_T$$

Où,

X_P = le facteur de puissance

X_T = le facteur du temps.

VII.1.2.Extraction avec le dichlorométhane

Après avoir fini l'extraction par l'éthanol, nous avons lancé une extraction par le dichlorométhane qui est plus polaire comme dans le cas d'éthanol, nous avons aussi fait une optimisation en variant la durée et la puissance d'extraction.

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux en utilisant le dichlorométhane sont représentés sous forme de tableau (Tableau VII.2).

Tableau VII.2. Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les deux facteurs étudiés : temps d'extraction et durée d'extraction. Les niveaux -1 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur et le niveau supérieur du domaine d'étude.

Puissance	Durée	Rendement	Énergie d'extraction	Dosage des polyphénols
Watt	minutes	%	kJ/g	EAG
-1	-1	11,88	21,6	15,09
+1	-1	12,22	28,8	23,09
-1	+1	11,24	28,8	38,63
+1	+1	12,61	38,8	40,63

Tableau vii.2. Les niveaux haut et bas des facteurs

Facteurs :	La durée d'extraction (min)	Puissance d'extraction (Watt)
niveau haut = 1	80	160
niveau bas = -1	60	120

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux en utilisant le dichlorométhane sont représentés sous forme de histogramme (Figure VII.5), qui classent les effets contribuant à chacune des réponses par ordre décroissant d'importance.

VII.1.2.1. Coefficient de corrélation et de répétabilité

Le graphe suivant représente le coefficient de corrélation et de prédiction pour les extraits dichlorométhanoïque.

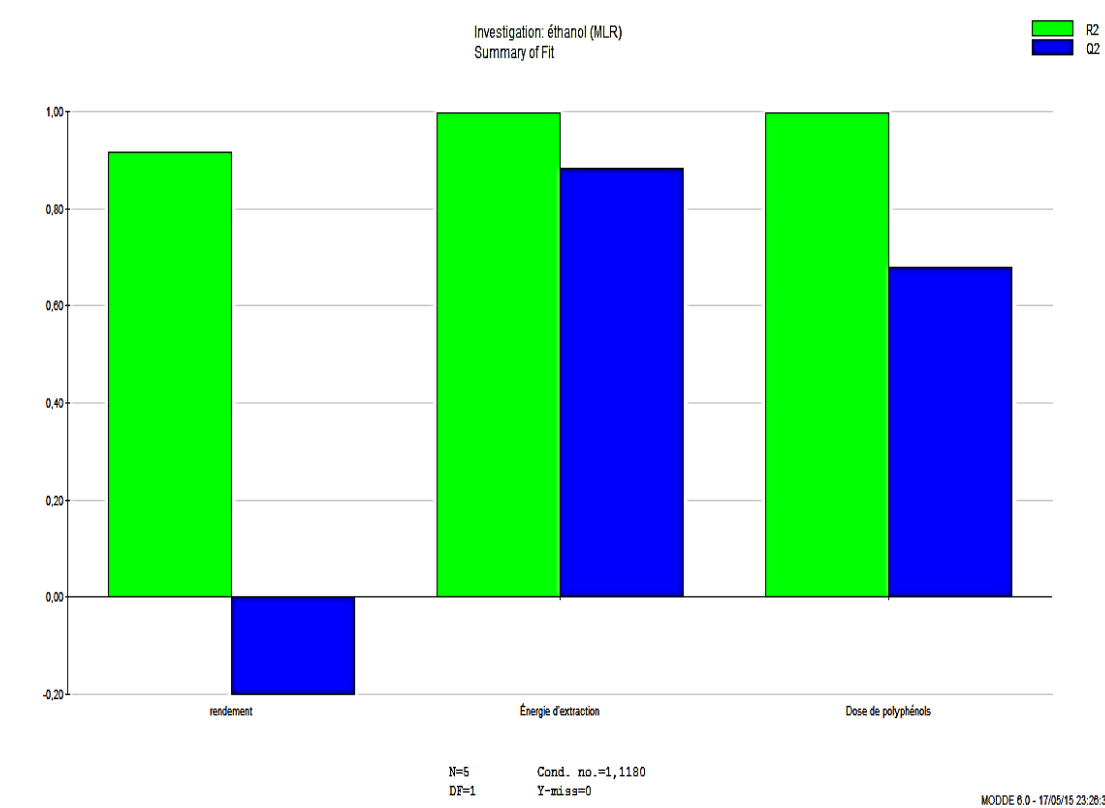


Figure VII-8 : Représentation des valeurs de R² et Q² pour le dichlorométhane.

Au vu de ces résultats, nous pouvons déduire que les modèles choisis expliquent en grande partie les variations observées. La qualité de prédiction du modèle est également bonne puisque dans les deux cas sauf pour le rendement, les valeurs de Q^2 sont positives.

VII.1.2.2.Effets des facteurs étudiés sur les réponses des extraits de dichlorométhane

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux sont représentés sous forme de histogramme, qui classent les effets contribuant à chacune des réponses par ordre décroissant d'importance. Le graphe 1.1 de l'annexe 1 représente influence de temps et de puissance sur le rendement. Ce graphe montre une influence négative du temps est observée et une influence positive de la puissance sur le rendement. Cependant, leur interaction est positive.

Le graphe 1.2 de l'annexe 1 représente influence de temps et de puissance sur l'énergie d'extraction. A travers cet histogramme, nous observons une influence positive de la durée et de puissance sur l'énergie d'extraction, l'interaction entre les deux facteurs présente une influence un peu faible. Ceci peut expliquer par le fait que le dichlorométhane est très volatil.

Le graphe 1.3 de l'annexe 1 représente influence de temps et de puissance sur le dosage de polyphénol. Nous observons à travers cet histogramme une influence positive de la puissance mais qui est très faible et une influence doublement positive de durée sur le dosage de polyphénols, l'interaction entre les deux facteurs présente une influence négative.

VII.1.2.2.1.Influence des facteurs sur le rendement

La figure de courbe d'iso réponse de l'extrait de dichlorométhane illustre l'évolution du rendement d'extraction en fonction de la puissance du chauffage et de la durée d'extraction. Nous avons constaté que les conditions opératoires n'ont pas un effet sur le rendement. Il peut être observé que l'évolution du rendement d'extraction n'est pas corrélée à l'évolution de la puissance de chauffage et de la durée d'extraction (Figure 1.4.de l'annexe 1).

VII.1.2.2. Influence des facteurs sur l'Énergie d'extraction

En analysant la courbe d'iso réponse (Figure 1.5. annexe 1), nous remarquons une augmentation de l'énergie consommée par notre plante qui est de 36,9 KJ/g à ce qui correspond à l'augmentation de la puissance et celle de temps. Ici nous remarquons que l'énergie d'extraction varie avec la puissance et la durée d'extraction.

Ceci peut s'expliquer par le fait que plus nous augmentons la puissance et la durée, plus l'évaporation de dichlorométhane demande de l'énergie.

VII.1.2.3. Influence des facteurs sur les polyphénols

La quantité en composés phénoliques augmente considérablement lorsqu'on augmente la puissance et la durée d'extraction. Ainsi il semble que la durée d'extraction augmente la quantité de composés phénoliques extraits (Voir annexe 1. Figure 1.6.).

VII.1.2.3. Modélisation mathématique de l'extraction dichlorométhanoïque de *Marrubium Vulgare L.*

En analysant par ANOVA, nous avons obtenu pour chacune des réponses étudiées les modèles mathématiques suivants respectivement pour le rendement, l'énergie d'extraction et le dosage de polyphénols:

$$Y_1 = 11,9877 + 0,4275 X_P - 0,0625 X_T + 0,2575 X_P X_T$$

$$Y_2 = 29,5 + 4,3 X_P + 4,3 X_T + 0,7 X_P X_T$$

$$Y_3 = 29,36 + 2,5 X_P + 10,27 X_T - 1,5 X_P X_T$$

Où,

X_P = c'est le facteur de puissance

X_T = c'est le facteur du temps.

VII.1.3.Extraction avec l'éther de pétrole

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux en utilisant le dichlorométhane sont représentés sous forme de tableau (Tableau VII.3).

Tableau VII.3. Matrice expérimentale du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux pour les deux facteurs étudiés : temps d'extraction et durée d'extraction. Les niveaux -1 et +1 représentent respectivement le niveau inférieur et le niveau supérieur du domaine d'étude.

Puissance	Durée	Rendement	Énergie d'extraction	Dosage des polyphénols
Watt	minutes	%	J/g	EAG
-1	-1	4,1	21,6	13,47
+1	-1	7,09	28,8	13,2
-1	+1	11,9	28,8	17
+1	+1	15,36	38,8	18,11

Tableau vii.3.Les niveaux haut et bas des facteurs

Facteurs :	La durée d'extraction (min)	Puissance d'extraction (Watt)
niveau haut = 1	80	160
niveau bas = -1	60	120

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux en utilisant l'éther de pétrole sont représentés sous forme de histogramme (Figure VII.9), qui classent les effets contribuant à chacune des réponses par ordre décroissant d'importance.

VII.1.3.1. Coefficient de corrélation et de prédiction

Sur l'histogramme suivant, nous avons représenté les coefficients de corrélation et de prédiction pour chacune des réponses.

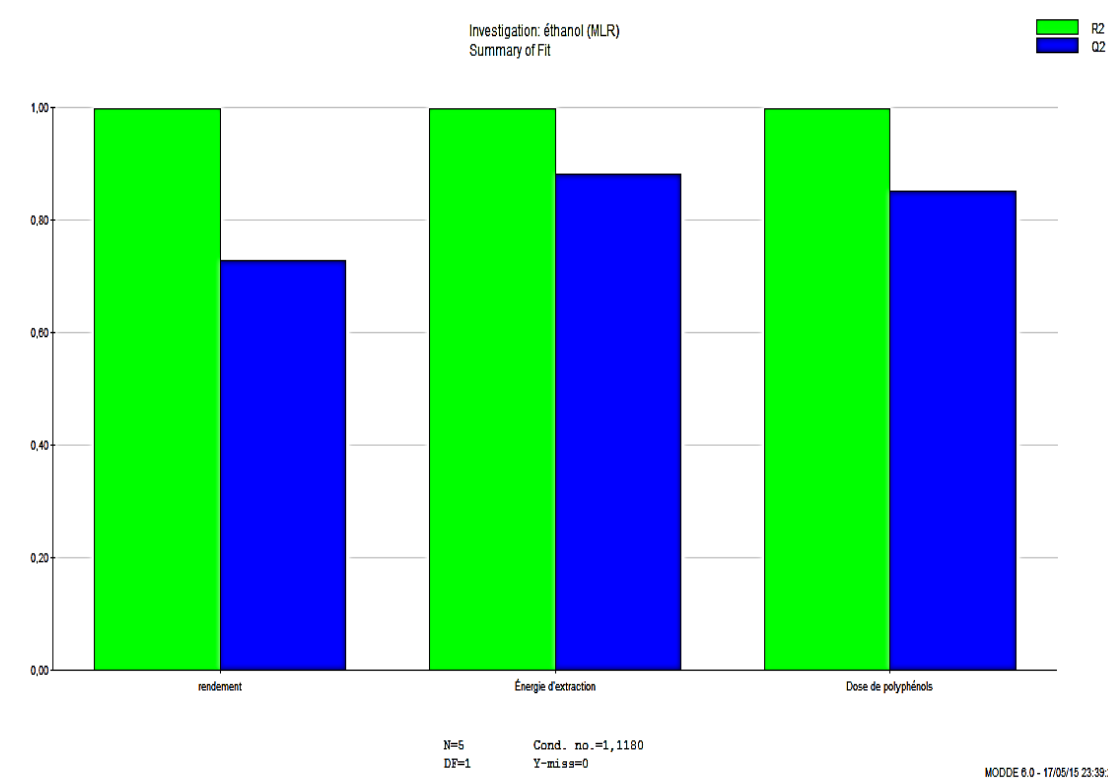


Figure VII.9 : Représentation des valeurs de R^2 et Q^2 pour le plan d'expérience d'éther de pétrole.

Au vu de ces résultats, nous pouvons déduire que les modèles choisis expliquent en grande partie les variations observées. La qualité de prédiction du modèle est également bonne puisque dans les deux cas les valeurs de Q^2 sont positives.

