

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
«HOUARI BOUMEDIENE »

FACULTE DE CHIMIE



MEMOIRE

Présentée pour l'obtention du **diplôme** de **DOCTORAT** en science
EN : CHIMIE

SPECIALITE : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE
Par

Madame : **BOUTEBOUHART HADJER épouse ZANOUN**

Thème

**Composition Chimique Bioactivité de Deux Plantes
Médicinales : Les Feuilles D'olivier (*Olea europaea* L.) et La
Sauge Officinale (*Salvia officinalis* L.)**

Soutenu le 17 / 12 /2022, devant le jury composé de :

M. M. REKIS	Professeur à l'USTHB/ FCH	Président
M. F. BENKACI-ALI	Professeur à l'USTHB/ FCH	Examineur
M. H.BOUTOUMI	Professeur à l'U.Blida1	Examineur
M. Y. FOUDIL-CHERIF	Professeur à USTHB/ FCH	Examineur
M. M. HAZZIT	Professeur à l'ENSA	Examineur
Mme. F.ABDELATIF-DAHMANE	MCA à l'ENS-Kouba	Examinatrice

DEDICACES

A mes très chers parents

Aucun de mes mots ne saurait exprimer l'ampleur de ma reconnaissance. Merci pour votre amour, votre patience et vos encouragements. Vous êtes, comme vous le savez, un grand modèle d'inspiration pour moi !!

Cette thèse vous est dédiée.

A mon époux,

Je te remercie pour ta patience et tes encouragements. J'espère, qu'à deux, nous irons encore plus loin !

A mon petit prince Ahmed et ma petite princesse Meriem

A mon frère Zino

A mes sœurs

Soumia et toute sa famille, khadidja et toute sa famille

A ma belle-sœur et son mari et leur fils firass

A toute ma famille ma belle famille

Merci pour votre amour, vos encouragements et votre bienveillance. Vous qui vous êtes souciés à maintes reprises de l'état d'avancement de ma thèse ...Merci infiniment !

Remerciements

Je remercie Dieu de m'avoir prêté vie, santé et volonté pour achever ce travail.

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein du laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (U.S.T.H.B). Je remercie monsieur le Professeur A. BAALIOUAMMEUR de m'avoir accueilli.

J'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de thèse Pr DIDAOUI-RABIA Linda. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet et de l'avoir mené à bien. Je vous suis très reconnaissante pour vos encouragements, votre aide, ainsi que la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordée. Je ne manquerai pas de souligner vos grandes qualités humaines qui m'ont permis de travailler en toute quiétude et sérénité.

Je présente mes remerciements les plus distingués aux Professeurs REKIS (Président du jury), Pr F.BENKACI-ALI (Examinateur), Pr H. BOUTOUMI (Examinateur), Pr Y.FOUDIL-CHERIF (Examinateur), Pr M. HAZZIT (Examinateur) et la Maitre de Conférence Mme. F. ABDELATIF-DAHMANE (Examinatrice) d'avoir accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury. Je vous remercie d'avoir enrichi cette étude par vos expertises et vos expériences respectives.

Je remercie également Madame le Professeurs Diana Pinto et Monsieur Silva pour son accueil au sein du laboratoire de chimie organique L.C.O à l'université d'AVIRO pour l'analyse LC-MS et sa disponibilité durant mon stage. Je remercie également l'ensemble du personnel, pour son aide durant mes expérimentations.

A tous les membres du laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle, je vous remercie pour votre soutien, vos encouragements, vos paroles réconfortantes et vos orientations scientifiques. Vous m'avez tous, d'une façon ou d'une autre, aidé à réaliser cette thèse.

Je remercie l'ensemble des membres du Centre de Recherche en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) pour l'aide technique qu'ils m'ont apporté.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (ENS-Kouba), particulièrement à Samira TATA pour sa disponibilité et son aide pour réaliser les tests microbiologiques.

Mes vifs remerciements sont adressés à Mme K. AZINE, directrice du laboratoire de Pharmacologie du Centre de Recherche et de Développement de SAIDAL pour l'activité anti-inflammatoire.

Une pieuse pensée pour la mémoire de nos regrettés Pr N.SABAOU avec qui j'ai eu la chance de travailler, que Dieu vous accueille dans son vaste paradis.

Sommaire

INTRODUCTION	1
--------------------	---

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Plantes aromatiques et médicinale PAM.....	4
I.1. Définitions des substances naturelles.....	4
I.2. Composition chimique des plantes aromatiqueset médicinales.....	4
II. Les huiles essentielles	5
II.1. Définition.....	5
II.2. Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	5
II.3. Utilisation des huiles essentielles en médecine traditionnelle.....	5
II.4. Composition chimique des huiles essentielles.....	6
II.4.1. Monoterpènes.....	7
II.4.2. Sesquiterpènes.....	7
II.4.3. Diterpènes.....	7
II.4.4. Triterpènes et stéroïdes.....	8
II.5. Les activités pharmacologiques et biologiques des huiles essentielles.....	8
II.5.1. Activités pharmacologiques.....	8
II.5.2. Activités biologiques.....	9
II.5.2.1. Activité antibactérienne.....	10
II.5.2.2. Activité antifongique.....	10
II.5.3. Activité anti-oxydante.....	11
II.6. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	12
II.6.1. Les méthodes d'extraction conventionnelles.....	12
II.6.1.1. L'hydrodistillation.....	12
II.6.1.2. Entraînement à la vapeur.....	13
II.6.1.3. Méthode d'hydrodiffusion.....	13
II.6.1.4. Extraction aux solvants volatils.....	14
II.6.2. Méthodes d'extractions innovantes.....	14
II.6.2.1. Extraction par des solvants supercritiques.....	14
II.6.2.2. Extraction aux ultrasons.....	16
II.6.2.3. Hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	17
II.6.2.4. Extraction par solvant assistée par micro-ondes.....	17
II.6.2.5. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).....	18
II.6.2.6. Entraînement à la vapeur assisté par micro-onde.....	19
II.7. Méthodes d'analyses des huiles essentielles.....	19
II.7.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	19
II.7.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS).....	21
III. Les métabolites secondaires.....	22
III.1. Les Polyphénols.....	23
III.1.2. Les principales classes des composés phénoliques.....	23
III.1.2.1 Les flavonoïdes.....	23
III.1.2.2. Les Tanins.....	23
III.1.3. Classification des polyphénols.....	23

Sommaire

III.2. Les activités des polyphénols.....	24
III.2.1. Activités biologiques.....	24
III.2.2. Activité Antioxydante.....	25
III.3. Méthodes d'extraction des polyphénols.....	25
III.3.1. Méthode d'extraction conventionnelle.....	25
III.3.2. Méthodes non-conventionnelles.....	25
III.3.2.1.Extraction par ultrasons.....	25
III.3.2.2.Extraction par microondes.....	26
VI. Méthodes d'analyse des polyphénols et flavonoïdes.....	26
VI.1. Analyse par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	27
VI.1.1. HPLC/PDA.....	27
VI.1.2. Couplage HPLC-MS.....	27
VI.1.3. ESI-MS.....	28

Chapitre II : PRESENTATION DES PLANTES ETUDIE

I : Etude de la sauge officinale « *Salvia officinalis* L. »

I. Description morphologique.....	37
II. Classification taxonomique.....	37
III. Habitat	38
IV. Composition chimique de l'huile essentielle de la sauge.....	38
V. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> des différents pays	39
VI. Les propriétés pharmacologiques de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> L.....	40

II : Etude des feuilles olivier « *Olea europaea* L. »

I. Description botanique.....	41
II. Classification botanique.....	42
III. Distribution géographique.....	43
III.1. Répartition de l'olivier dans le monde.....	43
III.2. Répartition de l'olivier dans le bassin méditerranéen.....	44
III.3. Répartition de l'oléiculture en Algérie.....	44
IV. Les différentes variétés d'oliviers cultivées en Algérie.....	45
IV.1. Chemlal.....	45
IV.2. Azeradj.....	45
IV.3. Limli.....	46
IV.4. Bouchouk.....	46
IV.5. Rougette de Mitidja.....	46
IV.5.1. La variété Abani.....	46

Sommaire

IV.5.2. La variété Ferkani.....	47
IV.5.3. La variété Sigoise.....	47
V. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier <i>Olea europaea</i> L.....	47
VI. Les propriétés pharmacologiques des feuilles d'olivier.....	49
VI.1. Activité antioxydante	49
VI.2. Activité antibactérienne.....	49

Chapitre III : MATERIELS ET METHODES

I : La Sauge officinale « *Salvia officinalis* L.»

I. Matériel végétal et extraction.....	57
I. 1. Matériel végétal.....	57
I.2. Extraction des huiles essentielles.....	57
II. Méthodes de caractérisation physico-chimique des HE.....	59
II.1.1 Densité à 20°C.....	59
II.2. Indice de réfraction à 20°C.....	59
II.3. Pouvoir rotatoire à 20°C.....	59
II.4. Indice d'acide.....	60
II.5. Indice d'ester.....	60
III. Méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	61
III.1. Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID).....	61
III.2. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS.....	61
IV. Activité antioxydante des huiles essentielles <i>Salvia officinalis</i> L.....	62
V. Activité antibactérienne des huiles essentielles <i>Salvia officinalis</i> L.....	63
VI. Méthodes d'extractions des polyphénols	63
VI.1. macération à froid (MAF).....	63
VI.2. Macération assistée par micro-ondes (MAMO).....	64
VI.2.3. Macération assistée par ultrasons (MAU).....	64
VII. Analyse quantitative des extraits.....	64
VII.1. Dosage des polyphénols totaux.....	64
VII.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	64
VIII. Evaluation de l'activité antioxydante	65
VIII.1. Test de DPPH.....	65
VIII.2. Test d'ABTS.....	65

Etude des feuilles d'olivier « *Olea europaea* L. »

I. Matériel végétal et extraction.....	65
I. 1. Matériel végétal.....	65
I. 2. Méthodes d'extractions des polyphénols	66
I.2.1. macération à froid (MAF).....	66
I.2.2. Macération assistée par micro-ondes (MAMO).....	66
I.2.3. Macération assistée par ultrasons (MAU).....	66
II. Screening phytochimique des principales familles chimiques.....	67
III. Analyse quantitative des extraits.....	69
III.1. Dosage des polyphénols totaux.....	69

Sommaire

III.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	69
IV. Evaluation des activités biologiques.....	70
IV.1. Activité antioxydante.....	70
IV.1.1. Test de DPPH.....	70
IV.1.2. Test d'ABTS.....	71
VI. 2. L'activité antibactérienne.....	72
V. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	73
VI. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	73
VII. Analyse par Chromatographie liquide ultra-haute performance-spectrométrie de masse (UHPLC-DAD-ESI / MSn).....	75

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Etude des HEs de la salvia officinalis L.

Etude de la Composition Chimique, Activité antioxydante et Activité Antibactérienne des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L.

I. Introduction.....	79
II. Influence des techniques d'extraction sur le rendement et la composition chimique.....	79
II.2. Influence des techniques d'extraction sur le rendement.....	79
II.3. Comparaison des rendements de l'huile essentielle d' <i>Salvia officinalis</i> des différents Pays.....	80
II.4. Constantes physico-chimiques.....	80
II.5. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles.....	82
II.5.1. Variation de la composition chimique en fonction de la méthode d'extraction	84
III. Influence de la méthode de séchage sur le rendement et la composition chimique	87
III.1. Influence de la méthode de séchage sur le rendement.....	87
III.2. Influence de la méthode de séchage sur la composition chimique.....	89
IV. Activité antioxydante des huiles essentielles.....	92
V. Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	93
VI. Analyse quantitative des extraits.....	95
VI.1. Rendement des différents extraits.....	95
VI.2. Effet de la polarité du solvant et la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux.....	96
VI.2.1. Teneur polyphénols totaux.....	96
VI.2.2. Teneur flavonoïdes totaux.....	97
VI.3. Effet de la polarité du solvant sur l'activité antioxydante des différents extraits	98
VI.3.1. Teste DPPH.....	98
VI.3.2. Teste ABTS•+.....	100

Etude des Extraits d'*Olea europaea* L.