VII.1.3.2. Effets des facteurs étudiés sur les réponses

Les résultats du plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux sont représentés sous forme de histogramme, qui classent les effets contribuant à chacune des réponses par ordre décroissant d'importance. A travers une courbe de contour de réponse Figure 1.8 annexe 1 nous observons une influence positive de la puissance et une influence doublement positive de la durée sur le rendement, l'interaction entre les deux facteurs présente une influence très faible. L'augmentation du temps et de la

puissance d'extraction ensemble donne moins de rendement par rapport à leur effet séparément.

Le graphe 1.8 de l'annexe 1 montre une influence positive de la durée et de puissance sur l'énergie d'extraction, l'interaction entre les deux facteurs présente une influence un peu faible. Ceci peut expliquer par le fait que le dichlorométhane est très volatil.

Nous observons à travers cet histogramme une influence positive de la puissance mais qui est très faible et une influence doublement positive de durée sur le dosage de polyphénols, l'interaction entre les deux facteurs présente une influence très faible (Annexe 1, figure 1.9).

VII.1.3.3. Influence des facteurs sur le rendement

La figure 1.10 de l'annexe 1 illustre l'évolution du rendement d'extraction en fonction de la puissance du chauffage et de la durée d'extraction. Dans ce cas, le rendement d'extraction, déterminé par le rapport entre la quantité de matière obtenue après extraction et la quantité de matière utilisée au départ, a pu être évalué car suffisamment de matière extraite était disponible. Il peut être observé que l'évolution du rendement d'extraction est parallèlement corrélée à l'évolution de la puissance de chauffage et de la durée d'extraction. De plus, nous voyons que la durée est plus influent que la puissance d'extraction, une augmentation de la durée et une augmentation du rendement de 5,2 à 15,1 % ; et en augmentant la puissance, le rendement d'extraction n'évoluent pas vraiment.

VII.1.3.4. Influence des paramètres sur l'Énergie d'extraction

La courbe d'iso-réponse annexe 1 figure 1.11 montrent que l'énergie d'extraction augmente significativement plus la puissance et la durée d'extraction augmentent, ce qui corrèle parfaitement avec l'évolution de la du rendement. En se référant sur les courbes d'iso-réponses, nous constatons que la puissance est la plus influent.

VII.1.3.5. Influence des paramètres sur les polyphénols

La quantité en composés phénoliques augmente considérablement lorsqu'on augmente la puissance et la durée d'extraction. A 140 W, l'extraction de l'extrait de plante se stabilise ce qui veut dire qu'à cette puissance nous pouvons déjà extraire

tous types de polyphénols cependant, l'influence du temps continue positivement jusqu'à l'épuisement de la plante. Le résultat de contour de courbe de réponse est illustré dans la figure 1.12 de l'annexe 1.

VII.1.3.6. Modélisation mathématique de l'extraction étheropétrolique de *Marrubium Vulgare L.*

En analysant par ANOVA, nous avons obtenu pour chacune des réponses étudiées les modèles mathématiques suivants respectivement pour le rendement, l'énergie d'extraction et le dosage de polyphénols:

$$Y_1 = 9,6125 + 1,625 X_P + 4,0175 X_T + 0,1175 X_P X_T$$

$$Y_2 = 29,5 + 4,3 X_P + 4,3 X_T + 0,7 X_P X_T$$

$$Y_3 = 15,445 + 0,21 X_P + 2,11 X_T + 0,345 X_P X_T$$

Où,

X_P = c'est le facteur de puissance

X_T = c'est le facteur du temps.

VII.1.4. Discussion

L'utilisation de Soxhlet visait à augmenter les rendements d'extractions des molécules naturelles de *Marrubium Vulgare L.* Trois optimisations d'extractions ont été réalisées; la première avec l'éthanol et la seconde avec dichlorométhane enfin, la troisième avec l'éther de pétrole. L'extraction effectuée a permis d'obtenir des rendements optimums de 34,15% avec l'éthanol et de 13,01 % avec le dichlorométhane, quand à éther de pétrole, nous avons obtenu 15,36 %.

Pour l'obtention des différents extraits de la poudre de la partie aérienne de *Marrubium Vulgare L.* par la méthode de Soxhlet, nous avons réalisé des extractions organiques avec des solvants à polarité croissante : EP, DCM et EthOH.

Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts pour la plante en choisissant les optimums de chacune des conditions d'extractions : l'extrait éther de pétrole (EEP),

l'extrait dichlorométhane (EDCM) et l'extrait éthanol (EEthOH).

L'extrait EthOH de *Marrubium Vulgare L.* représente le rendement le plus élevé 34,15 % suivi de l'EEP a le plus faible rendement avec 13,01 %. Le rendement des extractions, l'aspect et la couleur des extraits sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII.4. Aspects, couleurs et rendements des extraits de la partie aérienne de *Marrubium Vulgare L.*

Plante	Extrait	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Marrubium Vulgare L.	EP	Pâte huileux	Vert foncé	15,36
	DCM	Pâteux	Noire	13,01
	EthOH	Pâte collante	Noire	34,15

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de cette plante selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction.

VII.1.4. Conclusion

Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts pour chaque solvant : l'extrait méthanoïque, l'extrait éther de pétrole (EEP) et l'extrait dichlorométhane (EDCM). Du point de vue rentabilité en poids, les extraits polaires (éthanol) ont donné les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits polaires (EP et DCM) ; cela peut s'expliquer par le fait que l'EP et le DCM sont des solvants organiques apolaires très volatils et juste utilisés pour dégraisser les drogues.

VII.2. Quantification des polyphénols dans l'extrait brut des différents solvants

En se basant sur les valeurs d'absorbance des diverses solutions d'extrait, ayant réagi avec le réactif de Folin Ciocalteu et comparées à la solution étalon en équivalence d'acide gallique comme décrit ci-dessus, les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux sont résumés dans le tableau VII.5 et sont représentés sur la figure VII.10.

Tableau VII.5. : Les résultats de l'analyse colorimétrique des composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux.

Expérience		Molécules recherchées	
Puissance (W)	Durée (minute)	Extrait	Teneur en composés phénoliques (mg GAE)
+1	+1	EP	18,11±1,27
		DCM	40.63 ± 3.02
		EthOH	67.63 ± 5.73
-1	+1	EP	17,00±0,20
		DCM	38.63 ± 4,12
		EthOH	58.57 ± 6.73
+1	-1	EP	13,20±0,53
		DCM	17.63 ± 3.73
		EthOH	23,09 ±3,13
-1	-1	EP	13,47±0,50
		DCM	13.38 ± 4.09
		EthOH	15,09±2,15

Suivant le tableau ci-dessus, les teneurs en polyphénols enregistrés en équivalent d'acide gallique en µg par mg d'extrait, montre des proportions allant de 1,8 à 6,7 % de poudre de *Marrubium vulgare L.* suivant les optimums choisis selon les conditions choisies.

L'extrait EthOH de *Marrubium Vulgare L.* représente la teneur la plus élevée en polyphénols, ce résultat confirme la grande richesse de cette plante en substances polyphénoliques. L'extrait EP représente la fraction la plus pauvre en polyphénols avec 1,8 %. Alors qu'en contenu flavonoïdique, l'extrait DCM a les teneurs les plus importantes.

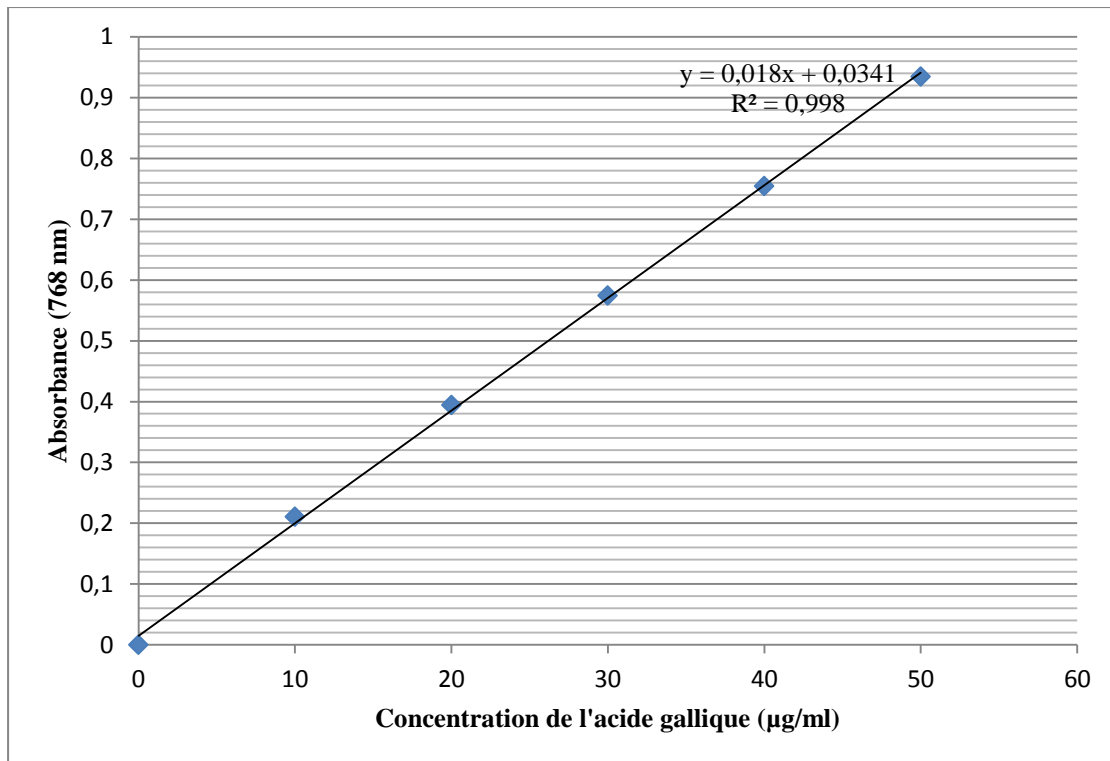


Figure VII.10. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La quantité de composés phénoliques totaux aurait varié considérablement à travers les divers temps et puissances d'extractions choisies de plante et s'est étendue de 67,63 à 13,20 mg d'acide gallique équivalent / g de matière sèche respectivement au niveau du point (-1;-1) et (+1;+1) du plan d'expérience. Nous avons vu que l'éthanol permet d'extraire une grande quantité de polyphénols par rapport aux autres solvants.

VII.2.3. Discussion

Un rendement de 39,2% de l'extrait brut a été obtenu à partir de la partie aérienne de la même espèce lors d'une étude entreprise par Kanyonga et *al.*, (2011). C'est un pourcentage nettement supérieur à celui obtenu dans notre cas (34,15 % pour l'éthanol). Ceci pourrait être dû à la technique utilisée par l'auteur. En fait, Su et *al.*, (2006) ont rapporté que le rendement des extractions augmente avec la température.

La teneur en polyphénol au niveau de la partie aérienne de la plante *Marrubium vulgare* pour l'éthanol testée est de 67,63 % (meilleur solvant selon le plan d'expérience). Moussaid et *al.*, (2012), Elberry et *al.*, (2011) et Warda et *al.*, (2009)

ont fait des études de la composition de ces polyphénols chez la même espèce dans des travaux antérieurs réalisés récemment. En effet, le solvant à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2011). Un taux de 18, 21mg EAG/ml d'extrait a été avancé par Boudjelal, (2012). Une teneur extrêmement importante en composés phénoliques totaux de *Marrubium vulgare* a été notée lors d'une étude menée par Matkowski et Piotrowska, (2006). Cette variabilité dans les résultats pourrait être liée aux conditions climatiques du biotope de l'espèce ou aux différentes méthodes suivies lors de l'extraction.

VII.2.4. Conclusion

Le test biochimique des feuilles de cette espèce ont mis en évidence la présence des principes actifs du métabolisme secondaire qui appartient aux polyphénols.

Un meilleur rendement de 67,63 (mg EAG/ml d'extrait) de polyphénols totaux est obtenu par extrait éthanolique, ces polyphénols renferment probablement des flavonoïdes, des tanins et des alcaloïdes. Ces différents composés du métabolisme secondaire sont probablement responsables des différentes activités biologiques de la plante.

VII.3.Études de procédés de microencapsulation

VII.3.1.Optimisation de procédés de microencapsulation

VII.3.1.1.Préparation de microcapsules

Dans cette étude, nous avons choisi la microencapsulation par coacervation complexe. Il s'agit d'une désolvatation simultanée de deux polymères de type polyélectrolytes hydrosolubles de charge opposée (GL et GA) provoquée, suite à une modification du pH du milieu réactionnel et à l'attraction électrostatique induite des deux polymères. Une fois le coacervat formé et déposé autour du PA (mélange de molécules lipophiles et hydrophiles), la température est abaissée à 5°C afin d'obtenir une gélification de l'enrobage. La réticulation des microcapsules obtenues se fait par

ajout de formaldéhyde, ce qui permet de solidifier les particules.

VII.3.1.1.Observations macroscopiques

Après avoir ajusté le pH à 4, nous avons obtenu une séparation de phase ce qui veut dire que nous avons eu de coacervat. Au niveau des expériences 1, 3, 4, 5,6 et 8, les précipitations sont très remarquables cependant pour l'expérience 2 et 7 nous observons de turbidité.

La figure suivante montre les huit expériences après l'ajustement à pH =4.



Figure VII.11. Les expériences après l'ajustement de pH = 4.



Figure VII.12. Après la filtration, les microparticules (filtrats) sont dans les boîtes à pétrie et les substances filtrées sont dans les tubes à essaies.

Au cours de la fabrication, trois principales étapes ont été identifiées dans la formation des coacervats complexes. La première correspond à la formation de complexes solubles. La deuxième étape, il s'agit de la séparation de phase et la dernière étape consiste à la suppression des interactions, et disparition des complexes. La formation de précipités est devenue plus grosse et plus nombreuse lorsque la gélatine est en excès comme nous montre les expériences 1, 2, 5 et 6. La variation de ratio de chacun de ces constituants entraîne la modification de la phase

coacervée. Celle-ci devient moins concentrée, plus hétérogène et moins structurée à ratio faible. Nous avons remarqué à travers ces huit expériences la présence d'agrégats lors de la coacervation complexe de la gélatine et de la gomme d'acacia modifie la structure, la taille et les propriétés de surface des coacervats.

VII.3.1.1.2.Observations microscopiques

Après avoir ajouté l'agent de réticulation et l'ajustement de pH à 9, nous avons observé chaque expérience par microscope optique avec un grossissement de 25.

Les images suivantes montrent les différentes observations que nous avons effectuées.

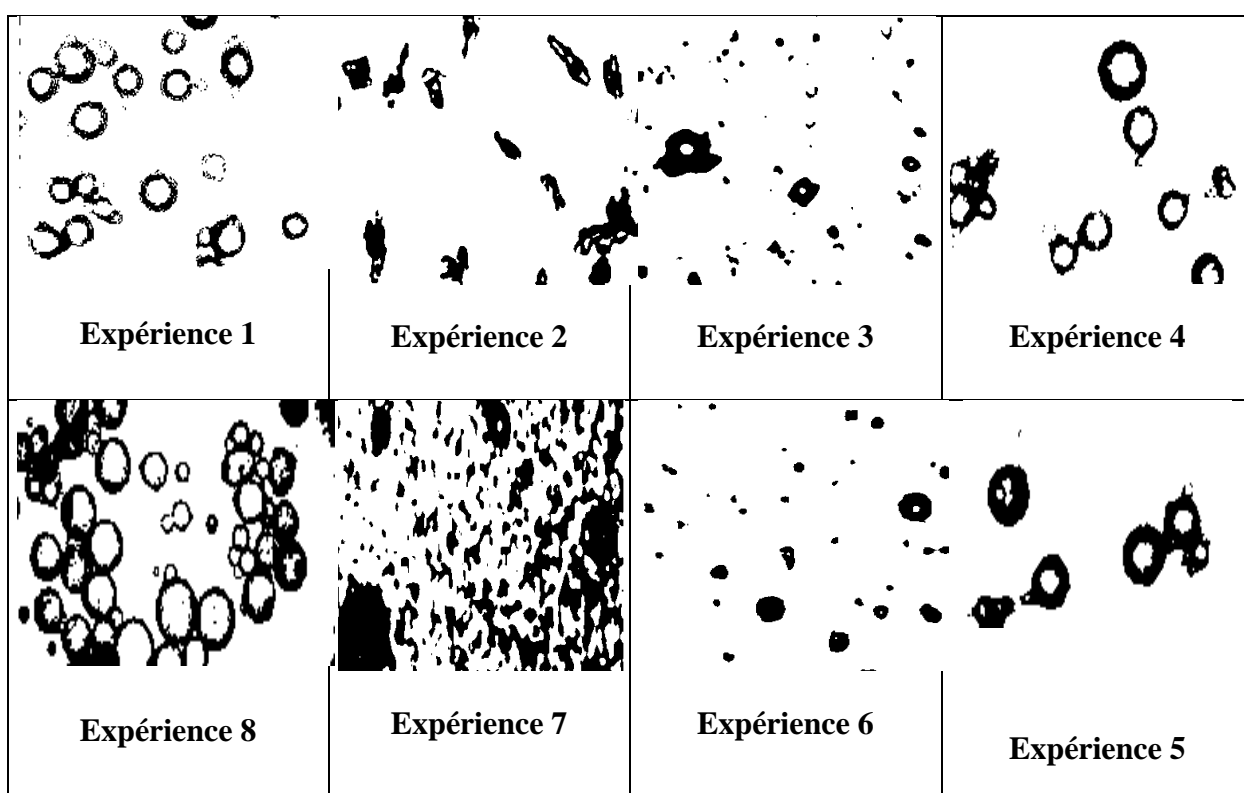


Figure VII.13. Photo d'observation obtenue par microscope optique des huit expériences faites.

A travers ces photos, les expériences 1 et 8 contiennent des microcapsules. Puis, les expériences 4 et 5 ont donné de moyennes capsules. Cependant, les expériences 3 et 6 montrent de capsules très faibles, pour le cas des expériences 2 et 7 nous avons obtenu que des agglomérats.

VII.3.1.1.3. Analyses granulométriques

Les expériences 2, 3, 6 et 7 ne sont pas très satisfaisantes pour faire l'analyse granulométrique. C'est pour cette raison que nous avons choisi seulement les expériences 1, 4, 5 et 8.

La taille des capsules a été déterminée à l'aide d'un logiciel Mesurim qui est capable de fournir une échelle photographique réalisée sous microscope.

Les résultats de la granulométrie sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau VII.6. Distribution granulométrique des microcapsules sélectionnées.

Expérience	Pourcentage de microcapsules par classe granulométrique	
	0-50 μ m	50-100 μ m
1	60,40	39,60
4	80,30	19,70
5	66,66	33,34
8	73,81	26,19

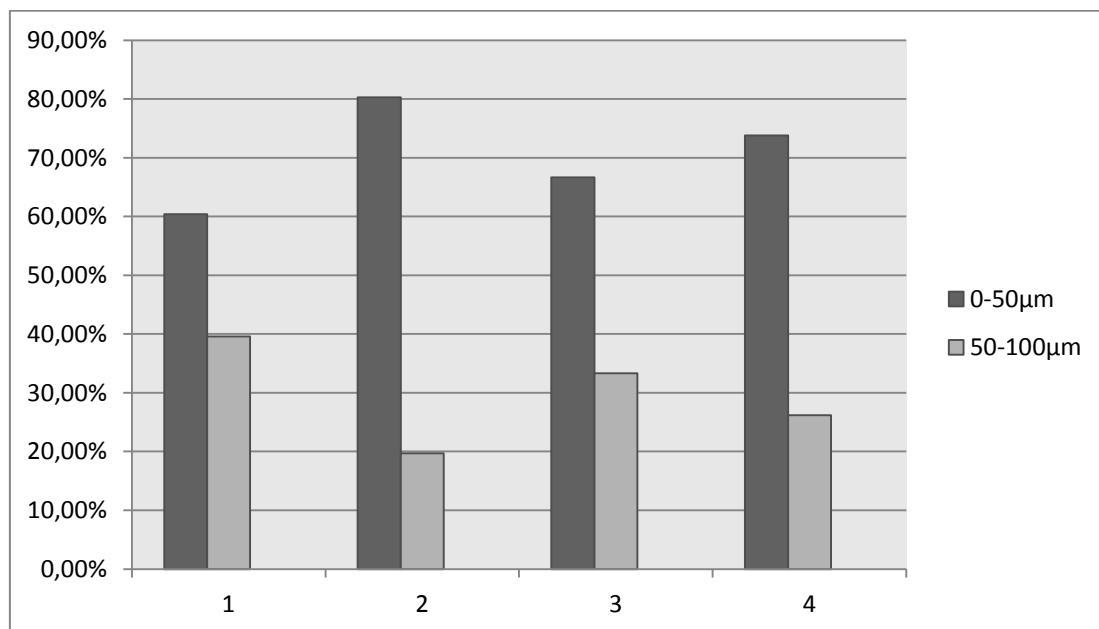


Figure VII.14. Histogramme illustrant le pourcentage de microcapsules par classe granulométrique.

Les résultats d'analyses montrent que la classe granulométrique des capsules se répartit en deux, la première classe qui est la majorité se trouve entre 0 à 50 µm et la deuxième classe se situe entre 50 à 100µm.

Les résultats de l'optimisation des procédés de microencapsulation sont représentés dans le tableau VII.7.

Éssais	le ratio noyau : paroi	Ratio gélatine/ gomme acacia	Agent de durcissement (ml)	Le rendement de la coacervation (%)	L'efficacité d'encapsulation (%)
1	-1	+1	-1	36,40	37,29
2	+1	-1	+1	40,81	9,29
3	-1	-1	-1	21,63	24,33
4	+1	+1	+1	18,47	15,71
5	+1	+1	+1	34,00	18,32
6	-1	-1	-1	35,51	37,01
7	+1	-1	+1	40,19	4,13
8	-1	+1	-1	51,38	51,43

Tableau vii.6.Les niveaux haut et bas des facteurs

Facteurs :	le ratio noyau : paroi	Ratio gélatine/ gomme acacia	Agent de durcissement (ml)
niveau haut = 1	1/3	5/2	2
niveau bas = -1	1/4	5/3	1

VII.3.1.2. La reproductibilité et la répétabilité du procédé de microencapsulation

L'histogramme suivant montre la reproductibilité et la répétabilité de procédés que nous avons utilisés.

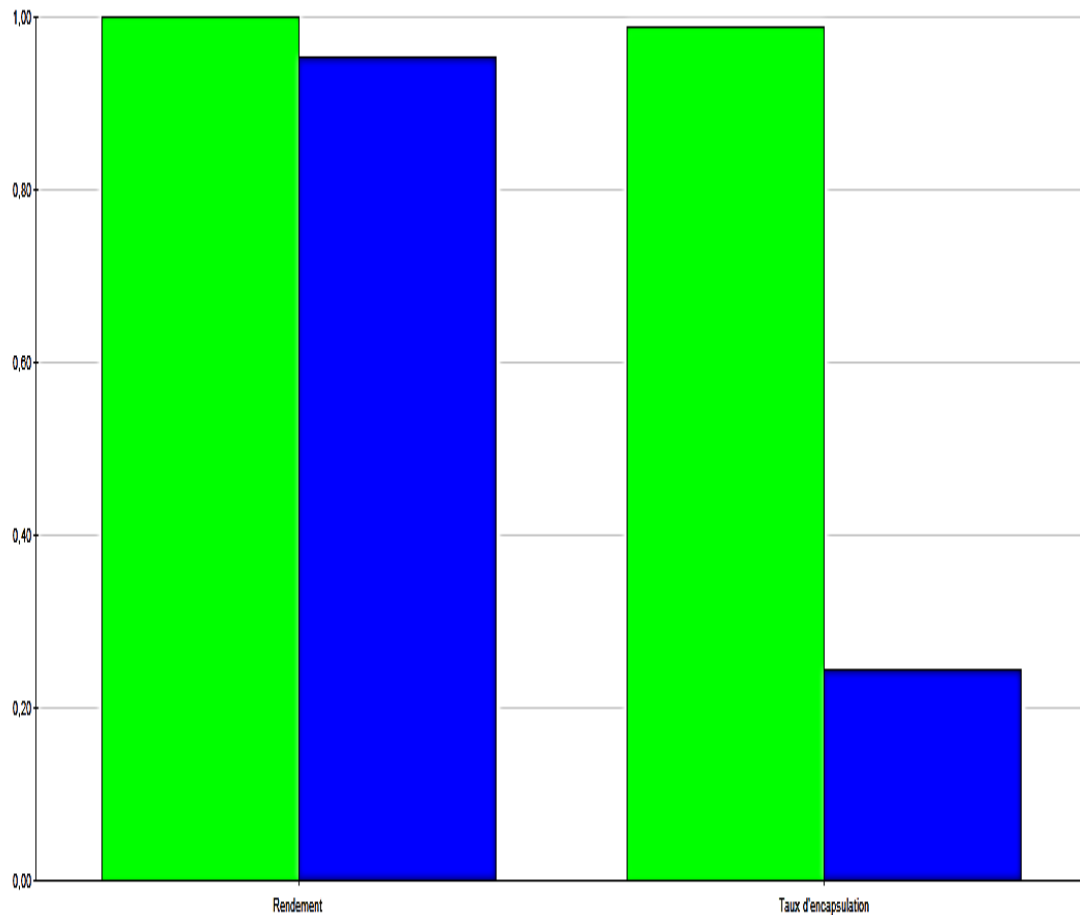


Figure VII-15. Représentation des valeurs de R^2 et Q^2 pour les plans d'expériences.