Etude de l'activité antioxydante, Antibactérienne, Antifongique et Analyse par HPLC- MS des extraits des feuilles d'olivier « *Olea europaea* L. »

Sommaire

I. Introduction.....	104
II. Résultat et discussion.....	105
II.1. Etude du rendement en fonction de la méthode d'extraction et du solvant.....	105
II.3. Chromatographie liquide ultra-haute performance couplée spectrométrie de masse (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS).....	106
II.4. Screening phytochimique.....	115
II.5. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux.....	116
II.5.1 Etude des rendements en polyphénols totaux fonction de la méthode d'extraction et du solvant.....	116
II.5.2. Etude des rendements en flavonoïdes totaux fonction de la méthode d'extraction et du solvant.....	118
II.6. Activité antioxydante.....	120
Teste DPPH.....	120
Teste ABTS•+.....	122
III.3. Activité antioxydante.....	125
Teste DPPH.....	125
Teste ABTS•+.....	126
IV. Activité antimicrobienne de quelque extrait d' <i>Olea europaea</i> L. exprimée en diamètre de la zone d'inhibition (mm).....	127
V. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de quelque extrait	131
V.1. Extrait méthanolique de la variété Chemlal et Limli.....	131
V.2. Extrait éthanolique de la variété Chemlal et Limli.....	132
V.3. Extrait d'acétate d'éthyle la variété Chemlal et Limli	132
VI. Activité anti-inflammatoire.....	133

Liste des abréviations

HE : Huile essentielle

HD : Hydrodistillation classique

HDMO : Hydrodistillation assistée par micro-onde

EVE-MO : Entraînement à la vapeur d'eau

S. officinalis L : *Salvia officinalis* L

h. c monoterpéniques : Hydrocarbures monoterpéniques

h. c sesquiterpénique : Hydrocarbures sesquiterpéniques

MAF : macération à froid

MAMO : macération assistée par micro-ondes

MAU : Macération assistée par Ultrasons

MOH : Méthanol

EOH : Ethanol

KI: Indice de Kovats

KI*: Indice de Kovats de référence

t : temps

s : seconde

min : minute

h :heure

P : pression

l: litre

mm : millimètre

μL : microlitre

g : gramme

mg : milligramme

mg/ml : milligramme par litre

ml : millilitre

Liste des abréviations

T : temperature

CO₂ : Dioxyde de carbone

R : Rendement

W : watt

UV-vis: UV-visible

TP : Teneur en polyphénols

TF : Teneur en polyphénols

mg EAG/g d'extrait : milligramme Equivalent d'acide gallique par gramme d'extrait

mg EQ/g d'extrait : milligramme Equivalent de quercitine par gramme d'extrait

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

BHT : Hydroxytoluène butylé

ABTS : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6- sulfonique

IC₅₀ : Concentration inhibitrice pour 50%

MIC : Concentration minimale inhibitrice

GC : Chromatographie en phase gazeuse

GC/MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

UHPLC-DAD-ESI / MS_n : chromatographie liquide ultra-haute performance couplée avec spectrométrie de masse

Bacillus subtilis : *B. subtilis*

Staphylococcus aureus: *S. aureus*

Pseudomonas aeruginosa : *P. aeruginosa*

Escherichia coli : *E. coli*

Umbelopsis ramanniana : *U. ramanniana*

Aspergillus carbonarius : *A. carbonarius*

CMI : Concentration minimale inhibitrice

ACEPRAL : acide acétylsalicylique

Liste des Tableaux

CHAPITRE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.1: Les principales classes des composés phénoliques.....	24
---	----

Chapitre II : Présentation des plantes étudié

Tableau II.1: Composition de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> L.....	39
Tableau II.2: Les composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Salviaofficinalis</i> des différents pays	39
Tableau II.3: Structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants des feuilles d'olivier cultivé.....	48

Chapitre III : Matériels et méthodes

Tableau III.1.: Conditions opératoires des différentes techniques d'extraction utilisées	58
Tableau III.2. Conditions d'analyse par GC-MS.....	62
Tableau III.3. Conditions opératoires des différentes techniques d'extraction utilisées	67
Tableau III.4 : Protocoles opératoires.....	68

Chapitre IV : Résultats et discussions

Etude de la Composition Chimique, Activité antioxydante et Activité Antibactérienne des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L.

Tableau IV.1: Rendement des huiles essentielles de la sauge officinale obtenu méthodes d'extraction HD, HDMO et EV.....	79
Tableau IV.2: rendements de l'huile essentielle d' <i>Salvia officinalis</i> des différents pays	80
Tableau IV.3 : les constantes physico-chimiques des HE de la <i>Salviaofficinalis</i>	81
Tableau IV.4 : composition chimique des huiles essentielles de la <i>Salviaofficinalis</i> obtenues par HD, HDMO et EV.....	85
Tableau IV.5 : Rendement des huiles essentielles de la sauge officinale obtenu par HD différents échantillons.....	88
Tableau IV.6 : composition chimique des huiles essentielles de la <i>Salvia officinalis</i> obtenues différents méthodes de séchage.....	89

Liste des Tableaux

Tableau IV.7: Activité antioxydante de l'huile essentielle de la <i>Salvia officinalis</i> et le BHT à différentes concentrations (mg/L).....	92
Tableau IV.8: Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>S. officinalis</i> obtenues par HD, HDMO et EV.....	93
Tableau IV.9 : Aspect, couleur et rendement des différents extraits.....	95

Etude de l'activité antioxydante, antibactérienne, antifongique et analyse par HPLC-MS des extraits d'*Olea europaea* L.

Tableau IV.1 : Aspect, couleur et rendement des différents extraits.....	105
Tableau IV.2 : Identification des composés phénolique des quelques extraits d' <i>Olea europaea</i>	113
Tableau IV.3 : Résultats du Screening phytochimique.....	115
Tableau IV.4 : Tableau IV.4 : Rendement en polyphénols totaux (PT).....	116
Tableau IV. 5 : Rendements en flavonoïdes totaux (FT).....	118
Tableau IV.6 : Activité antibactérienne des extraits des feuilles d'olivier exprimée en diamètre de la zone d'inhibition (mm).....	128
Tableau IV.7 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) extrait méthanolique d' <i>Olea europaea</i> L.des deux variétés Chemlal et Limli....	131
Tableau IV.8 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) extrait éthanolique d' <i>Olea europaea</i> L.des deux variétés Chemlal et Limli.....	132
Tableau IV.9 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) extrait d'acétate d'éthyle d' <i>Olea europaea</i> L.des deux variétés Chemlal et Limli	132
Tableau IV.10 : Moyennes arithmétiques des poids des pattes gauches et droites de la souris, pourcentages d'œdème et pourcentages de réduction de l'œdème pour l'extrait éthanolique d' <i>Olea europaea</i> L. de la variété Chemlal.....	133
Tableau IV.11 : Moyennes arithmétiques des poids des pattes gauches et droites de la souris, pourcentages d'œdème et pourcentages de réduction de l'œdème pour l'extrait éthanolique d' <i>Olea europaea</i> L. de la variété Limli.....	133

Liste des figures

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I.1. Quelques composés des huiles essentielles	6
Figure I.2. Montage de l'hydrodistillation au laboratoire (Clevenger).....	13
Figure I.3 : Schéma de l'extraction par solvant assistée par micro-ondes.....	18

Chapitre II : Présentation des plantes étudié

Figure II.1 : la sauge (<i>Salvia officinalis</i> L.).....	37
Figure II.2: Répartition géographique du genre <i>Salvia</i> dans le monde.....	38
Figure II.3 : Aspect morphologique de la plante <i>Olea europaea</i> L. et leurs parties	42
Figure II. 4 : La plante <i>Olea europaea</i> L.....	42
Figure II. 5. L'olivier dans le monde.....	43
Figure II.6 : Localisation de l'olivier en Algérie	44

Chapitre III : Matériels et méthodes

Figure III.1. Schéma du dispositif d'hydrodistillation.....	576
Figure III.2. Schéma du dispositif de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes	587
Figure III.3. Schéma du dispositif d'Entrainement à la vapeur.....	58
Figure III.4. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (AH).....	70
Figure III.4. Génération et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H ⁺	71
Figure III.5. Photographies montrant les étapes expérimentales de l'activité anti inflammatoire.....	74

Chapitre IV : Résultats et discussions

Etude de la Composition Chimique, Activité antioxydante et Activité Antibactérienne des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L.

Figure IV.1 : chromatogramme de l'huile essentielle d' <i>Salvia officinalis</i> obtenue par HD.....	83
Figure IV. 2: chromatogramme de l'huile essentielle d' <i>Salvia officinalis</i> obtenue par HDMO.....	93

Liste des figures

Figure IV. 3 : chromatogramme de l'huile essentielle d' <i>Salvia officinalis</i> obtenue par EV.....	84
Figure IV.4: Pourcentage des familles chimiques de l'huile essentielle d' <i>Salvia officinalis</i> obtenues par HD, HDMO et EV.....	87
Figure IV.5: Rendement des HE de la sauge officinale obtenu par différents méthodes de séchage extraite par hydrodistillation (HD).....	88
Figure IV.6: Pourcentage des familles chimiques de l'huile essentielle d' <i>Salvia officinalis</i> différents méthode de séchage.....	91
Figure IV.7 : Rendement des extraits de <i>Salviaofficinalis</i>	96
Figure IV.8 : Teneur en polyphénols Totaux de <i>Salvia officinalis</i>	96
Figure IV.9 : Teneur en flavonoïdes Totaux de <i>Salviaofficinalis</i>	97
Figure IV. 10: Valeurs IC50 des extraits <i>Salviaofficinalis</i> par la méthode de DPPH	99
Figure IV.11: Valeurs IC50 des extraits <i>Salviaofficinalis</i> par la méthode de ABTS ⁺	100

Etude de l'activité antioxydante, antibactérienne, antifongique et analyse par HPLC- MS des extraits d'*Olea europaea* L.

Figure IV. 1: Rendement des extraits de la variété Chemlal.....	106
Figure IV. 2: Rendement des extraits de la variété Limli.....	106
Figure IV.3 : Chromatogramme HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait méthanolique de la variété Chemlal d' <i>Olea europaea</i>	107
Figure IV.4 : Chromatogramme HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait éthanolique de la variété Chemlal d' <i>Olea europaea</i>	108
Figure IV.5 : Chromatogramme HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait méthanolique de la variété Limli d' <i>Olea europaea</i>	109
Figure IV.6 : Chromatogramme HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait éthanolique de la variété Limli d' <i>Olea europaea</i>	110
Figure IV.7 : structures de quelque composé phénolique.....	112
Figure IV.8 : photos des résultats du screening phytochimique terpènes et stérols, saponosides, tanins, et les alcaloïdes.....	115
Figure IV.9 : Teneur en polyphénols Totaux de la variété Chemlal.....	118
Figure IV.10 : Teneur en polyphénols Totaux de la variété Limli.....	118
Figure IV.11 : Teneur en flavonoïdes Totaux de la variété Chemlal.....	120
Figure IV.12 : Teneur en flavonoïdes Totaux de la variété Limli.....	120
Figure IV. 13: Courbe d'étalonnage de BHT.....	120
Figure IV.14 : Les IC50 des extraits de la variété Chemlal par la méthode de DPPH.	121
Figure IV.15 : Les IC50 des extraits de la variété Limli par la méthode de DPPH.	121
Figure IV. 16 : Courbe d'étalonnage de Trolox.....	122

Liste des figures

Figure IV.17 : Les IC50 des extraits de la variété Chemlal par la méthode de ABTS ^{•+}	123
Figure IV.18 : Les IC50 des extraits de la variété Limli par la méthode de ABTS ^{•+}	123
Figure IV.19 : Les IC50 des extraits de la variété Chemlal par la méthode de DPPH	126
Figure IV.20 : Les IC50 des extraits de la variété Limli par la méthode de DPPH....	126
Figure IV.21 : Les IC50 des extraits de la variété Chemlal par la méthode de ABTS ^{•+}	127
Figure IV.22 : Les IC50 des extraits de la variété Limli par la méthode de ABTS ^{•+}	127
Figure IV.32 : Activité antibactérienne des extraits méthanolique, éthanolique et acétate d'éthyle d' <i>Olea europaea</i> L. des deux variétés Chemlal et <i>Limlivi</i> - à-vis <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>U. ramanniana</i>	129

Introduction

Introduction Générale

Les plantes ont depuis longtemps présenté un rôle très important pour l'humanité, car elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activités biologiques potentielles. Elles constituent des merveilleuses usines végétales qui nous donnent la joie de guérir par un geste thérapeutique [1]. On s'en sert traditionnellement pour se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture et conserver les aliments (ou les cadavres).