Au vu de ces résultats, nous pouvons déduire que les modèles choisis expliquent en grande partie les variations observées. La qualité de prédiction du modèle et celle de rendement est bonne, les valeurs de Q^2 et R^2 sont positives.

VII.3.1.3. Effet des différents facteurs sur les réponses étudiées

Dans le but de mieux voir les facteurs les plus influents dans la formation de microcapsules, nous allons étudier ces coefficients de modèle pour chacune des réponses.

Le graphe suivant représente les coefficients du modèle pour le rendement.

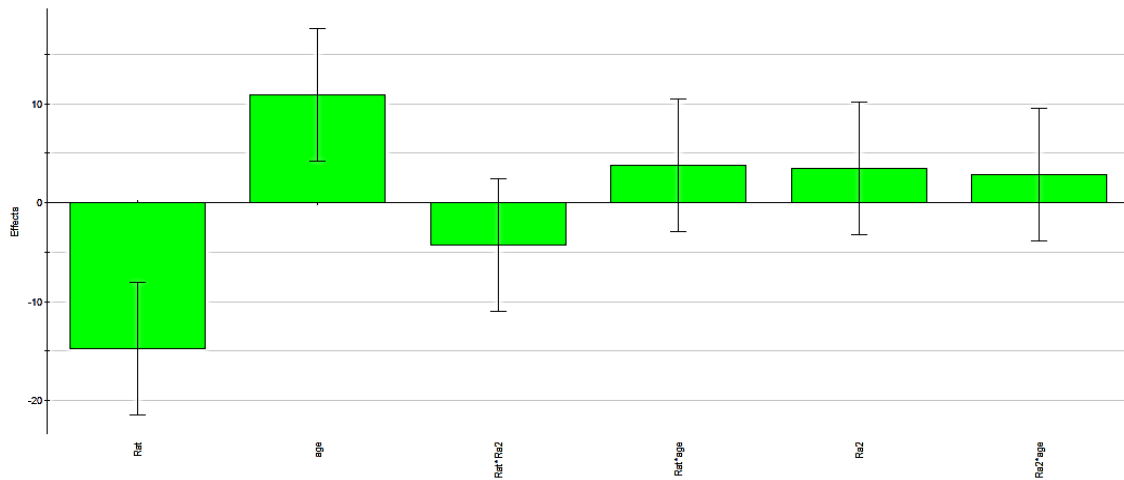


Figure VII.16. Coefficients du modèle pour le rendement

Nous observons une influence négative du ratio Noyau : Paroi et une influence positive de ratio G : GA sur le rendement cependant, l'agent de durcissement influe positivement. L'interaction entre le ratio G : GA et Noyau : paroi est négative, pour l'agent de durcissement et celle de ratio noyau : paroi l'influence est assez appréciable. Par ailleurs, l'interaction de ratio G : GA avec l'agent de durcissement est aussi positive.

Le graphe suivant représente les coefficients du modèle pour le taux d'encapsulation.

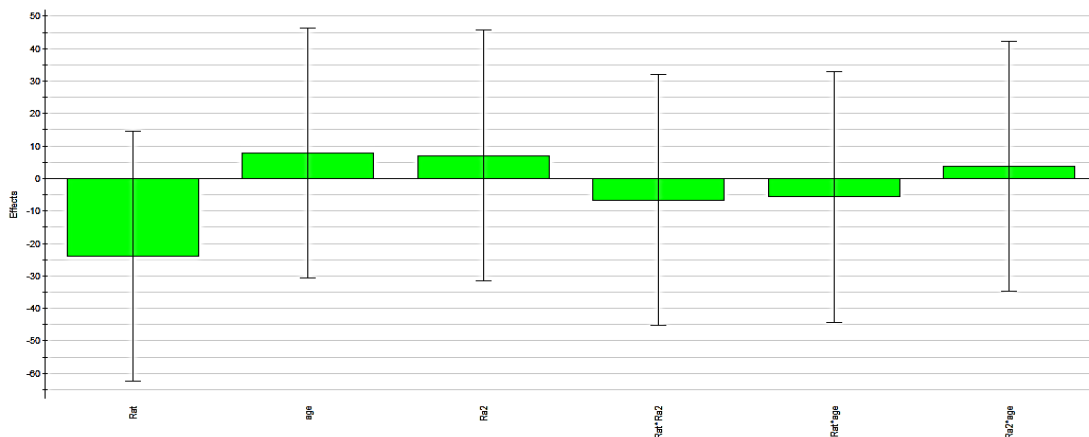


Figure VII.17. Coefficients du modèle pour le taux d'encapsulation.

Nous observons une influence négative de ratio Noyau : paroi et une influence positive de l'agent de durcissement et celle de ratio G : GA. L'interaction de ratio noyau : paroi et ratio G : GA est négative tout comme l'interaction de ratio G : GA et l'agent de durcissement. Par ailleurs, l'influence de l'interaction de ratio Noyau : paroi et l'agent de durcissement est très faible.

Donc pour avoir plus des microcapsules, nous devons augmenter le ratio G : GA et l'agent de durcissement.

VII.3.1.3.1.Éffets sur le rendement

VII.3.1.3.1.1.Éffet de ratio noyau : paroi et de ratio G : GA en fixant agent de durcissement sur les réponses étudiées

La figure ci-après montre le contour de prédiction du rendement en fonction du ratio noyau : paroi et de ratio G : GA.

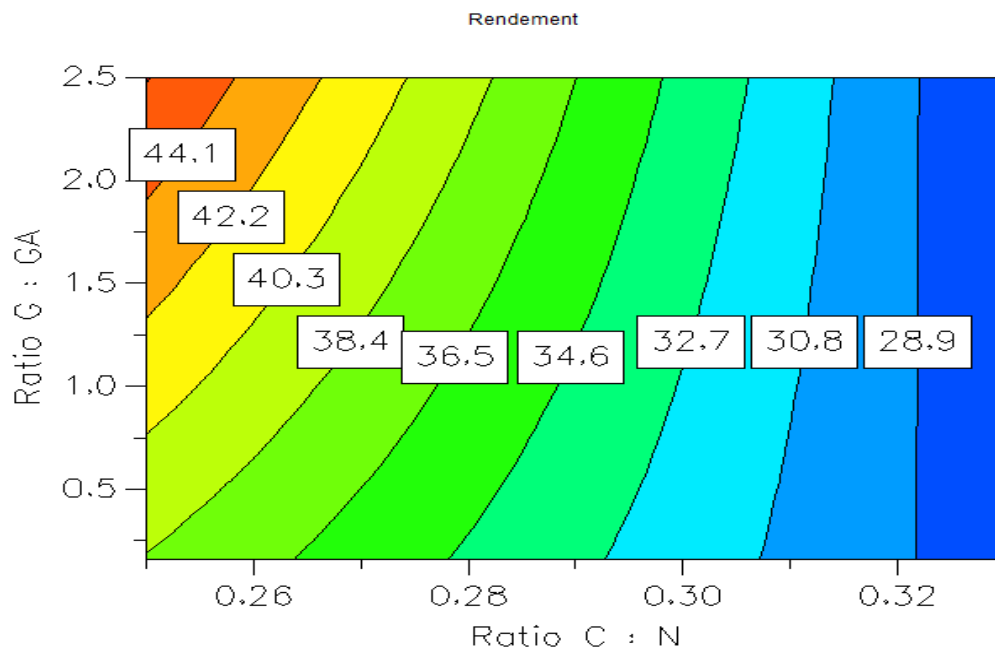


Figure VII.18. Courbes d'iso réponses obtenues, montrant l'effet de ratio noyau : paroi et G : GA sur le rendement.

Nous remarquons ici que à faible ratio noyau : paroi et à ratio élevé de G : GA, il y a une forte augmentation de du rendement qui peut aller jusqu'à 37,39 %. Ceci veut dire que l'augmentation du ratio noyau : paroi entraîne une diminution du rendement. Par contre le ratio G : GA, agit positivement.

Tout cela montre que, à faible ratio noyau : paroi et à ratio élevé de G : GA nous avons un très bon rendement comme expliqué précédemment.

VII.3.1.3.1.2. Effet de ratio G : GA et l'agent de durcissement en fixant le ratio noyau : paroi sur les réponses étudiées

La figure ci-après montre le contour de prédiction du rendement en fonction de ratio G : GA et de l'agent de durcissement.

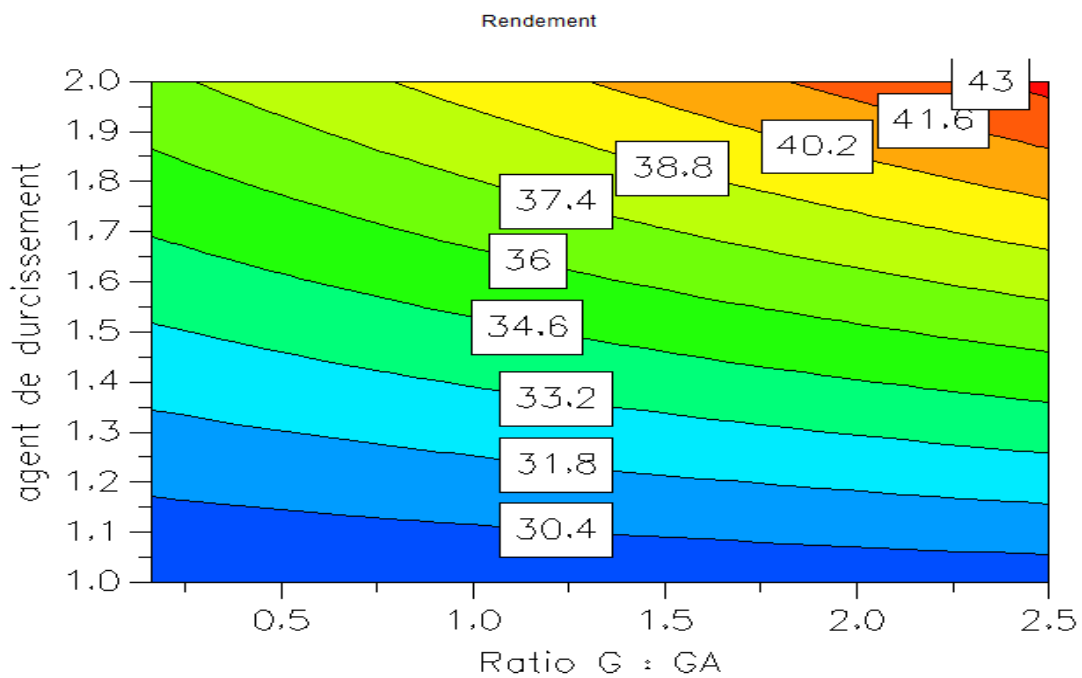


Figure VII.19. Courbes d'iso réponses obtenues montrant l'effet de ratio G : GA et l'agent de durcissement sur le rendement.

Nous remarquons une augmentation de rendement avec ratio G : GA et Agent de durcissement.

L'augmentation du rendement par le ratio G : GA peut expliquer par excès de gélatine

qui se traduit par la présence de charges non-neutralisées ce qui entraîne la formation de plus de complexe soluble que le coacervat. Et en plus l'agent de durcissement fixe les capsules pour éviter la répartition des liaisons fixées.

VI.3.1.3.1.3. Effet de l'agent réticulant et de ratio Noyau : paroi en fixant le ratio G : GA sur les réponses étudiées

La figure ci-après montre le contour de prédiction du rendement en fonction du ratio noyau : paroi et de l'agent de réticulation.

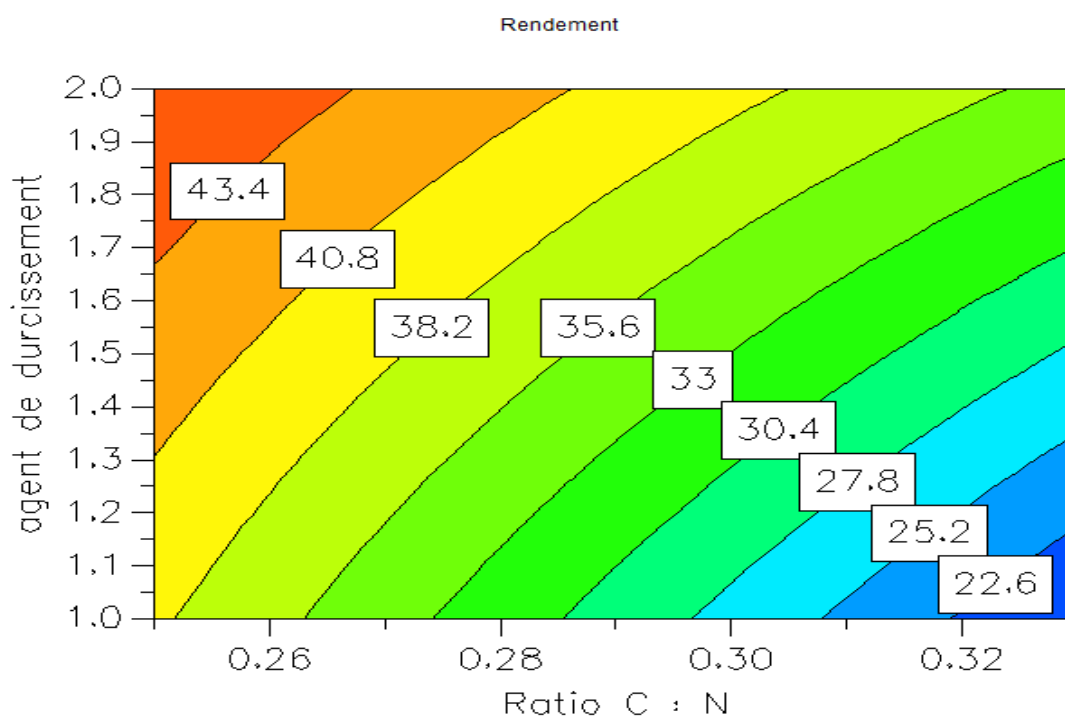


Figure VII.20. Courbes d'iso réponses obtenues montrant l'effet de l'agent de durcissement et de ratio noyau : paroi sur le rendement.

Nous avons remarqué ici l'augmentation du rendement de 43,4 % ce rendement correspond à une augmentation de l'agent de durcissement et une diminution du ratio noyau : paroi.

Ceci peut s'expliquer par le fait que la condition optimale correspond à faible ratio Noyau : paroi et l'agent de durcissement.

VI.3.1.3.2.Éffets sur le taux d'encapsulation

VI.3.1.3.2.1.Éffet de ratio noyau : paroi et de ration G : GA en fixant agent de durcissement sur les réponses étudiées

La figure ci-après montre le contour de prédiction du taux d'encapsulation en fonction du ratio noyau : paroi et de ratio G : GA.

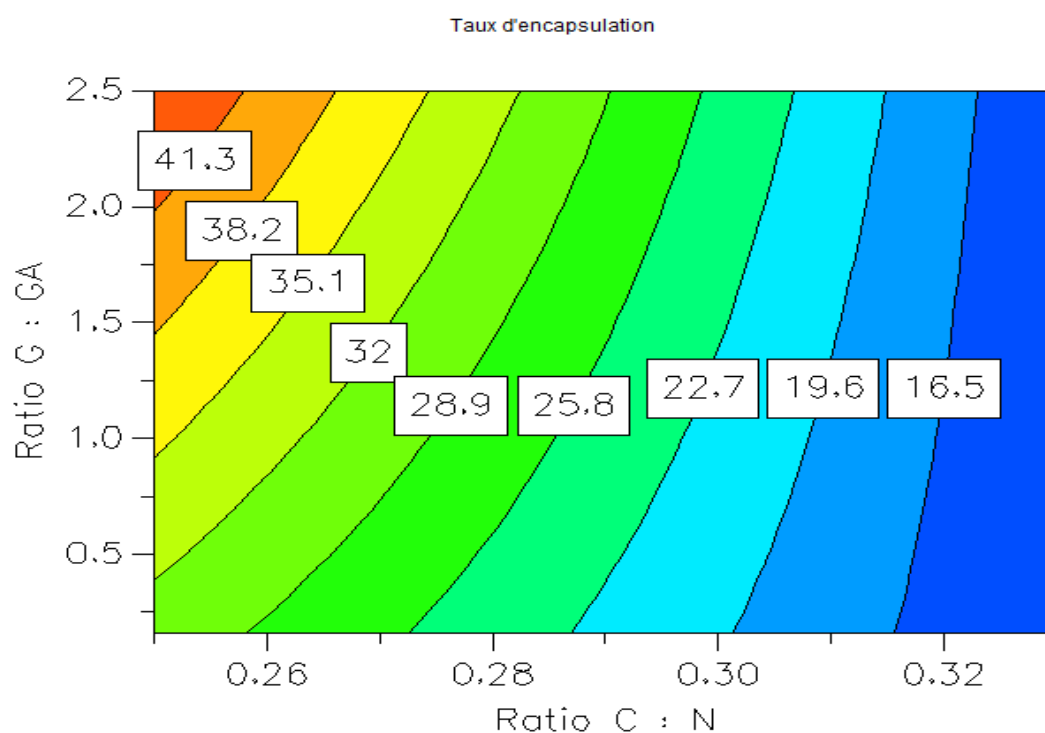


Figure VII.21. Courbes d'iso réponses obtenues montrant les effets de ratio noyau : paroi et ratio G : GA sur le taux d'encapsulation.

Dans ce cas, nous avons remarqué une influence positive du ratio G : GA sur le taux d'encapsulation par contre, ce dernier diminue plus nous augmentons le ratio G : GA.

Ceci peut être expliqué par l'augmentation de polyélectrolytes dans la solution qui entraîne le faible taux d'encapsulation.

VI.3.1.3.2.2. Effet de ratio G : GA et l'agent de durcissement en fixant le ratio noyau : paroi sur les réponses étudiées.

La figure ci-après montre le contour de prédiction du taux d'encapsulation en fonction du ratio G : GA et de l'agent de durcissement.

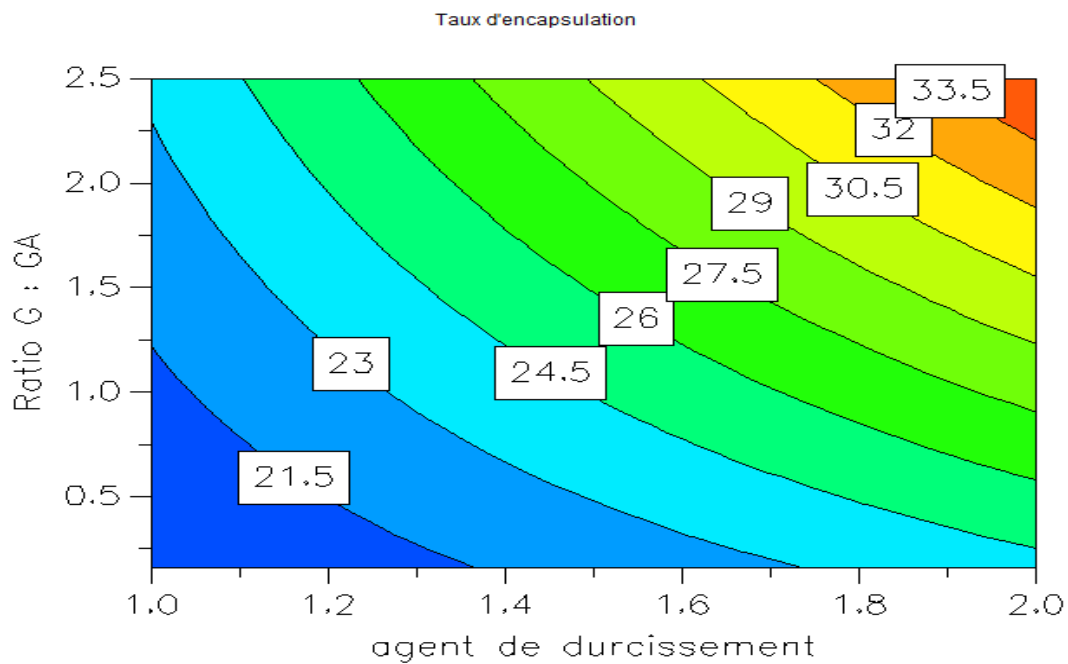


Figure VII.22. Courbes d'iso réponses obtenues montrant l'effet de ratio G :GA et l'agent de durcissement sur le taux d'encapsulation.

Nous remarquons une augmentation du taux d'encapsulation en augmentant l'agent de durcissement et de ratio G : GA. L'augmentation du taux d'encapsulation lorsque l'agent de durcissement augmente peut s'expliquer par l'excès de de la matière utilisée.

Le taux d'encapsulation est important d'autant plus que si le ratio G : GA augmente. Tout comme le ratio G : GA, l'ajout de l'agent de durcissement augmente le taux d'encapsulation car l'agent de durcissement déposé sur la surface des extraits permettrait ainsi à la gélatine chargée positivement de coacerver plus facilement.

A la fin du procédé d'encapsulation, les microcapsules formées sont peu résistantes en raison de la nature ionique des interactions entre les polymères. Elles sont donc généralement réticulées d'où l'intérêt de l'ajout de cet agent de durcissement.

VI.3.1.3.2.3. Effet de l'agent réticulant et de ratio noyau : paroi en fixant le ratio G : GA sur les réponses étudiées.

La figure ci-après montre le contour de prédiction du taux d'encapsulation en fonction du ratio noyau : paroi et de l'agent de durcissement.

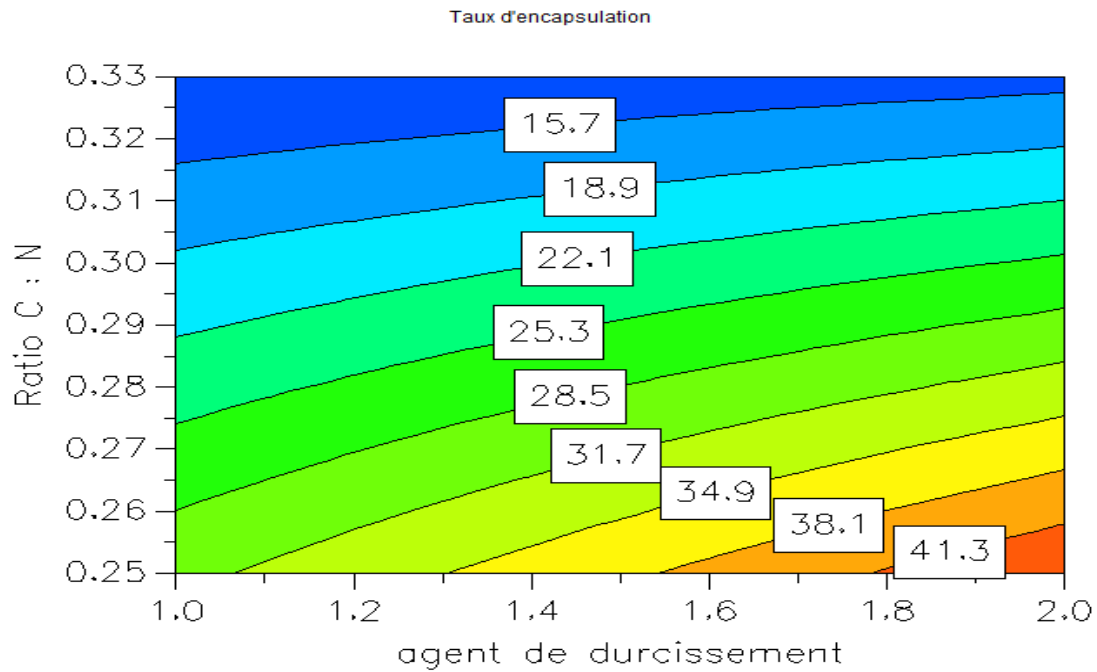


Figure VII.23. Courbes d'iso réponses obtenues montrant l'effet de l'agent de durcissement et de ratio noyau : paroi.