Jusqu'à aujourd'hui, l'usage populaire des plantes reste d'une grande importance. D'après les données fournies par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 80% de la population mondiale traitent leurs problèmes de santé par des remèdes traditionnels, d'une part parce qu'elles n'ont souvent pas accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne et, d'autre part, parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité [2]. La majorité des médicaments actuels, sont d'origine végétale ou fabriqués à partir de leurs modèles (synthèse ou hémisynthèse chimique des principes actifs). La médecine par les plantes est donc devenue une grande science, dans laquelle on part de la plante vers le principe actif.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les terpènes dans les huiles essentielles.

Les huiles essentielles sont des produits de grande valeur ajoutée utilisées dans divers domaines tels que la parfumerie, l'agro-alimentaire, la pharmacie et l'aromathérapie, ce sont des substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants, elles ont été suggérées comme sources alternatives très importante pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires, et pour éviter les pertes post-récoltes des fruits pendant le stockage [3].

Dans le but de valoriser les plantes médicinales Algériennes, nous présentons dans ce travail une étude phytochimique et pharmacologique deux plantes aromatiques et médicinales, les feuilles d'olivier qui appartiennent à la famille des Oléacées (*Olea Europaea* L.) et également à la sauge officinale qui appartient à la grande famille des Lamiacées (*Salvia Officinalis* L.).

Plusieurs travaux ont montré les propriétés médicinales des feuilles d'olivier comme les activités antioxydant, antibactériennes, antifongique, anti-inflammatoire et anticancérigène [4].

Les huiles essentielles du sauge sont très connues pour ses propriétés médicinales et thérapeutiques importantes. Elle est utilisée en médecine traditionnelle comme remède à beaucoup de maux, les feuilles de la sauge (*S. officinalis*), montrent une gamme des activités biologiques; antibactérienne, antifongique, antivirale et astringente [5].

Notre objectif principal est d'orienter la recherche vers leurs valorisations et de montrer l'intérêt indéniable de leurs utilisations tant pour les scientifiques que pour le grand public.

Pour atteindre ce but, des objectifs principaux sont :

- Etude de l'effet de la polarité du solvant et de la méthode d'extraction des antioxydants présents dans l'*Olea Europaea*.
- Evaluation de l'activité antioxydante et des teneurs en polyphénols totaux et les flavonoïdes des extraits obtenus, en appliquant de nouvelles techniques telles que l'extraction assistée par micro-onde et l'extraction assistée par ultrasons.
- Analyse de quelques extraits obtenus des feuilles d'olivier par UHPLC-DAD-ESI / MSn.
- Evaluation des activités antimicrobiennes et antifongiques des extraits d'*Olea Europaea*.
- Etude de l'activité anti-inflammatoire des extraits d'*Olea Europaea*.
- Extraction et identification des huiles essentielles des feuilles de la *Salvia officinalis* par diverses méthodes.
- Effet de la technique d'extraction et la méthode de séchage sur le rendement et la composition des huiles essentielles.
- Evaluation des activités antioxydante et antimicrobienne et détermination des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*.

Notre travail est composé principalement de quatre chapitres. Le premier présente une synthèse bibliographique sur les métabolites secondaires, en particulier, les composés phénoliques et les huiles essentielles, les procédés d'extraction, les méthodes d'analyse, la composition chimique, les classifications et les propriétés biologiques pharmacologiques.

Le deuxième chapitre présente la plante étudiée, description botanique, composition chimique et les activités biologiques. Le troisième chapitre matériels et méthode,

le quatrième chapitre résultats et discussion composé de deux parties : la première partie est consacrée à l'étude de la plante *OleaEuropaea*, dans lequel nous présentons nos résultats expérimentaux de la fraction non volatile et les activités antioxydants et biologiques, les analyse par UHPLC-DAD-ESI / MSn, les travaux antérieurs. La deuxième parité est réservée à l'étude de la *Salviaofficinalis* dans lequel nous présentons nos résultats expérimentaux de la fraction volatile et les activités antioxydants et biologiques, les travaux antérieurs. Nous terminons, enfin par une conclusion générale et des perspectives.

Référence Biblioigraphique

1. J.M. Hurtel. (2006). Huiles essentielles et médecine. Aromathérapie.
2. M.H. Novais. (2004). Studies on pharmaceuticalethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*. 93: 183-195.
3. S.S. Cheng, M.T. Chua, E.H. Chang, C.G. Huang, W.J. Chen, S.T. Cheng. (2009). Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. *Bioresour. Technol.* (100): 465-470.
4. M. KiritsakisKostas, G. Kontominas, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, A. Moustakas, A. Kiritsakis, (2010). Composition and Antioxidant Activity of *Olive Leaf* Extracts from Greek Olive Cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87(4) 369-376
5. A. Djerroumi M. Nacef. (2013). 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed. Houma.

Chapitre I :

Synthèse Bibliographique

I. Plantes aromatiques et médicinales

I.1. Définitions des substances naturelles

Les Plantes Aromatiques Médicinales (PAM) contiennent des molécules à haute valeur ajoutée, parmi lesquelles on trouve des composés ayant une activité olfactive dominante. Elles représentent ce que l'on appelle huile essentielle (HE), l'HE est très convoité par les industries pharmaceutiques et cosmétiques [1,2]. Connue aussi sous le nom d'essence, une huile essentielle est un ensemble de molécules volatiles extraites de plantes aromatiques par distillation sèche, par expression, par incision de la plante [3]. Il s'agit d'un ensemble de molécules aromatiques d'origine naturelles qui sont utilisées par l'aromathérapie pour leurs effets bénéfiques sur la santé. L'aromathérapie est l'art de préserver la santé avec les huiles essentielles. Elle fait recours à une méthodologie rigoureuse qui s'inspire de données scientifiques solides confirmées tant par l'expérimentation clinique que par les recherches en laboratoire [4].

I.2. Composition chimique des extraits des plantes aromatiques et médicinales

La composition chimique des extraits des plantes aromatiques est très complexe, elle est constituée de deux fractions regroupées sous la dénomination de métabolites secondaires. La première fraction dite volatile (Composés Organiques Volatils (COV)) est présente dans différents organes de la plante selon la famille, cette fraction constitue l'huile essentielle. Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de molécules très volatiles formées à partir du motif isoprénique où les réactions d'addition de ces unités conduisent à différentes familles de molécules, monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes et leurs dérivés oxygénés, alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters, produits de leurs oxydations. Tous ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique [5]. La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est constituée essentiellement de polyphénols, on peut citer les coumarines, les flavonoïdes [6], les alcaloïdes...etc

. Les polyphénols jouent un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante [7].

II. Les huiles essentielles

II.1. Définition

Plusieurs définitions d'une huile essentielle sont disponibles dans la littérature.

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux volatils et odorants appelés également substances organiques aromatiques liquides, obtenus par entraînement à la vapeur d'eau de plantes aromatiques ou d'organe de cette plante (fleur, feuille, bois, racine, écorce, fruit,...), elles sont volatils et sensibles à l'effet de la chaleur [8].

Selon la 8^{ème} éditions de la pharmacopée française, les huiles essentielles, essences ou huiles volatils sont des produits d'une composition généralement assez complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux dont ils sont plus ou moins modifiés au cours de leurs préparations [9].

La norme AFNOR [10], définit l'huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques, ou bien par distillation sèche [9].

La majorité des huiles essentielles sont des liquides très peu colorés, volatils à température ambiante. Les huiles essentielles dégagent une odeur caractéristique, en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes.

II.2. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois racines, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées à la surface de la plante : cellules à huiles essentielles des Lauraceae ou des Zingiberaceae, polis sécréteurs des Lamiaceae, des poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae [11] Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe [12, 13].

II.3. Utilisation des huiles essentielles en médecine traditionnelle

L'utilisation des plantes aromatiques et des huiles essentielles par l'être humain est très ancienne et assez universelle, il s'en sert traditionnellement pour conjurer le mauvais sort, se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture, conserver les aliments... etc.

De plus on retrouve leurs utilisations dans divers domaines commel'industrie cosmétique et pharmaceutique, la parfumerie et l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains en utilisant les huiles essentielles des plantes [14].

II.4. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes. Les constituants principaux sont les terpénoïdes. On retrouve également des composés oxygénés dérivés de ces terpénoïdes ou qui suivent la voie synthétique des phénylpropanes [15]. La Figure I.1 ci-dessous présente les structures de quelques composants retrouvés dans les huiles essentielles.

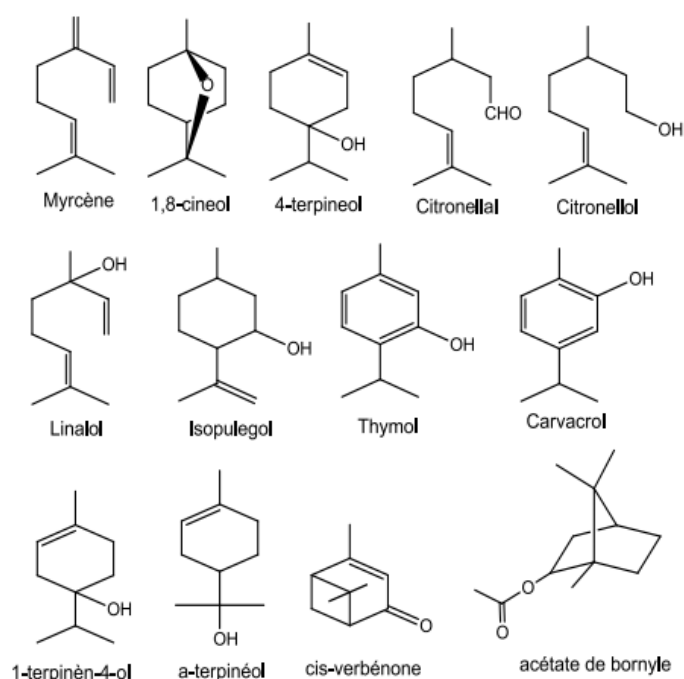


Figure I.1. Quelques composés des huiles essentielles [16]

Leur squelette carboné résulte de la condensation d'unités à 5 atomes de carbone l'isoprène (1-méthyl-buta-1,3- diène) [17]. La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre : les hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40), et les polyterpènes. De nombreux isoprénoïdes comme le pinène, le thymol, le menthol ou le limonène sont des substances odoriférantes, souvent rencontrées dans les huiles essentielles. D'autres jouent un rôle physiologique important, comme les caroténoïdes, la vitamine E et le cholestérol. Le nombre de répétitions de ce motif isoprénique, mais aussi, les réactions de

cyclisation, les réarrangements et les diverses réactions d'oxydations et de réductions que peut subir le squelette carboné sont à l'origine de la grande diversité structurale de ces molécules.

II.4.1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes) [18]. Ils comportent dix (10) atomes de carbones et sont issus de la condensation de deux unités isoprène, selon le mode de couplage « tête-queue » [19]. L'arrangement de leur squelette peut être : acyclique, mono, bi, et tricyclique [11].