Nous remarquons ici une grande influence de l'agent de durcissement sur le taux d'encapsulation. L'augmentation de ratio Noyau : paroi n'a pas d'influence sur le taux d'encapsulation car plus la solution contient des extraits, le pouvoir ionique augmente ce qui risque d'augmenter des complexes solubles dans le coacervat.

VI.3.1.5. Modélisation mathématique de l'optimisation de procédé de microencapsulation des extraits de *Marrubium Vulgare L.*

En analysant par ANOVA, nous avons obtenu pour chacune des réponses étudiées les modèles mathématiques suivants respectivement pour le rendement et le taux d'encapsulation:

$$Y_1 = 34,7987 + 1,74375 X_1 - 1,88125 X_2 + 5,47125 X_3 + 0,263752 X_1 X_2 + 1,43125 X_1 X_3 + 7,39625 X_2 X_3$$

$$Y_2 = 24,6887 + 3,67125 X_1 - 0,788751 X_2 + 3,03375 X_3 + 5,99875 X_1 X_2 + 12,8263 X_1 X_3 + 0,846249 X_2 X_3$$

Où,

X₁ : le facteur ratio Noyau : paroi;

X₂ : le facteur ratio G : GA;

X₃ : l'agent de durcissement.

VI.3.1.7. Discussions

Le ratio Gélatine : Gomme Arabique (G:GA) est un facteur influençant la charge nette et les propriétés des complexes obtenus. Il en résulte une influence sur la solubilité des complexes. En effet, à un pH= 4, le ratio massique G:GA va conditionner la neutralisation des charges entre les deux macromolécules. Si la neutralisation des complexes se produit à un ratio G:GA de 5/2, toute augmentation ou diminution de ce ratio entraînera un gain de solubilité des complexes et par conséquent une diminution des complexes ce propos a été étudié par Kaibara *et al*, 2000 dans le cas de protéine- polysaccharide. Une augmentation subséquente du ratio par ajout de gélatine a entraîné une diminution de nombre de capsules. Ceci confirme une solubilisation des complexes formés par l'excès de gélatine. Dans une autre étude, il a été démontré que la taille des complexes pouvait être contrôlée en faisant varier le ratio de G: GA (Laneuville *et al*, 2000).

L'augmentation de ratio matière active/ matériaux enrobant entraîne une diminution du taux d'encapsulation. Il a été montré que l'augmentation du ratio matière active enrobant affecte la morphologie des microcapsules, augmente leur taille et leur charge. L'augmentation de la charge des microcapsules entraîne une diminution de l'épaisseur de la membrane.

Le ratio noyau paroi est aussi un paramètre non moins important dans la formation de complexes par coacervation. Nous avons vu dans cette étude qu'à un ratio supérieur à 1/4 l'apparition de complexes est supprimée au profit d'une séparation de phases ségrégative. Cependant, en diluant le système déjà concentré en polymères totaux, la formation de complexes devient possible à nouveau.

L'agent réticulant doit être en excès pour la préparation des capsules, car celui-ci est très sensible à l'eau. Cependant, si on estime, d'après nos résultats que seulement 1ml

de l'agent réticulant initialement en solution organique contribue à la formation des microcapsules. Mais l'agent de durcissement de 2ml favorise cette fonction davantage.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES - PERSPECTIVES

L'objectif de ce mémoire était de mettre en œuvre des méthodologies optimales en matière d'extraction, d'identification de produits naturels d'origine végétale, en utilisant le *Marrubium Vulgare L.* comme plante modèle et ensuite de les encapsuler afin d'avoir meilleure forme galénique qui permet de stabiliser des molécules bioactives.

La première partie de notre travail a donc consisté à mettre en œuvre une méthodologie d'extraction par Soxhlet. Nous avons pour cela cherché les conditions optimales d'extraction pour avoir le meilleur rendement possible qui est 34,15% pour une puissance de chauffage de 200W et une durée d'extraction de 140min. L'originalité de la méthode repose sur le fait de trouver la meilleure durée et la puissance d'extraction pour extraire la majorité des molécules bioactives de la matrice végétale. Nous avons pu démontrer que le *Marrubium vulgare L.* obtenu, contient de polyphénols.

De plus, il serait intéressant d'étendre cette méthodologie à différentes matrices végétales et différentes familles moléculaires pour les applications laboratoires; ainsi que la transposition à l'échelle industrielle de ces procédés.

Cette étude a permis de réaliser une étude phytochimique des parties aériennes de *Marrubium Vulgare L.* et notamment ceux qui sont très peu décrits dans la littérature.. Ces composés seront ensuite testés sur les souris afin d'évaluer leur activité anti-inflammatoire. Ces résultats encourageant nous incite à continuer l'investigation phytochimique des parties aériennes de *Marrubium Vulgare L.* (feuilles, tiges) qui ont été très peu étudiée jusqu'à présent.

Dans la deuxième partie de ce mémoire, nous avons montré la possibilité d'encapsuler ces extraits de notre plantes en utilisant la gélatine et la gomme arabique comme paroi. De même pour le procédé d'encapsulation, de nombreuses études de cas ont été réalisées mais les mécanismes conduisant à la formation des microcapsules ne restent

décrits que de manière partielle.

Par conséquent, notre travail repose sur :

-l'encapsulation de l'extrait de *Marrubium Vulgare L.* en utilisant les protéines de la gélatine et la gomme arabique comme polymères d'encapsulation.

-de mieux comprendre les mécanismes de formation des microcapsules par coacervation notamment l'influence de ces constituants majeurs.

Lors de notre étude, nous avons obtenu de microcapsules des extraits de polyphénols lipophiles de *Marrubium Vulgare L.* Il serait mieux si nous cherchons un moyen d'encapsuler à la fois les polyphénols lipophiles et hydrophiles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1-Fernandez M. (2003) Étude de quelques plantes dites médicinales et de leurs fonctions (2003), Ed. Aenigma, p.09.

2-Hans W. K. (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. p6-7.

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

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

5-Strang C. (2006). La rousse médicale. Ed Larousse.

6-Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. (2001). Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.

7-Gaussen, H., Deuroy, J.F. and Ozenda P. (1982) Précis de botanique II « Les végétaux supérieurs ». Ed : Masson;pp215-408).

8-Henchiri C., Boudjelal A., Siracusa L., Sari M. and Ruberto G. (2012). Compositional analysis and in vivo antidiabetic Activity of Wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia* **83**: 286–292.

9-Ozenda P., (2004). Flore et végétation des sahara. 3ème Ed : CNRS édition. Paris. pp.399-402.

10-Bonnier G., (1909), La Végétation de la France, Flore Complète. Tome 09. Ed : Suisse et Belgique. Paris. pp. 25-26.

11-Roman R.R., Alarcon-Aguilar F., et al., (1992). Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Archives of Medical Research.* 23(1): 59-64.

12-Novaes A. P., Poffo C., Pretti Jr. E., Oliveira A.E., Schlemper V., Niero R., Cechinel-Filho V., Burger C. (2001) : Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants; *Therapie* 56;; 427-430.

13-Herrera A.A., Aguilar S.L., et al., (2004). Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine*. 11(8): 561-6.

14-Novak, L. ; Buzas, G. ;Minker, E. ;Kolfai, M. et Szendrei, K., Plantes medicinales et leurs vertus. (1966), 14, p: 57.

15-Hill, R.S., Making,H.L.Jm Kirk,D.N.M:urphy,G.M.(1991) Dictionary of steroids-chemical data-structures and bibliographies, London,Chapman&Hall.

16-Courtios,J.E., Perlés, R. (1971) Précis de chimie biologique, 2 éme edition, Masson et Cie, Paris, 424- 437.

17-Boulanger, P., Polonovski, J., Tayeau, F., Mandl,P., Biserte,G. (1966) Biochimie médicinale-les constituants des organismes vivants, Masson et Cie, Paris 100.

18-C. Meyre-Silva, R.A. Yunes, V. Schlemper, F.Campos-Buzzi, V. Cechinel-Filho (2005) Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). *Il Farmaco* 60, **321-326**.

19-LEYBROS J., FREMEAUX P. Extraction solide-liquide - Aspects théoriques. *Techniques de l'Ingénieur (traité Génie des procédés)*, J 2780.

20-LUQUE DE CASTRO M.D. et FRIEGO-CAPOTE F., 2007 : Ultrasound assistance to liquidliquid extraction : A debatable analytical tool. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 583, pp: 2 – 9.

21-Chemat F., Huma Z.E., Khan M.K. (2011) Applications of Ultrasound in Food Technology: Processing, Preservation and Extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813-835.

22-Zeggwagh N-A., M-L. Ouahidi, A. Lemhadri et M. Eddouks. Analyses physico-chimiques des composés organiques des plantes *J.Ethno*. Vol.108.223-227, **2006**.

23 -McLafferty F.W., Michnowicz J.A., *Chemtech*, 19, 182-189, **1992**.

24-Rosset R., Caude M., Jardy A., (1991) Chromatographie en phase liquide et super critique, Lavoisier.

25-Seidel-Morgenstern, A. (2005). "Preparative Gradient Chromatography." *Chemical Engineering & Technology*, 28(11), 1265-1273.

- 26-WONGKITTIPONG R., PRAT L., DAMRONGLERD S., GOURDON C. (2004)** Solid-liquid extraction of andrographolide from plants experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 4, pp 147-154.
- 27-WILSON, R.G., BOWIE, J.H. et WILLIAMS, D.H. Analyse des constituants de la plante dans la méditerranée (1986).** *Tetrahedron*, 24, 1407.
- 28- Gibbs, S. Kermasha, I. Alli et C.N. Mulligan. (1999)** Encapsulation in the food industry: a review, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50: 213-224.
- 29-Brazel (199).** Microencapsulation: offering solutions for the food industry. *Cereal Food World*, 44: 388-393.
- 30-Poncelet (2006).** Microencapsulation: Fundamentals, methods and application, 23-34. J.P. Blitz and V.M. Gun'Ko (eds).
- 31-Benoit J.P., P. Couvreur, J.P. Devissaguet, H. Fessi, F, Puissieux et L., Roblot-Treupel. (1986)** « carrier» or « modulated distribution» forms, news systems for drug administration. *Journal de pharmacie de Belgique* , 41 (5) : 319-29.
- 32- Andrieux, D. Desmaele, J. D'Angelo et P. Couvreur.(2003)** Nanotechnologies et new drugs. *Actualité Chimique*, 135-139.
- 33- J. Richard et J.P. Benoît.(200)** Microencapsulation. *Technique de l'Ingénieur*. J2 210.
- 34- K-Y. Lin. D-M. Wang et J-Y. Lai.(2002)** Nonsolvent-induced gelation and its effet on membrane morphology. *Macromolecules*, 35; 6697.
- 35-J.Y. Kim, Y.D. Kim, Toshiyuki, H.K. Lee. K.J. Baik et S.C. Kim.(1999)** Vittrification phenomena in polysulfone/ Water system. *Journal of Applied Polymer Science*, 71:431-438.
- 36- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M., (1999).** *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.* *Methods in Enzymology*. Orlando Academic Press: 152-178.
- 37- Luzzi LA, Gerraughty R. J.(1967)** Effects of selected variables on the microencapsulation of solids. *J Pharm Sci* ;56(5):634—8.
- 38- Madan PL, Madan DK, Price JC (1976) .** Clofibrate microcapsules: preparation and release rate studies. *J Pharm Sci*;65:1476—9.

39-Quezel, P.; Santa, S. (1963) Nouvelle flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Editions du Centre National de la recherche scientifique*. Tome II .

40-Albano S. M., Miguel M.G.(2011). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*. 33: 1-6.

41-Bellakhdar J. (1997). Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires La pharmacopée marocaine traditionnelle. IBS Press. pp. 340-341.