II.4.2. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones, ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. On peut également rencontrer dans les plantes des sesquiterpènes lactones. Ces métabolites secondaires sont issus de l'oxydation d'un groupe méthyle du groupement isopropyle attaché au squelette de base sesquiterpénique [20]. Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des plantes, notamment chez les espèces des familles Lamiaceae, Myrtaceae, Pinaceae et Rutaceae [21].

II.4.3. Diterpènes

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C-20 issus du métabolisme du 2*E*, 6*E*, 10*E*-géranylgeranylpyrophosphate. Très répandus chez les végétaux supérieurs, ils sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins [11]. On peut les trouver encore dans les résines, les exsudats et les gommages naturelles. Il est rare de rencontrer les diterpènes comme constituants des huiles essentielles, à cause de leurs points d'ébullition élevés [22]. Ils peuvent être acycliques ou cycliques. Deux alcools importants sont connus, le phytol, rencontré sous forme d'ester dans les végétaux à chlorophylle et la vitamine A essentielle à la croissance normale des mammifères et indispensable pour la reproduction et la vue [23].

II.4.4. Triterpènes et stéroïdes

Ce sont des composés en C-30 issus de la cyclisation du 3*S*-2,3-époxyqualène, ou plus rarement du squalène lui-même [17]. Ils sont presque toujours hydroxylés en position C-3 du fait de l'ouverture de l'époxyde. Les triterpènes présentent une très forte unité structurale, les différences majeures sont d'ordre stéréochimiques ayant trait à la conformation adoptée par l'époxyqualène avant la cyclisation initiale.

Les stéroïdes sont des composés qui contiennent le noyau perhydrocyclopenténo phénanthrène.

Ils représentent une grande variété de composés naturels parmi lesquels se trouvent les stérols proprement dits, les acides biliaires, les hormones sexuelles, les hormones corticosurrénales, les glucosides cardiotoniques, les sapogénines et quelques alcaloïdes. Pratiquement, la position 3 est occupée par l'oxygène dans tous les stéroïdes naturels. Les stérols proprement dits n'ont aucun autre substituant oxygéné. Les substituants situés du même côté du squelette polycyclique que le groupe méthyle C-19 (en C-10) sont dits β , et les autres α [24].

II.5. Activités pharmacologiques et biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été utilisées dans plusieurs domaines, l'aromathérapie, la pharmacie, la parfumerie, la cosmétique et la conservation des aliments, du essentiellement à leur large spectre d'activités biologiques [25-27]

II.5.1. Activités pharmacologiques

Actuellement l'aromathérapie constitue dans certains cas une alternative aux traitements proposés en médecine conventionnelle. Elle permet également de limiter l'emploi de médicaments ou de renforcer leur action en s'y associant. De nos jours le recours au naturel est de plus en plus présent afin de limiter l'usage des médicaments.

Les huiles essentielles sont principalement utilisées pour leurs propriétés [28] :

- **Activité anti-infectieuse:** cette propriété est validée pour de nombreuses huiles essentielles. Elles détruisent des bactéries, des virus et des champignons.

- Activité antiparasitaire, insectifuge, insecticide: certaines huiles essentielles détruisent des parasites (poux, puces, agents responsables de la gale, etc.), éloignent et détruisent des insectes (nombreux moustiques).
- Activité neurotrophe: les huiles essentielles agissent au niveau du système nerveux. Elles présentent une action calmante ou stimulante.
- Activité anti-inflammatoire: les huiles essentielles calment des inflammations localisées au niveau d'articulations, de tendons, de nerfs, de muscles, de la peau, des muqueuses, etc.
- Activité antihistaminique: les huiles essentielles inhibent des réactions allergiques.
- Activité spasmolytique: les huiles essentielles permettent de stopper des contractions musculaires (muscles striés et muscles lisses).
- Activité vasculaire et lymphatique.
- Les huiles essentielles réduisent un œdème, stoppent un saignement, résorbent un hématome.
- Activité respiratoire: les huiles essentielles décongestionnent les voies respiratoires. Elles accélèrent l'élimination du mucus et fluidifient les sécrétions
- Activité gastro-intestinale, digestive, hépatique, anti-nauséuse: les huiles essentielles stimulent la digestion et stoppent les nausées.
- Activité cutanée: les huiles essentielles favorisent la cicatrisation, la régénération du tissu cutané
- Activité cosmétique: les huiles essentielles luttent contre le vieillissement cutané. Elles sont anti-radicalaires et favorisent la régénération du tissu cutané.
- Aromatisation: à condition de les utiliser à très faible dose (moins de 0,05% en général), les huiles essentielles peuvent parfumer des aliments.

II.5.2. Activités biologiques

Une grande variété de plantes aromatiques comme sont utilisées comme additif alimentaires. Leurs huiles essentielles ont la même spécificité, c'est la présence des composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol qui possèdent une forte activité antibactérienne.

Le carvacrol qui ne présente aucune toxicité, est utilisé comme conservateur et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol principe actif des rince-bouches et l'eugénol utilisé aussi dans les produits cosmétiques, alimentaires, et dentaires.

De plus il a été montré que ces composés ont donné une bonne activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries comme, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacterpyroli* [29,30].

D'autres familles de composés comme les alcools, les aldéhydes et les cétones monoterpéniques (géraniol, linalool, menthol, terpinéol, thujanol, myrcénol, citronellal, néral, thujone, camphre, carvone, etc.), des phénylpropanes (cinnamaldéhyde) et des monoterpènes (γ -terpinène, p-cymène) présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes [31]. Dans ce contexte beaucoup de chercheurs à travers le monde, étudient leurs utilisations en tant qu'agent de conservation puisqu'ils ont des propriétés très intéressantes comme aromatisants naturels dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [31].

La majorité de ces composés sont de très bons fongicides. Parmi eux le thymol, le carvacrol, et l'eugénol qui ont été testé vis à vis d'une large gamme de champignons: *Candida* (*C.albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et d'autres [32,33].

II.5.2.1. Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles a fait l'objet de plusieurs travaux, il a été constaté que cette activité n'est pas attribuée à un mécanisme unique mais à différents sites d'action au niveau cellulaire et ceci est due à leur composition [34]. En générale, le mode d'action des huiles essentielles dépend des caractéristiques hydrophobes des composants actifs des huiles, qui leur donnent la particularité de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne ainsi provoqué un changement de la membrane [35,36]. De même la synthèse de l'ADN, ARN des protéines et des polysaccharides est aussi inhiber par les huiles essentielles [37].

II.5.2.2. Activité antifongique

Les moisissures sont avant tout connues pour leurs effets d'altération des denrées alimentaires. Dans la chaîne alimentaire, les moisissures assurent le rôle de décomposeurs

naturels. La plupart des moisissures sont hétérotrophes, c'est-à-dire que ces organismes fondent leur développement sur l'assimilation de composés organiques produits par d'autres espèces. Afin d'assurer une protection contre ces champignons, les huiles essentielles sont utilisées comme source alternative de protection naturelle dans le secteur agro-alimentaire [38].

La plupart des travaux réalisés dans ce domaine concerne les huiles essentielles des plantes appartenant à la famille des Lamiacées: celles de thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... D'après les résultats obtenue, les phénols tels que l'eugénol, chavicol 4-allyl-2-6- diméthoxyphénol ont la plus intéressante activité antifongique a comparés avec les aldéhydes testés: cinnamique et hydro cinnamique. A l'inverse, les groupements méthoxy sont sans effet fongistatique. Cette activité est suivie par simple observation macroscopique. Il s'est avéré que l'activité antifongique diminue selon le type de fonction chimique: Phénols, Alcools, Aldéhydes, Cétones, Ethers et Hydrocarbures. Parmi eux le cinnamaldéhyde qui est un aldéhyde aliphatique et qui est le plus actif. Concernant les composés phénoliques, l'activité antifongique croît avec l'encombrement stérique de la molécule p-n-propylphénol, thymol, isoeugénol et eugénol [39]. Le pouvoir antifongique augmente après addition d'un groupement alkyls au noyau benzène du phénol.

II.5.3. Activité anti-oxydante

Les huiles essentielles sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour rehausser le goût des aliments [40,41], et la conservation grâce aux effets antioxydants de certains de leurs constituants surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir [42,43].

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles est également attribuée à d'autres constituants autres que les composés phénoliques comme certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes [44,45].

Ces agents naturels viennent réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques qui présentent des effets néfastes sur la santé[46,47]. En effet, l'utilisation des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxytoluènebutilé (BHT), ainsi que l'hydroxyanisolebutilé (BHA) est suspectée à long terme d'effets mutagènes et cancérigènes [48,49].

Une équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'utilisation directe des huiles essentielles sur les

aliments comme la viandes hachées, les légumes hachés, la purée de fruit, yaourts... où la vaporisation sur la surface de l'aliment: viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...les protègent des phénomènes d'oxydation [31].

II.6. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

II.6.1. Les méthodes d'extraction conventionnelles

Plusieurs techniques d'extraction des huiles essentielles et des principes aromatiques végétaux sont à ce jour connues. Toutefois les normes liées à l'utilisation de ces essences limitent en général le choix de la méthode d'extraction.

En effet la localisation histologique des composés aromatiques dans le végétal ainsi que la destination finale du produit extrait peuvent orienter le choix technologique. Les méthodes d'extraction sont adaptées aux propriétés les plus importantes des huiles essentielles : leur volatilité dans l'air et dans la vapeur d'eau et leur solubilité dans les solvants organiques.

II.6.1.1. L'hydrodistillation

La méthode d'extraction des huiles essentielles la plus simple est l'hydrodistillation (**Figure I.2**). Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, ensuite l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Durant l'hydrodistillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'huile essentielle contenue dans les cellules de la plante. La solution aqueuse chargée de composés volatils, diffuse ensuite à travers le tissu de l'organe végétale vers la surface extérieure où l'huile essentielle sera vaporisée. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. À la température d'ébullition, les pressions de vapeurs combinés sont égales à la pression d'évaporation. Ainsi, les huiles essentielles, dont les points d'ébullition varient normalement de 200 à 300 °C, s'évaporent à une température proche de celle de l'eau. Le mélange est ensuite refroidi. L'eau et les HE, une fois condensées, se séparent en deux phases [50]. Le contact du matériel végétal avec l'eau dans cette technique engendre notamment des phénomènes d'hydrolyse. L'hydrodistillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatils d'une plante dans le domaine de la recherche. Le phénomène physique est identique à celui décrit précédemment. Cependant une verrerie adaptée a été mis en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau

sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle. Ces phénomènes ont été rendus possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clevenger [51].

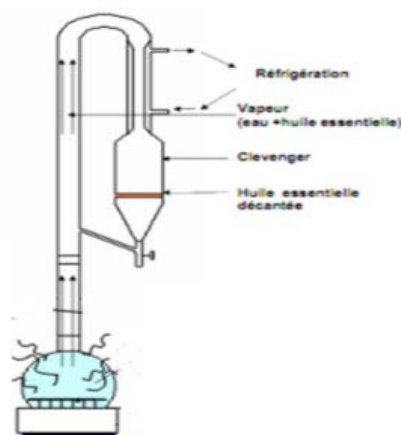


Figure I.2. Montage de l'hydrodistillation au laboratoire (Clevenger)

II.6.1.2. Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle [52].

II.6.1.3. Méthode d'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion, est une co-distillation descendante. Dans ce procédé, le végétal est disposé dans un parallélépipède métallique grillagé. On soumet donc le végétal à une pulsion de vapeur d'eau, saturée et humide, mais jamais surchauffée de haut en bas. La forme de l'appareillage permet une meilleure répartition des charges. La vapeur d'eau emporte avec elle toutes les substances volatiles. L'huile essentielle est recueillie grâce à un collecteur qui permet un équilibre avec la pression atmosphérique. On peut aussi préciser qu'il y a un procédé decohabation qui renvoie dans la chaudière toutes les eaux qui sont séparées des huiles[53].