ANNEXE

ANNEXE 1 : OPTIMISATION DES PARAMETRES D'EXTRACTION DES MOLÉCULES BIOACTIVES

Le graphe 1.1. Suivant représente influence de temps et de puissance sur le rendement.

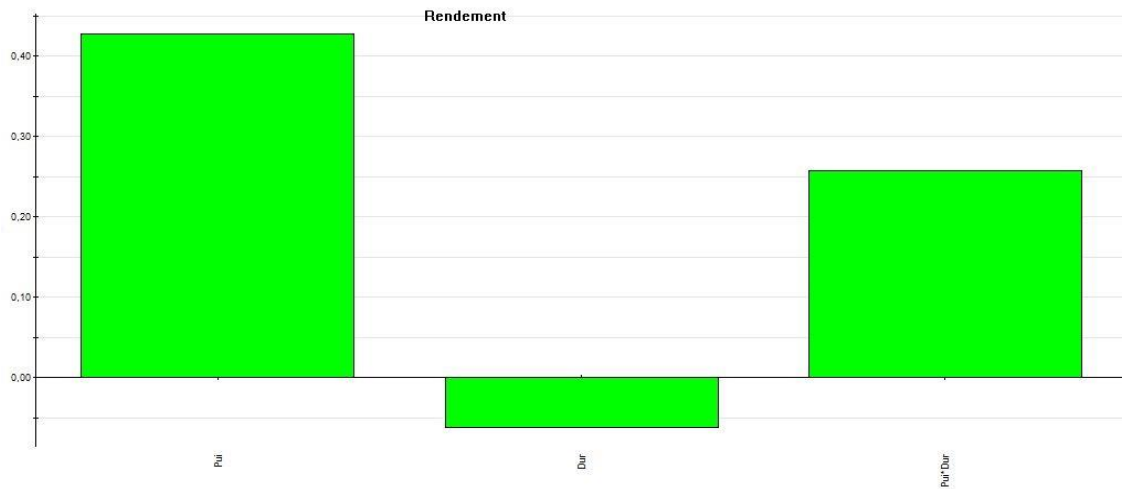


Figure 1.1. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur le rendement.

Le graphe 1.2. Représente influence de temps et de puissance sur l'énergie d'extraction.

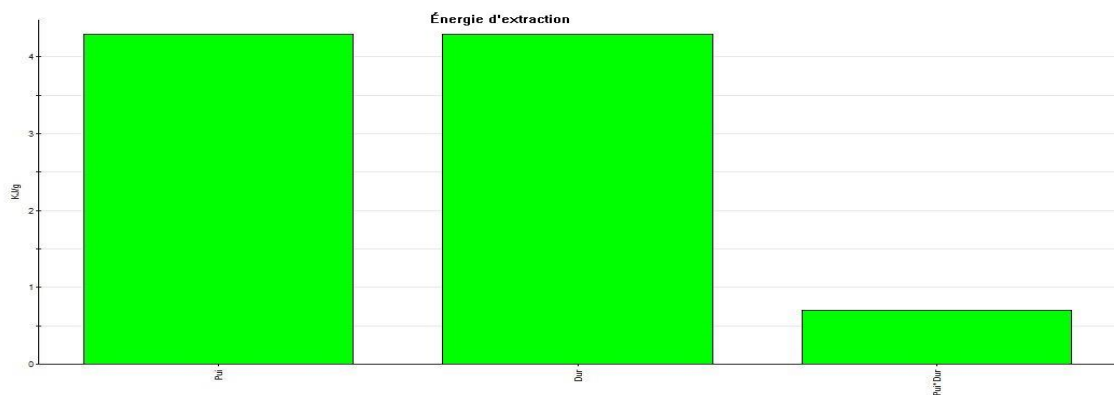


Figure 1.2. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur l'énergie d'extraction.

Le graphe 1.3. Représente influence de temps et de puissance sur le dosage de polyphénol

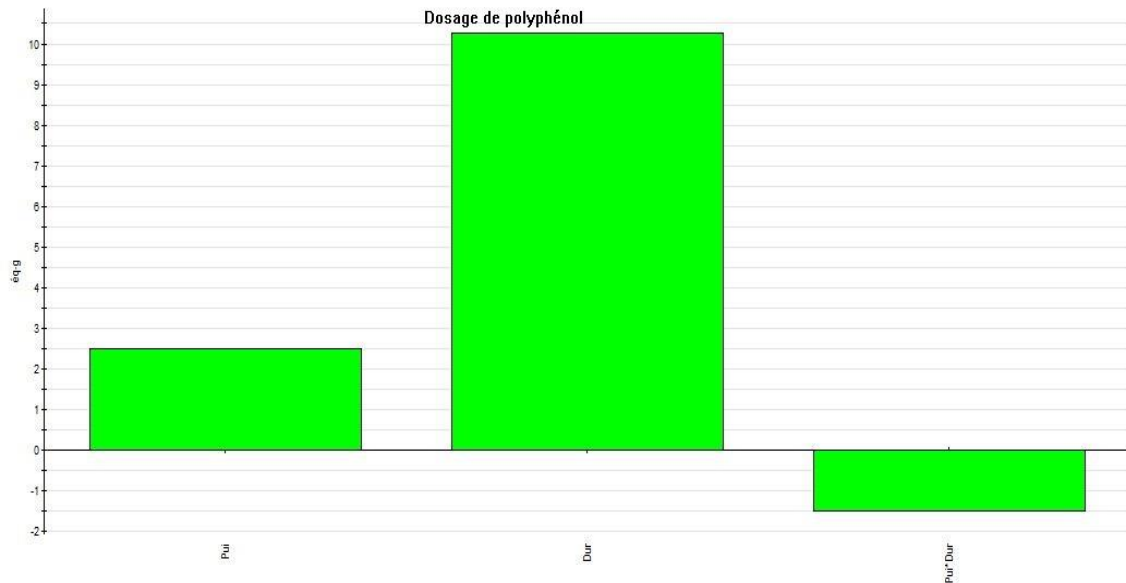


Figure 1.3. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur l'énergie d'extraction.

Le graphe suivant montre le contour de l'influence de paramètre sur le rendement.

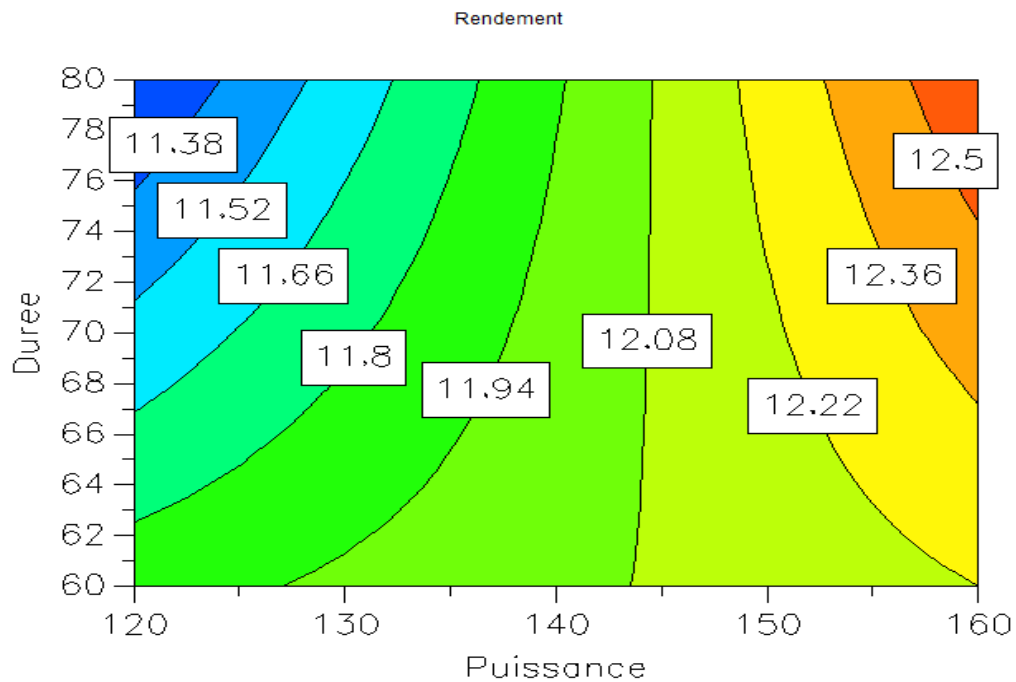


Figure 1.4. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du rendement en fonction de la puissance et la durée d'extraction.

La figure suivante montre un contour de réponse sous l'influence de puissance et de durée d'extraction.

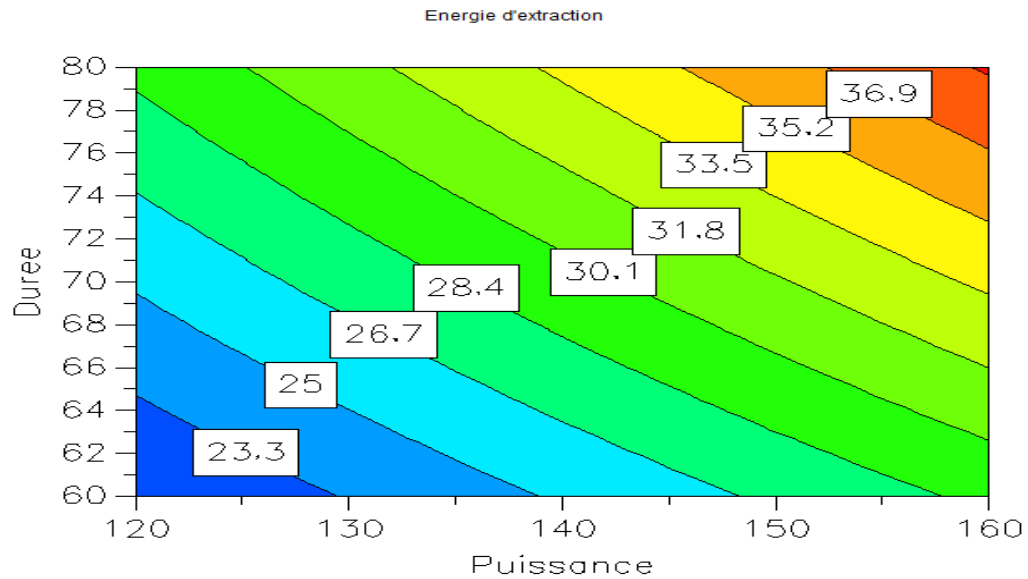


Figure 1.5. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant l'énergie d'extraction en fonction de la durée et de la puissance d'extraction.

Le graphe suivant montre les effets de puissance et de durée d'extraction sur le dosage de polyphénols.

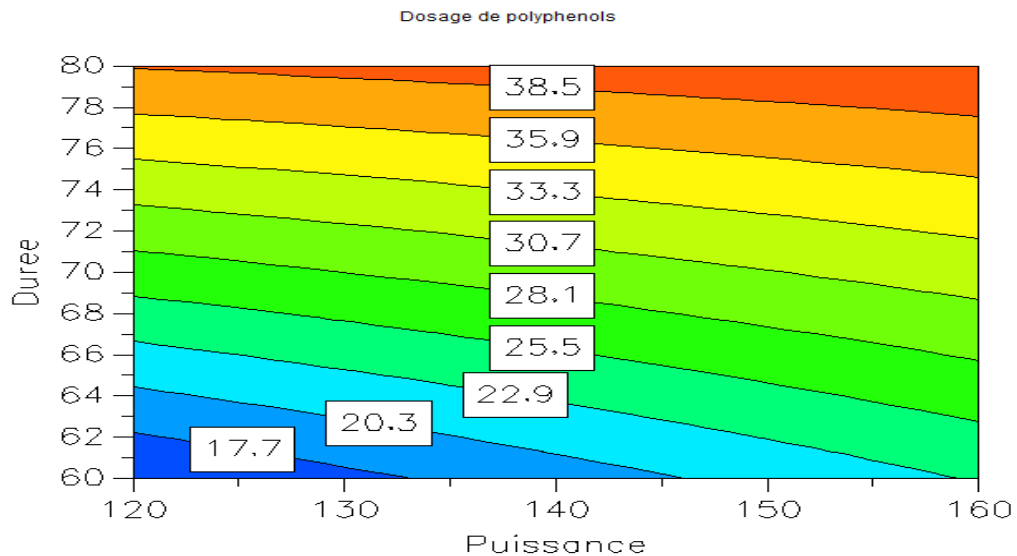


Figure 1.6. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du dosage de polyphénols en fonction de la puissance et la durée d'extraction.