II.6.1.4. Extraction aux solvants volatils

Cette technique est utilisée avec des fleurs ne supportant pas la chaleur, les solvants très volatils par exemple l'éther et l'hexane qui s'évaporent facilement à basse température sont employés. Les végétaux sont placés dans d'énormes cuves en acier appelées extracteurs et soumis à des lavages successifs aux solvants qui se chargent ainsi de leur parfum. Après décantation et filtration, le solvant est évaporé afin d'obtenir une sorte de pâte fortement odorante appelée concrète. Après une série de lavages à l'alcool dans des batteuses mécaniques et de glaçages, la concrète donne naissance à une essence pure appelée absolue [54,56].

II.6.2. Méthodes d'extraction 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.

II.6.2.1. Extraction par des solvants supercritiques

C'est une nouvelle technologie utilisée industriellement qui fait encore l'objet de nombreuses recherches. L'originalité de cette technique repose sur le comportement du solvant utilisé sous des conditions particulières puisque au-delà d'un certain point, dit point critique, caractérisé par une température (T_c) et une pression (P_c), les corps purs se trouvent dans un état particulier dit supercritique. Dans leurs conditions d'utilisation, les fluides supercritiques ont une masse volumique voisine de celle des liquides, une viscosité proche de celle des gaz et une diffusivité intermédiaire ; leur polarité est modifiée par rapport à l'état liquide. Leur pouvoir dissolvant dépend fortement de la température et de la pression[57].

Le fluide supercritique le plus utilisé est le dioxyde de carbone [58]. Le CO₂ est thermodynamiquement stable, insipide, inodore et incolore, il est ininflammable mais peut être asphyxiant à haute concentration. Son point critique est de $P_c = 73,6$ bar et $T_c = 31,4$ °C. Dans cet état, l'extrait devient insoluble dans le CO₂ et précipite au fond de l'enceinte. Le gaz carbonique est ensuite liquéfié et peut être à nouveau utilisé.

L'extrait récupéré ne contient aucune trace de solvant résiduel qui est facilement éliminé sous forme gazeuse. Le CO₂ est ensuite recyclé et ramené à l'état supercritique. Afin d'extraire les composés les plus volatils dont la composition est de type «*huiles essentielles* »,

on utilise des pressions d'extraction modérées (entre 80 et 100 bar). A des pressions plus élevées (200 à 280 bar), on extrait également des composés plus lourds dont la composition est de type « *concrètes* ». Evidemment selon les conditions opératoires, on peut en théorie obtenir tous les extraits intermédiaires. Le rendement est alors beaucoup plus élevé. Les extractions sont rapides ; il faut compter environ 90 min pour extraire 500 g de matière végétale [59].

Le CO₂ étant une molécule apolaire, il extrait préférentiellement les composés apolaires. Cependant, à des pressions élevées, la polarité du CO₂ augmente et il va extraire des composés de plus en plus polaires [60]. Étant donné que l'on chauffe très peu la matière première, les composés thermosensibles et hydrolysables ne sont pas dégradés. Cependant, le CO₂ présente une certaine acidité, il peut se former de l'acide carbonique, pouvant entraîner une légère hydrolyse acide. L'extrait obtenu par extraction au CO₂ supercritique est un des extraits qui se rapproche le plus de la matière première [59].

L'extraction au CO₂ supercritique entièrement « verte » semble être viable avec l'ajout de co-solvants qui sont introduits à l'aide d'une pompe à débit constant. L'éthanol et l'eau sont les plus utilisés à cause de leurs polarités comme co-solvants/réactifs intermédiaires, et l'eau dans le domaine compris entre le point d'ébullition et les conditions supercritiques. Ainsi, l'extraction est moins sélective, plus de composés sont extraits, le rendement en est amélioré. D'autres solvants peuvent être utilisés. Cependant, leur utilisation supprime certains avantages majeurs rencontrés lors de l'utilisation du CO₂. En effet, avec un co-solvant, il est possible de perdre des composés volatils lors de l'étape de concentration [60,61]. L'appareillage est assez coûteux car il doit pouvoir supporter des pressions allant jusqu'à 300 bar en toute sécurité et permettre ainsi un éclatement des poches à essence et un entraînement des substances aromatiques.

L'extraction aux fluides supercritiques, le plus souvent du CO₂, permet d'extraire des substances odorantes peu volatiles et plus particulièrement les matières sèches qui sont récalcitrantes aux méthodes d'extraction traditionnelles. De ce fait, elle a été utilisée pour extraire les composés aromatisants de nombreux aliments comme des épices [62], du riz [63], diverses boissons [64] et du café [65].

Autre avantage, ce gaz ne pollue pas et est inoffensif car il est recyclé à l'intérieur du système.

Les huiles essentielles extraites de cette manière ont l'avantage d'éviter la dégradation thermique associée à la distillation à pression atmosphérique. L'avantage, bien sûr, c'est qu'aucun résidu de solvant ne reste, puisque, aux pressions et températures normales, le CO₂

revient simplement à l'état gazeux et s'évapore. L'extraction aux fluides supercritiques est donc une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives (méthode d'extraction plus complète et moins dégradante). Le développement de cette technologie continue à s'appuyer sur des traitements et/ou des produits qui n'affectent pas l'environnement et les consommateurs. Le changement des températures et/ou des pressions réduites des fluides critiques offre une profusion d'opportunités, dont un excellent exemple est constitué par l'état critique relatif de l'eau. Par exemple, l'eau sous-critique fournit, légèrement au-dessus de son point d'ébullition, un milieu unique imitant celui des solvants organiques polaires, qui a même été utilisé pour l'extraction des solutés thermiquement labiles ou dans la chimie réactionnelle [61,66].

II.6.2.2. Extraction assistée par ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz). Les ultrasons de puissance fonctionnant à une intensité entre 20 et 100 kHz sont utilisés pour l'extraction des arômes et bien d'autres molécules des plantes.

Le bac ou la sonde à ultrasons sont les deux types d'équipements couramment utilisés dans les laboratoires. Lorsque les ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation des zones de compression et de dépression (raréfaction).

Quand les cycles de raréfaction augmentent, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation apparaissent. Ce phénomène est appelé cavitation. Les bulles vont imploser à côté de la surface solide (le matériel végétal) et provoquer la rupture des membranes des cellules qui libèrent leurs contenus à l'extérieur[67]. Puisque les glandes des huiles essentielles sont généralement présentes à la surface des plantes aromatiques, l'implosion des bulles de cavitation détruit les glandes qui libèrent l'HE dans le milieu environnant [68].

La technologie aux ultrasons prend beaucoup d'ampleur dans le domaine agroalimentaire [69,70]. Elle permet de pallier à certains problèmes rencontrés par la distillation conventionnelle telle que la dégradation thermique due aux températures élevées, la grande consommation d'eau, les longues durées d'extraction et les rendements faibles [71].

II.6.2.3. Hydrodistillation assistée par micro-ondes

Les micro-ondes constituent, par ailleurs, une méthode d'extraction en plein développement. Cette méthode permet de réaliser des extractions du matériel végétal frais à pression atmosphérique, sans ajout d'eau ou de solvant. Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes. Le chauffage interne de l'eau intrinsèque de la plante permet de dilater ses cellules et provoquer la distillation azéotrope d'un mélange d'eau/huile essentielle. Un système réfrigérant situé à l'extérieur du four à micro-ondes permet la condensation du distillat en continu, puis le mélange est dirigé dans l'appareil de Clevenger où les composés aromatiques sont obtenus par simple séparation de phase. L'excès d'eau est réintroduit dans le réacteur de manière à restaurer la quantité d'eau initialement présente dans la plante. Comparée à la distillation traditionnelle, l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes permet d'obtenir une huile essentielle similaire de point de vue qualitative et quantitative en une durée d'extraction plus courte. Toutefois, l'extraction des composés oxygénés, de valeurs odorantes plus significatives que les monoterpènes est favorisée [72].

II.6.2.4. Extraction par solvant assistée par micro-ondes

La méthode d'extraction par solvant assistée par micro-ondes a été mise au point par l'équipe canadienne de Paré et al. [73]. Celle-ci a déposé le premier brevet européen sur « l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes ». Ces auteurs proposaient de traiter sous micro-ondes un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant partiellement ou totalement transparent aux micro-ondes qui permettent d'accélérer la cinétique d'extraction et de réduire le ratio solvant/charge.

Des essais effectués par cette nouvelle technique - notamment sur la menthe -, ont souligné le gain de temps ainsi que la similitude de la qualité des produits à ceux obtenus par entraînement à la vapeur classique. De nombreux brevets seront déposés alors par Paré et son équipe tant au niveau américain qu'au niveau européen [74,75]. Le procédé original sera par la suite quelque peu modifié et enrichi et sera dénommé : MAP (Microwave Assisted Process). Il a pour vocation d'être une méthode d'extraction utilisable pour un grand nombre de matrices solides ou liquides telles que les végétaux mais aussi les tissus animaux, les sols, les cosmétiques ou les eaux polluées. Actuellement l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave Assisted Extraction) est actuellement très généralement citée dans la littérature [76]. En réalité, la MAE et MAP sont toutes deux des techniques d'extraction par

solvant assistée par micro-ondes. A titre d'exemple, un pilote d'extraction des épices et aromates par la technique MAPTM est présenté dans la **Figure I.3**.

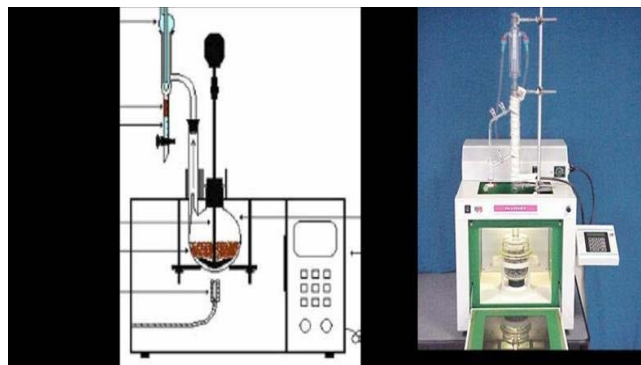


Figure I.3 : Schéma de l'extraction par solvant assistée par micro-ondes.

II.6.2.5. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM)

En 2004, une méthode originale d'extraction des produits naturels assistée par micro-ondes à pression atmosphérique, sans solvant et sans eau a été développée et brevetée par Chemat et coll. [77,78]. Basée sur un principe relativement simple, cette méthode décrit une distillation sèche assistée par micro-ondes qui consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes contenant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite à partir de l'eau de la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal.

La distillation sèche assistée par micro-ondes, a été appliquée à deux types essentielles obtenus par ESSAM sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation. D'un point de vue qualitatif, on retrouve dans les huiles essentielles obtenues par ESSAM une proportion plus importante de composés oxygénés, les plus valorisables sur le plan olfactif de plantes, les épices [79] et les herbes aromatiques [80]. Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction les rendements en huiles.

II.6.2.6. Entraînement à la vapeur assisté par micro-onde

Cette technique est basée entièrement sur le principe de l'entraînement à la vapeur d'eau classique qui consiste à placer une partie du montage dans le four à micro-ondes. Le ballon rempli d'une quantité d'eau suffisante disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. La matière végétale et le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des huiles essentielles sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à l'entraînement à la vapeur d'eau classique [81].

II.7. Méthodes d'analyses des huiles essentielles

La séparation de ces mélanges naturels obtenus par extraction (huiles essentielles et extraits) s'effectue en général par la chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour les volatiles (mono- et sesquiterpènes) et par la chromatographie en phase liquide (HPLC) pour les composés non volatiles.

III.7.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est préférentiellement utilisée dans le cas des molécules naturellement volatiles comme celles qui sont naturellement présentes dans les huiles essentielles (mono et sesquiterpènes, certains diterpènes hydrocarbonés, phénylpropanoïdes,...). Elle peut être utilisée avec des molécules plus lourdes (stéroïdes, triterpènes,...) en utilisant une température isotherme élevée (CPG haute température CPGHT). Ces molécules lourdes peuvent également être rendues volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition par des réactions de dérivation (acétylation, silylation) [82]. Encore faut-il s'assurer que la réaction de dérivation soit complète pour toutes les molécules et qu'il ne se produit pas d'artefacts (énolisation d'une cétone suivie de silylation de l'énol par exemple).

Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne (**Figure I. 17**) et transporté par une phase mobile gazeuse (gaz vecteur) à travers une phase stationnaire (liquide ou solide). Les différentes molécules du mélange se séparent et sortent de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps dépendant de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel « le détecteur ». Il évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux et envoie un signal électronique vers un enregistreur.

En effet, les temps de rétention enregistrés peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. L'identification d'une substance peut donc être facilitée par la connaissance de son temps de rétention qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. En effet, les temps de rétention de chaque composé dépendent des conditions expérimentales.

Une meilleure information peut être obtenue grâce à l'utilisation des indices de rétention, calculés sur deux colonnes de polarité différente, ils sont plus fiables que les temps de rétention c'est-à-dire moins soumis aux conditions opératoires. Ils sont calculés à partir d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires.

Le calcul peut se faire pour une expérimentation à température constante par interpolation logarithmique : indices de Kovats (IK) [83], ou en programmation de température par interpolation linéaire indices de Van Den Dool et Kratz(Ir) [84].

Bien que dans la grande majorité des cas, chaque molécule possède des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire qui lui sont propres, deux molécules peuvent fortuitement co-éluer et présenter des indices de rétention identiques. Par ailleurs, on observe fréquemment pour un même composé des écarts d'indice de rétention pouvant atteindre 10 et même 20 unités, entre les données de la littérature et celles du laboratoire surtout sur colonne polaire et ce pour les molécules les plus polaires qui sont éluées en dernier [82]. De meilleurs résultats sont obtenus quand les produits de référence et les mélanges naturels à analyser, sont traités rigoureusement dans les mêmes conditions expérimentales, c'est-à-dire lorsque les indices des composés de référence sont mesurés au laboratoire.

Cette technique de séparation fait partie des plus utilisées, car elle permet l'individualisation des constituants avec des échantillons en quantité inférieure au milligramme. De plus, elle permet une grande adaptabilité par un grand choix de phases stationnaires, de températures (isotherme ou programmée) et de débit de phase mobile celle-ci pouvant être l'hélium, l'argon, l'azote, le dioxyde de carbone ou l'hydrogène. Cependant, l'identification des constituants d'un mélange est difficilement réalisable uniquement par CPG. En effet, le temps de rétention, propre à chaque composé qui dépend des conditions opératoires (nature de la phase stationnaire, programmation de la température, vieillissement de la colonne, etc.), ne représente pas une base suffisante pour une identification.

Ainsi, dans le but de rendre fiable l'identification des constituants des huiles essentielles, divers couplages de la CPG avec des techniques spectroscopiques ont été développés.

II.7.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS)

D'un point de vue analytique, d'important progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec des appareils tels que le spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG-SM en mode impact électronique (IE), dite CPG-SM(IE), est la technique utilisée en routine dans le domaine des huiles essentielles.

Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Ce procédé permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées construites au Laboratoire ou commerciales [85]. Cependant, il faut utiliser les bibliothèques commerciales avec précaution, car bien que très utiles, elles ne sont pas les plus performantes. En effet, compte tenu de la diversité et du nombre très important de composés qu'elles contiennent, il est très rare qu'une interrogation n'obtienne pas de réponse, même si cette proposition d'identification est attachée à une note de concordance très moyenne. C'est pourquoi, les bibliothèques de spectres élaborées au Laboratoire, avec des spectres de masse enregistrés dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques, demeurent les plus performantes et permettent des identifications plus fiables. Ceci est particulièrement vrai pour l'analyse des huiles essentielles comprenant un grand nombre de sesquiterpènes, qui, construits à partir d'un même synthonisoprénique, présentent des spectres de masse souvent identiques ou insuffisamment différenciés.

Dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles [86].

Dans le cas des huiles essentielles riches en sesquiterpènes et diterpènes, des problèmes d'identification peuvent subsister même si on utilise la SM-IE associée aux indices de rétention mesurés sur deux colonnes de polarité différente. Des informations complémentaires peuvent être obtenues avec des techniques « d'ionisation douce » telles que l'ionisation chimique positive (ICP) ou l'ionisation chimique négative (ICN) [87]. Ce mode d'ionisation douce permet de différencier certaines molécules (des esters par exemple), par l'observation des pics moléculaires, quand ceux-ci ne sont pas visibles en mode impact électronique. Plus précisément, il s'agit des ions quasi moléculaires $[M+H]^+$ et $(M+H)^-$. L'observation de ces ions donne accès à la masse molaire des composés. Aussi,

certain auteurs ont utilisé la SM(ICP) afin de différencier certains alcools des esters correspondants par l'observation de leurs pics moléculaires. Il faut signaler qu'en SM(IE), ces molécules peuvent perdre soit une molécule d'eau soit une molécule d'acide acétique et présenter des spectres de masse identiques [87]. L'examen des fragmentations fournit également des informations sur la structure des molécules. Ainsi, les quatre stéréoisomères de l'isopulégol sont différenciés sur la base de leurs spectres de masse obtenus en utilisant l'isobutane comme gaz réactif [88]. De même, la connaissance de ces ions MH^+ , MH^- et des adduits $[M+CH_4]^+$, $[M+NH_4]^+$ a permis l'identification des esters de thymyle, de néryle, de bornyle et de lavandulyle dans l'huile essentielle d'*Eupatorium cannabinum*, l'ammoniac ou le méthane étant employés comme gaz réactif [89]. Divers sesquiterpènes ont pu être identifiés en utilisant ces techniques d'ionisation douces [87]. La SM(ICN) s'est révélée efficace pour déterminer la masse de certaines substances soufrées [90].

Toutefois, cette technique a montré ses limites pour l'identification de molécules ayant des structures voisines. Ainsi, le nérol et le géraniol qui ne diffèrent que par la stéréochimie d'une double liaison, présentent des spectres de masse ICN identiques [91]. Cette non sélectivité occasionnelle, associée à la difficulté d'obtention des spectres reproductibles quand ils sont enregistrés dans différents laboratoires, fait que la SM(ICN) ou la SM(ICP) n'ont pas connu un essor considérable. En fait, cette technique d'ionisation douce doit donc surtout être considérée comme une technique complémentaire de la SM(IE) pour l'identification des constituants des huiles essentielles [92].

III. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules nécessaires à la défense de la plante contre les agressions extérieures. Ils sont produits en très faible quantité, et présentent une grande variété structurale (plus de 200 000 structures définies) [93].

Les métabolites secondaires comportent:

- Les huiles essentielles, c'est-à-dire les composés terpénoides et leurs dérivés
- Les composés phénoliques ou aromatiques: tanins, quinones, coumarines, flavonoïdes
- Les composés azotés : alcaloïdes

III.1. Les Polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits [94,95].

Les polyphénols sont des produits de la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A et de phénylalanine. Cette biosynthèse a une multitude d'activités biologiques dépendant de sa structure chimique. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules [96,].

III.1.2. Les principales classes des composés phénoliques

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base, le phénol. Deux principales classes sont largement répandues :

- Flavonoïdes
- Tanins et lignines

III.1.2.1 Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet plus de 6500 structures ont été identifiées [96-99].

III.1.2.2. Les Tanins

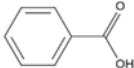
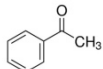
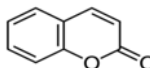
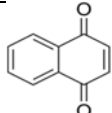
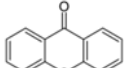
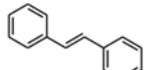
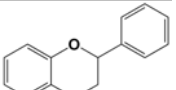
Le terme " Tanin " (ou Tannin) vient du mot tannage. Les tanins sont des composés poly-phénoliques hydrosoluble ayant une masse moléculaire entre 500 et 3000, et qui présentent, à côté des réactions des phénols des propriétés de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [99,101].

III.1.3. Classification des polyphénols

D'après Motilva et coll. [103], il n'existe pas de classification universelle de polyphénols. De nombreux auteurs ont donc proposé leur propre segmentation. Par exemple, Crozier et coll. [104] ont séparé ces composés en deux catégories : les non flavonoïdes et les flavonoïdes.

MANACH et coll. [105] distinguent six sous classes de flavonoïdes. Cette classification des CP est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyau aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux (**tableau I.1**).

Tableau I.1: Les principales classes des composés phénoliques [101].

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acide phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	Acétophénonnes	Gallacétophénonnes	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiférine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

III.2. Les activités des polyphénols

III.2.1. Activités biologiques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs divers propriétés physiologiques comme : Les activités antiallergiques, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépato-protective, Antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anticarcinogénique, anti-thrombotique, cardioprotective et vasodilatatoire [106,107].

III.2.2. Activité Antioxydante

L'oxydation est l'un des processus les plus producteurs des radicaux libres dans les aliments et les tissus vivants. Ces radicaux causent des dégradations majeures dans les macromolécules et l'acide nucléique [108].

III.3. Méthodes d'extraction des polyphénols

Pour parvenir à des extraits riches en polyphénols, il est important de développer des méthodes d'extraction efficaces conduisant à des rendements élevés. Le choix de la méthode d'extraction et l'optimisation de ses paramètres ont fait l'objet de nombreuses études[109,110]. Des méthodes conventionnelles et non-conventionnelles sont utilisées pour extraire les polyphénols sous des conditions d'extraction sans cesse améliorées.

III.3.1. Méthode d'extraction conventionnelle

La macération; extraction solide-liquide a été très utilisée depuis longtemps mais reste d'actualité même si elle est souvent critiquée pour son long temps d'extraction (quelques heures) et sa température élevée (supérieure à 80°C) [111,112]. Des chercheurs continuent à améliorer cette technique en faisant varier les paramètres d'extraction (type de solvant, rapport liquide / solide, etc.) afin de réduire le temps d'extraction et la température.

III.3.2. Méthodes non-conventionnelles

L'introduction de méthodes non conventionnelles comme les ultrasons et les micro-ondes dans la technologie alimentaire a révolutionné l'extraction en réduisant significativement le temps d'extraction et en augmentant le rendement [113,114]. Depuis les années 80, ces techniques connaissent en continu des profonds changements qui améliorent sans cesse leur efficacité, rapidité et sélectivité. Ce sont des méthodes innovantes protectrices de l'environnement utilisant moins de solvants et consommant moins d'énergie.

III.3.2.1.Extraction assistée par ultrasons

L'utilisation d'ondes à ultrasons (au-delà des 20 KHz) pour chauffer la matrice augmente la surface de contact entre les phases solide et liquide par effet mécanique de ces ondes, ce qui permet une grande pénétration du solvant dans les parois cellulaires améliorant ainsi le transfert de masse. Sous l'effet de cavitation des cellules dû à l'influence des ondes à ultrasons qui perturbent les parois cellulaires, une implosion de ces cellules se produit permettant la libération de leur contenu. L'efficacité de rupture des cellules et le transfert de

masse permettent de réduire le temps d'extraction ce qui donne une bonne performance à cette technique [113]. De plus, la qualité des extraits est assurée par la préservation des composés les plus thermolabiles comme les polyphénols, de toute dénaturation chimique soumise à l'influence efficace mais courte de ces ondes[115]. Cette technique a permis d'extraire les composés phenoliques et les acides phenoliques [116-118].

III.3.2.2.Extraction assistée par microondes

L'extraction par micro-ondes fonctionne sur le principe du chauffage de l'intérieur vers l'extérieur de la matrice sous l'action d'ondes électromagnétiques (fréquences les plus utilisées 2450 MHz). Le chauffage par l'intérieur de l'humidité des cellules par les micro-ondes produit une énorme pression sur les parois cellulaires conduisant à la destruction de ces parois et facilitant ainsi l'accès et la libération des molécules qui seront extraites sous l'effet du solvant chauffé par la vapeur chaude dégagée de l'intérieur de la matrice [116]. Le chauffage de la matrice à l'intérieur et à l'extérieur sans gradient thermique donne de nombreux avantages à l'extraction par micro-ondes ; un temps d'extraction plus court (quelques minutes), moins de solvant utilisé, une vitesse d'extraction rapide et une polarité limitée de l'agent extractant [119].