Le graphe 1.7. Suivant représente influence de temps et de puissance sur le rendement.

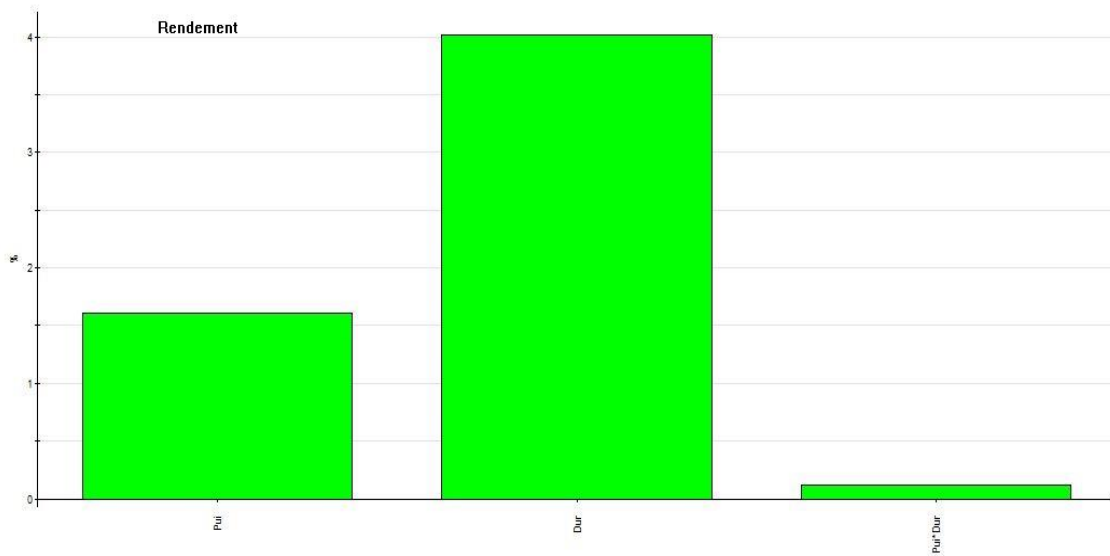


Figure 1.7. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur le rendement.

Le graphe 1.8. Représente influence de temps et de puissance sur l'énergie d'extraction.

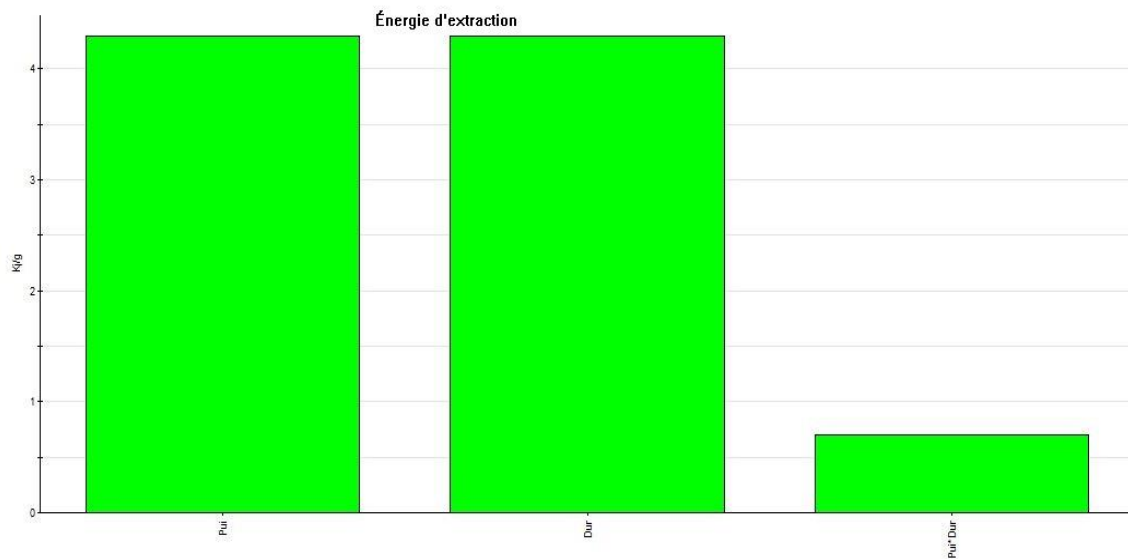


Figure 1.8. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur l'énergie d'extraction.

Le graphe 1.9. Représente influence de temps et de puissance sur le dosage de polyphénol

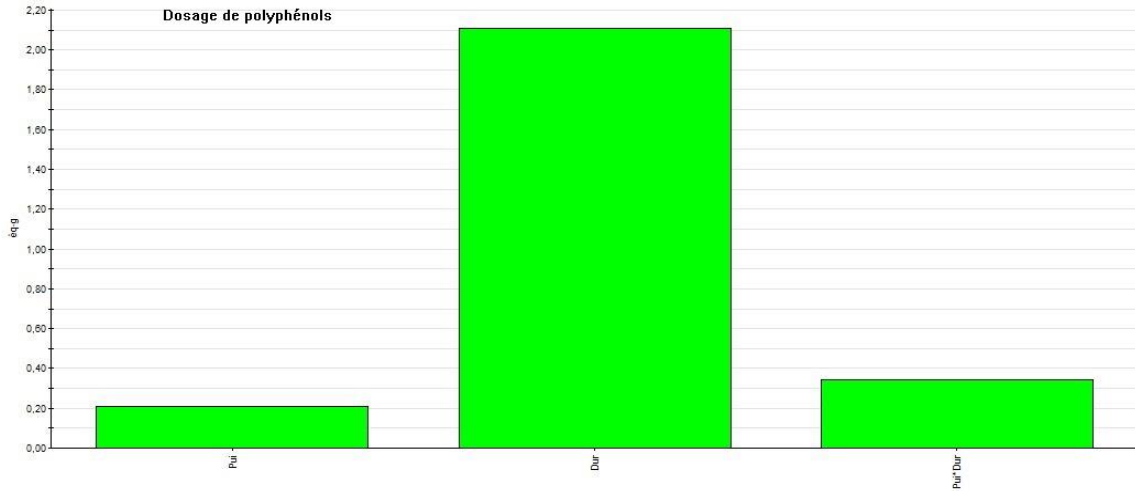


Figure 1.9. Influence de la durée et de la puissance d'extraction sur l'énergie d'extraction.

Le graphe suivant montre les effets de puissance et de durée d'extraction sur le rendement

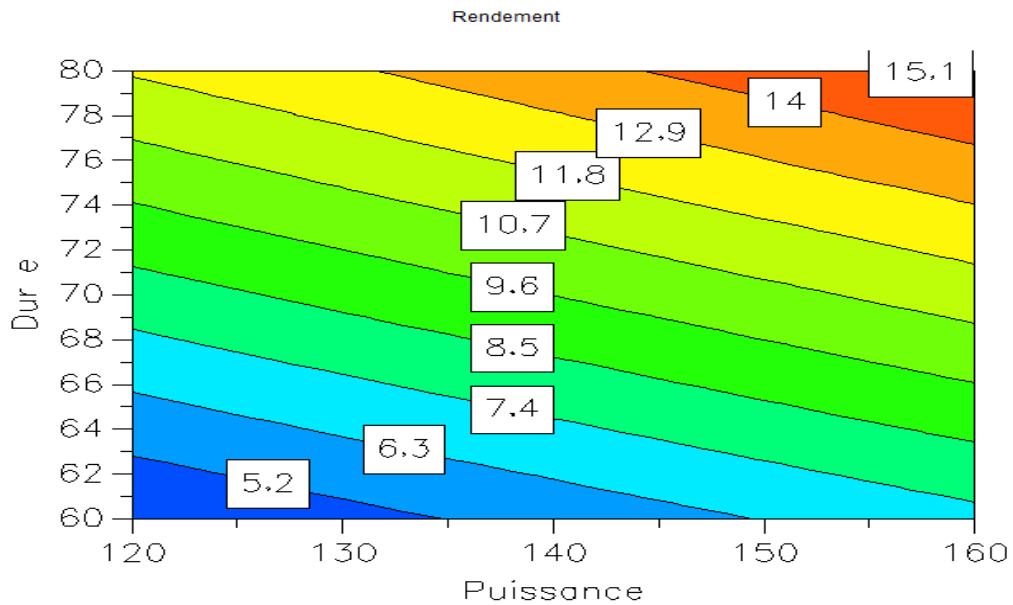


Figure.1.10. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant l'évolution du rendement en fonction de puissance la durée d'extraction.

Le graphe suivant montre les effets de puissance et de durée d'extraction sur l'énergie d'extraction.

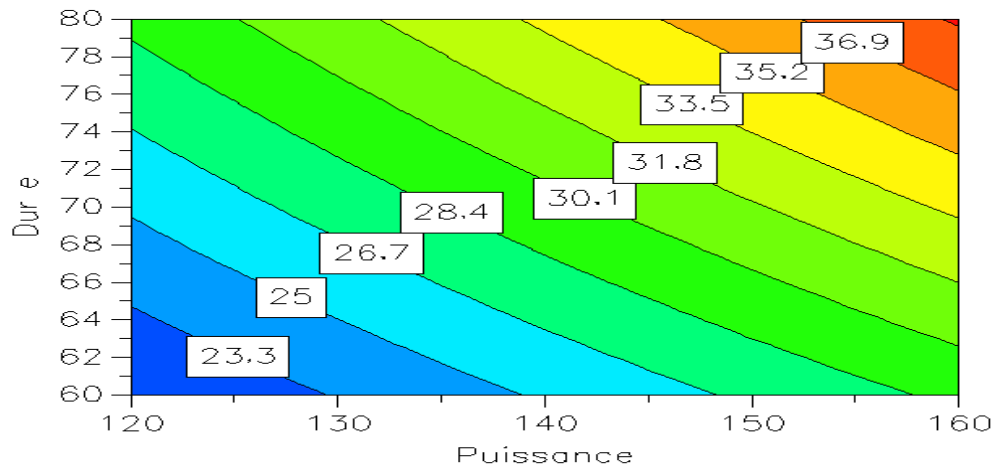


Figure .1.11. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation de l'énergie d'extraction en fonction de la puissance et durée.

Le graphe suivant montre les effets de puissance et de durée d'extraction sur le dosage de polyphénols.

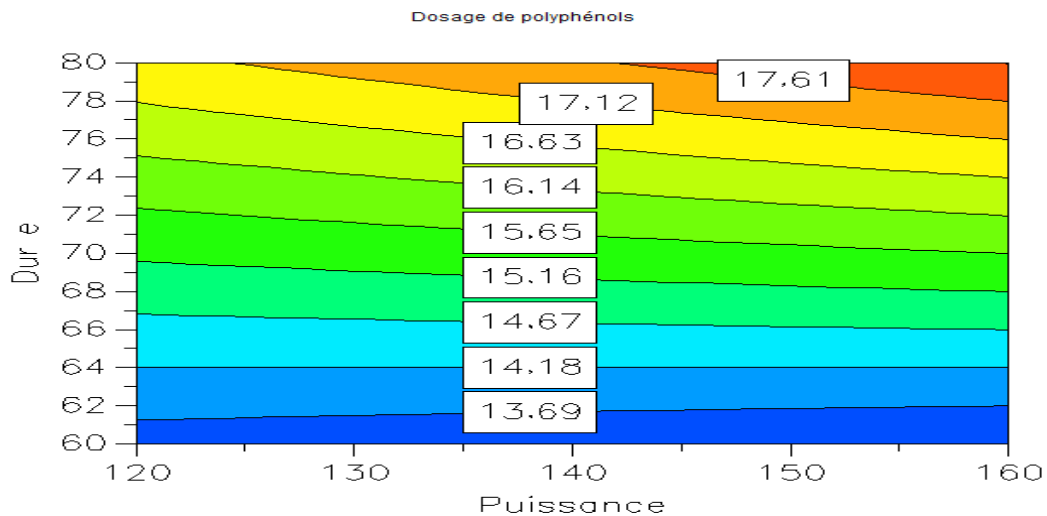


Figure .1.12. Courbes d'iso réponses obtenues illustrant la variation du dosage de polyphénols en fonction du durée et de la puissance.