VI. Méthodes d'analyse des polyphénols

Différentes méthodes d'analyse existent pour les polyphénols et flavonoïdes, elles vont de la chromatographie liquide (LC)[118] à l'électrophorèse capillaire (CE) [119] passant par la résonance magnétique nucléaire (RMN)[120]. Compte tenu de la complexité des extraits des polyphénols et flavonoïdes obtenus en fin d'extraction et avant l'analyse par les techniques chromatographiques les plus utilisées, une étape de préparation de l'extrait s'impose pour la séparation sélective des différentes familles des polyphénols et flavonoïdes, pour l'élimination de certains interférents et aussi pour l'augmentation de la concentration de l'analyte améliorant sa sensibilité à l'analyse[121]. Plusieurs techniques de séparation sont utilisées comme la technique de séparation sur couches minces (TLC), la séparation par filtration ou la séparation sur colonne remplie de phase spécifique. D'autres techniques de séparation ont été développées et sont largement utilisées telles que l'extraction en phase solide (SPE).

VI.1. Analyse par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Introduite dès 1970, elle est utilisée pour l'analyse de toutes les familles des polyphénols et flavonoïdes sanctionnée par les nombreuses applications publiées à ce jours [122,123,124]. Elle fonctionne sur la base d'une phase stationnaire solide constituée de fines particules (de la colonne) et d'une phase mobile liquide (solvant d'élution). Simple d'utilisation, elle offre l'avantage d'être reproductible et d'avoir la possibilité de travailler sur une vaste gamme de phases stationnaires commerciales et disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté. La HPLC offre aussi la possibilité de couplage avec d'autres techniques chromatographiques et/ou avec des systèmes de détection. Les systèmes de détection les plus utilisés sont les détections ultraviolet-visible (UV-vis), la fluorescence, à barrette de diode ou photodiode (DAD ou PDA) et électrochimique etc. Le plus souvent pour les flavonoïdes à cause de leur absorbance dans le domaine du visible, l'analyse se fait par HPLC-UV-vis avec un détecteur du type monocanal permettant l'injection de l'extrait à une seule longueur d'onde fixée ce qui nécessite la réinjection de l'extrait à d'autres longueurs d'ondes. Malgré cet inconvénient majeur la technique HPLC/UV reste d'actualité pour la détermination des composés phénoliques [125]

VI.1.1. HPLC/PDA

La détection UV-visible à un seul canal étant limitée, l'avancée technologique a permis l'apparition des détecteurs multicanaux plus performants comme les détecteurs à barrette de diode offrant l'avantage de détecter simultanément à plusieurs longueurs d'onde et sur une large gamme de spectres mono et poly chromatiques (photodiode) en une seule injection de l'extrait. La HPLC-PDA offre aussi la possibilité de quantification parce que la détection est réalisée à la longueur d'onde d'absorption maximale du composé en question. Pour les familles des flavonoïdes comme les flavanols, flavonols et les anthocyanes, molécules absorbants respectivement à 280, 320 et à 520 nm, l'acquisition spectrale (chromatogramme et spectre UV) est obtenue individuellement pour chaque longueur d'onde

VI.1.2. Couplage HPLC-MS

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) est le couplage des techniques le plus utilisé depuis la fin du 20ème siècle à ce jour [126,127]. La MS est la méthode la plus sensible dans l'analyse moléculaire ; elle est dotée d'un important pouvoir de séparation de masse avec une bonne sélectivité. Malgré ces performances connues

dans l'analyse des métabolites secondaires des plantes, le couplage LC-MS présente trois problèmes majeurs : la concentration de l'effluent de la colonne introduit dans la chambre d'ionisation, la composition de l'éluant et le type de composés à analyser. Pour pallier à ces problèmes, des interfaces ont été développées permettant d'accomplir la nébulisation et la vaporisation du liquide, l'ionisation de l'échantillon, l'élimination de l'excès de vapeur du solvant et l'extraction des ions dans l'analyseur de masse. Parmi les interfaces développées il y a la TPS (thermospray), CF-FAB (continuous-flow fast-atom bombardment), l'ESI (electrospray ionization) et l'APCI (atmospheric pressure chemical ionization)[128]. L'ESI et l'APCI sont les plus couramment utilisées, elles génèrent presque la totalité des ions moléculaires y compris les plus petits métabolites de plante comme les flavonoïdes.

VI.1.3. ESI-MS

A l'heure actuelle c'est l'ESI (ionisation par électro nébulisation ou électrospray) (figure III.17) qui est la plus utilisée pour l'analyse des flavonoïdes à cause de la facilité qu'a cette technique à ioniser les composés polaires et non volatiles qui sont les deux caractéristiques des composés flavonoïdes. La détection d'ion moléculaire peut être protonée $[M+H]^+$ en mode d'ionisation positif et déprotonée $[M-H]^-$ en mode d'ionisation négatif. Pour les familles de flavonoïdes les deux modes ont été utilisés, avec néanmoins une préférence pour le mode positif pour les anthocyanes. Ce mode est idéalement choisi par de nombreux travaux [63] à cause de leur présence sous forme de cation flavylum dans les conditions acides (phase mobile acidifiée), il permet la production idéale de l'ion moléculaire M^+ lors de l'ESI avec des rendements importants.

1. P.G. Rossi, L. Bao, A. Luciani, J. Panighi, J.M. Desjobert, J. Costa, J. Casanova, J.M. Bolla, L. Berti. 2007. (E)-Methyl isoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oils against *Campylobacter jejuni*. *J. Agric. Food. Che*, (55), 7332-7336.
2. M. Staniszewska, J. Kula. (2001). Composition of the essential oil from Wild carrot umbels (*Daucus carota* L. ssp. *carota*) Growing in Poland. *J. Essent. Oil Res*, (13), 439-441.
3. M.A. Dib, N. Djabou, J.M. Desjobert, H. Allali, B. Tabti, A. Muselli, J. Costa. (2010). Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Headspace Solid Phase Micro extraction as alternative technique to Hydrodistillation. *Chem. Cent. J*, 4:16.
4. A. Lanfranchi, H. Laouer, M. El Kolli, S. Prado, C. Maulay-Bailly, N. Baldovini. (2010). Bioactive Phenyl propanoids from *Daucus crinitus* Desf. from Algeria. *J. Agric.Food. Chem*,(58), 2174-2179.
5. H. Marzouki, A. Khaldi, D. Falconieri, A. Piras, B. Marongiu, P. Molicotti, S. Zanetti. (2010). Essential Oils of *Daucus carota* subsp. *carota* of Tunisia Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *Nat. Prod. Commun*, (5), 1955-1958.
6. T. Smaili, A. Zellagui, P.L. Cioni, G. A. Flamini. (2010). myristicin-rich essential oil from *Daucussahariensis* growing in Algeria. *Nat. Prod. Commu*,(6),883-886.
7. A. Jabrane, H. Ben Jannet, F. Harzallah-Skhiri, M. Mastouri, J. Casanova, Z. Mighri. (2009). Flower and Root Oils of the Tunisian *Daucus carota* L. ssp. *maritimus* (Apiaceae): Integrated Analyses by GC, GC/MS, and P ¹³PC-NMR Spectroscopy, and *invitro* Antibacterial Activity. *Chem. Biodivers*, (6), 881-889.
8. R. Gulland, (1923). *J. Chem. Soc.* 9T 9TLondon. 9T (9T23):980. THESE P
9. M. Gates, G. Tschudi. (1952). The synthesis of morphine. *J of the Amerc Cheml Soc J.* 74. (4): 1109-1110.
10. J. D. Mc Chesney, S.K. Venkataraman, J.T. Henri. (2007). Plant natural products: back to the future or into extinction. *Phychem J.* 68 (14): 2015-2022.
11. J. Bruneton. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. Paris: 2ème édition TecDoc. . p.387-402. These (2)
12. A. Fahn. *Secretory tissues in plants* 1979, London: Academic Press.
13. A. Fahn. *Tansley Review No. 14 Secretory tissues in vascular plants*. (1988). *New Phytol.* 108: p. 229-257.
14. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. (2008). Biological effects of essential oils. a review. *Food and cheml toxicol.* 46 (2): 446-475. These p
15. K.P. Svoboda, J.B. Hampson. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperatearomatic plants: antibacterial, antioxydant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department*, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW, p. 1 -17. These 2
16. C. Besombes. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Université de La Rochelle.
17. J. Bruneton. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 1999, Paris: Ed. (3) Techniques et documentation.
18. F. Bakkali. et al. (2007). Biological effects of essential oils - A review, *Food Chem. Toxicol.* 46(2): p. 446-475.
19. L.S. N. de Padua. (1999). Bunyapraphatsara, and R.H.M.J. Lemmens, *Plant Resources of South-East Asia*, No. 12 (1). *Medic and Poison Plan*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers.

20. W. Herz, V. H. Heywood, J. B. Harbone, B. L. Turner. (1977). *The biology and chemistry of the Compositae*. Academic Press, London, Chapter 11: p. 337.
21. M. Baranska. et al. (2005). Chemotaxonomy of aromatic plants of the genus *Origanum* via vibrational spectroscopy *Anal. Chim. Acta*, 381(6): p. 1241 -1247.
22. J.H. Langenheim. (1990). Plant resins. *Am. Scientist*. 78: p. 16-24.
23. M. Mark, N.B. Ghyselinck. (2009). Effets de la vitamine A sur la spermatogénèse. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie*, 11(3): p. 215-26.
24. G. Ourisson, P. Grabbé. (1961). Les triterpènes tétracycliques. Hermann Ed 194.
25. P.V. Nielsen, R. Rios. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int. J. Food Microbiol.* (60): 219-229.
26. A. Lamiri, S. Lhaloui, B. Benjilali, M. Berrada. (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola Destructor* (Say). *Fiel Crop Resea.* (71): 9- 15.
27. K. AL. Cimanga. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J of Ethno pharcolo.* (79): 213-220.
28. L.A. Anderson, J.B. Gross. (2015). Department of Perioperative Nursing, University of Connecticut School of Medicine, Farmington, 06030- USA. 19 (1):29-35.
29. A. Pauli. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* (11): 126- 133.
30. D. Fabian, M. Sabol, K. Domaracké, D. Bujnéková. (2006). Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol. in vitro* (20): 1435-1445.
31. S. Burt. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International. J of Food Micro.* (94): 223-253.
32. D. Kalembe, A. Kunicka. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* (10): 813-829.
33. C.O. Pérez-Alfonso, D. Martínez-Romero, P.J. Zapata, M. Serrano, D. Valero, S. Castillo. (2012). The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *Int J of Food Micro.* (158): 101-106.
34. S. Caillet, M. Lacroix. (2007). Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
35. C.F. Carson, B.J. Mee, T.V. Riley. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Anti Age. Chem.* 46 (6): 1914-1920.
36. S.D. Cox, C.M. Mann, J.L. Markham. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol.* (88): 170-175.
37. P.A. Cox, S.A. Banack. (1991). Islands, plants, and Polynesians: An introduction to Polynesian ethnobotany. Dioscorides Press, Portland, Oregon. *Poly herba medc.* 147-168.

38. M. Lis-Balchin. (2002). Geranium and pelargonium: the genera Geranium and Pelargonium. CRC Press, Taylor & Francis, London. 116-131, 147-165, 184-217.
39. A. Ultee, M.H. Bennik, R. Moezelaar. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Envi Micro*. (68): 1561-1568.
40. C. Blaquière, V. Ferrari, I. Girod-Quilain. (2006). 'Les Arômes Alimentaires: Les Bases de la Réglementation Européenne', *Ind Alim et Agric*. 123. (6).
41. G. Sacchetti, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice, R. Bruni. (2011). 'Comparative Evaluation of 11 Essential Oils of Different Origin as Functional Antioxidants, Antiradicals and Antimicrobials in Foods'. *Food Che*, (91): 621- 632.
42. S.J. Lee, K. Umamo, T. Shibamoto, K.G. Lee. (2005). Identification of Volatile Components in Brasil (*Ocimum Basilicum* L.) and Thyme Leaves (*Thymus Vulgaris* L.) and Their Antioxidant Properties. *J. Agric. Food.Che*. 91 (1): 131-137.
43. B. Shan, Y.Z. Cai, M. Sun, H. Corke. (2005). Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of their Phenolic Constituents. *J of Agric and Food Chem*. 53 (20): 7749-7759.
44. H.J. Kim, F. Chen, X. Wang, H.Y. Chung, Z. Jin. (2005). 'Evaluation of Antioxidant Activity of Vetiver (*Vetiveria Zizanioides* L.) Oil and Identification of its Antioxidant Constituents'. *J of Agric and Food Chem*. (53): 7691- 7695.
45. B. Tepe. (2008). Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of the Methanolic Extracts of *Salvia Virgate* (Jacq), *Salvia Staminea* (Montbret & Aucher Ex Benth) and *Salvia Verbenaca* (L.) from Turkey. *Bio resource Techno*. 6. (99): 1584-1588.
46. R.F.M. Ali. (2011). Antioxidative Effects of Pomposia Extract, on Lipid Oxidation and Quality of Ground Beef during Refrigerated Storage. *Amer J of Food Techno*.1 (6): 52- 62.
47. M.G. Miguel. (2010). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils. A Short Review', *Molecules*. 12 (15): 9252-9287.
48. R.H. Olmedo, V. Nepote, N.R. Grosso. (2012). Aguaribay and Cedron Essential Oils as Natural Antioxidants in Oil-Roasted and Salted Peanuts. *Journal of the Amer Oil Chem' Soci*. 12 (89): 2195-2205.
49. N. Mimica-dukic. (2003). Aromatic Plants as Dietary Supplements in Human Health. (14): 13-18.
50. K. H. C. Baser, G. Buchbauer. (2010). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Boca Raton: CRC PressTaylor Francis.
51. J.F. Clevenger. (1912). Apparatus for the determination of volatile oil. *The J of the Amer Pharma Assoc*, 17(4), 345-349, 1928.
52. M. Nixon, M. McCaw. (2001). The Compleat distiller. New Zealand: The Amphora Society.
53. R.O.B. Wijesekara, C.M. Ratatunga. K. Durbeck. (1997): The distillation of essential oils. Manufacturing and plant Construction Handbook. Eschborn, Federal Republic of Germany, Protrade, Department of foodstuffs Agriculturak Products.
54. M. Wilson. (2010). Huiles essentielles pour la cuisine et le bien-être. Montréal: Fides.

55. M. Perrut. (1999) : Extraction par fluide supercritique. Les techniques de l'ingénieur. J 2 770.
56. P. Pellerin. (1991). Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. *Perfum. Flav.*16, 37 – 39.
57. P. Pellerin. (2001) : Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Ann. Fals. Exp. Chim.* V. 94, N°954 – pp : 51-62.
58. E. Anklam. H. Berg, L. Mathiassin, Sharman, M. F. Ulberth. (1998). Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review. *Food addit. Contam.*, 15,729 – 750.
59. J.W. King. (2004): Critical fluid technology for the processing of lipid-related natural products. *Compt Rend Chim*, Vol. 7, pp: 647 – 659.
60. C. Duarte, M. Moldao-Martins, A.F. Gouveia Betrao, S. Da Costa, A.E. Leitao, M.G. Bernardo-Gil. (2004). Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J. Supercrit. Fluids*.30, 155 – 161
61. P. Bhattacharjee, T.V. Rangnathan, R.S. Singhal, P.R. Kulkarni. (2003).Comparative aroma profiles using supercritical carbon dioxide and Likens- Nickerson extraction from a commercial brand of Basmati rice. *J. Sci. Food Agric.*, 83, 880 – 883.
62. F.J. Senorans, A. Ruiz-Rodriguez, E. Ibanez, J. Tabera, G. Reglero. (2003). Isolation of brandy aroma by countercurrent supercritical fluid extraction. *J. supercrit. Fluids*, 26, 129 – 135.
63. C. Sarrazin, J.L. Le Quère Gretsche, C. R. Liardon. (2000). Representativeness of coffee aroma extracts: comparison of different extraction methods. *Food chem.* 70, 99 – 106.
64. C. Turner, (2006). Modern extraction techniques. Food and agricultural samples. ACS Symposium Series 926. Edition, *American Chemical Society*, Washington, DC. 189 p.
65. Z. J. Dolatowski, J. Stadnik, D. Stasiak, (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 6(3), 89–99.
66. S. Veillet, V. Tomao, F. Chemat. (2010). Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. *Food Chem*, 123(3), 905–911.
67. F. Chemat, M. Zill-e-Huma, K. Khan. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultraso Sonochem*, 18(4), 813–835.
68. D. Pingret, A.S. Fabiano-Tixier, F. Chemat, (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), 593–606.
69. C. Da Porto, D. Decorti, I. Kikic. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chem*, 112(4), 1072–1078.
70. M. E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J of Chroma*, 1043(2), 323–327.
71. J.R.J. Paré, M. Sigouin, J. Lapointe. (1990). Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. Brevet européen, EP 398798.

72. J.R.J. Paré, M. Sigouin, J. Lapointe. (1991). Microwave assisted natural product extraction. Brevet américain, US 5 002 784.
73. J.R.J. Paré. (1994). Microwave extraction of volatile oils. Brevet américain, US 5 338 557.
74. C.S., Eskilsson, E. Bjorklund. (2000). Analytical-scale microwaveassisted extraction. *J. Chroma. A*, 902, 227 – 250.
75. F. Chemat, J. Smadja, M. E. Lucchesi. (2004) b. Lösungsmittelfreie Mikrowellen-Extraktion von flüchtigen Naturstoffen. Brevet Européen, EP 1 439 218 A1.
76. F. Chemat, J. Smadja, M. E. Lucchesi. (2004). Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. *Brevet Américain*, US 2004/0187340 A1
77. M. E. Lucchesi. F. Chemat, J. Smadja. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chroma A*, 1043, 323-327.
78. M. E. Lucchesi. F. Chemat, J. Smadja. (2004). An original solvent free microwavextraction of essential oil from spices. *Flar Fragr J.*, 19, 134 – 138.
79. R. Akloul, F. Benkaci-Ali, G. Eppe. (2014). Kinetic study of volatile oil of *Curcuma longa* L. rhizome and *Carum carvi* L. fruits extracted by microwave-assisted techniques using the cryogrinding. *J of Ess Oil Res*, 26(6), 473-485.
80. F. Grundschober. (1991). The identification of individual components in flavorings and flavored foods. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 192 (6), 530-534.
81. E. S. Kováts. (1965). Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*, 1, 229-247.
82. H. Van Den Dool, P.D. Kratz. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J of Chroma A*, 11, 463-471.
83. National Institute of Standards and Technology, PC Version 1.7 of The NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, (1999). The Perkin Elmer Corporation.
84. S. Chericoni, G. Flamini, E. Campeol, P.L. Cioni, I. Morelli. (2004). GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochem Syst and Ecol*, 32(4), 423-429.
85. W. Schultze, G. Lange, G. Schmaus. (1992). Isobutane and ammoniac chemical ionization mass spectrometry of sesquiterpene hydrocarbons. *Flavour and Fragrance journal*, 7(2), 55-64.
86. G. Lange, W. Schultze. (1988). Differentiation of isopulegol isomers by chemical ionization mass spectrometry, in *Bioflavour'87*, P. Schreier Ed., W. de Gruyter & Co., Berlin, New-York, 115-122.
87. J. Paolini, J. Costa, A.F. Bernardini. (2005). Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionisation mass spectrometry. *J of chroma A*, 1076(1-2), 170-178.
88. G. George. (1984). Applications de l'ICN à l'analyse des mélanges aromatiques. Thèse de doctorat de l'Université de Nice.

89. A.P. Bruins. (1979). Negative ion chemical ionisation mass spectrometry in the determination of components in essential oils. *Anal Chem*, 51(7), 967-972,
90. M. Zupanc, M. Prošek, M. Dušan. (1992). Combined CI and EI Mass Spectra in the Analysis of Essential Oils. *J of High Resol Chroma*, 15(8), 510-513.
91. T. Hartmann. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phychem*, 68(22-24), 2831-2846.
92. A. Fleuriot, A. Deloire, (1982). Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de Tomate blessés: Histochemical and Biochemical Aspects of Cicatrization of Tomato Fruit Lesions. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 107(3), 259-268.
93. Y. Yusuf. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(2), 64-71.
94. A. Lhuillier. (2007). Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauriasalicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauriapolyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissatrichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embeliaconcinna* Baker (Myrsinaceae). *Institut National Polytechnique*.
95. Y. Yusuf. (2010). Novel uses of catechins in foods. *Tre in Food Sci & Tech*, 67(2), 120-128.
96. J. Bruneton. (1999). *Pharmacognosie Phytochimie des plantes médicinales*, Lavoisier Tec & Doc Paris – 3^{ème} édition
97. J.B. Harborne, C. A. Williams. *advances in flavonoid research since 1992*. *Phytochemistry*. 55. p 481-504, 2000.
98. E.K. Heim, A.R. Tagliaferro, D.J. Bobilya. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The J of Nutri biochem*, 13(10), 572-584.
99. J. Bruneton. (2009). *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*. 4^e éd., revue et augmentée. Paris, France : Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p
100. J. Bruneton. (2009). *pharmacognosie.phytochimie.plantes médicinales*. 4^{em} édition. Lavoisier, 117-119 p
101. M.J. Motilva, A. Serra, A. Macia. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An Overview. *Journal of Chromatography A, State of the art of (UHP) LC-MS (-MS). Tech and their Pra Appl*. 1292, 62-82.
102. A. Crozier, M.N. Clifford, H. Ashihara. (2006). *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. 1^{ère} Edition, Blackwell Publishing Ltd, Royaume-Uni, 384p.
103. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The Amer J of Clin Nutri*, Volume 79, 5, 727-747.
104. E. Middleton, C. Kandaswami, T. C. Theoharides. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol calr*. 52(4), 673-839.

105. R. Ksouri, W. Megdiche, A. Debez, H. Falleh, C. Grignon, C. Abdelly. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidantactivities in leaves of the halophyte *Cakilemaritima*. *Pla Physio and Biochem*. 45(3-4), 244-249.
106. M. Bubonja-Sonje, J. Giacometti, M. Abram. (2011). Antioxidant and antilisterialactivity of olive oil, cocoa and rosemaryextractpolyphenols. *Food Chem*, 127. 1821–1827.
107. A. Bucic-Kojic, M. Planinic, S. Thomas, M. Bilic, D. Velic. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng*. 81, 236–242.
108. S. G.V. Kallithraka, C. Bridle, P. J. Bakker. (1995). Survey of solvents for extraction of grape seed polyphenolics. *Phytochem. Anal*. 6, 265.
109. R. Canals, M. Llaudy, J. Valls, J. Canals, F. Zamora. (2005).Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skins and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J of Agri and Food Chem*, 53, 4019-402.
110. N. Ruenroengklin, J. Zhong, X. Duan, B. Li. J. Yang, Y. Jiang, (2008). effects of various temperatures and ph values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. *In J of Mole Sci*. 9, 1333-1341.
111. T.J. Mason, L. Paniwnyk, J.P. Lorimer. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem*. 3, 253- 260.
112. G.K. Skouroumounis, G.M. Elsey, D.K. Taylor. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chem*. 129,570–579.
113. D.J. Mc Clements. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Techn*. 6, 293-299.
114. C. Carrera, A. Ruiz-Rodríguez, M.I. Palma, C.G. Barroso. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes, *Anal. Chim. Acta*.732, 100–104.
115. K. Ghafoor, Y.H. Choi, J.Y. Jeon, I.H. Jo. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *J. Agric Food Chem.*, 57, 4988–4994.
116. M. Palma, C.G. Barroso. (2002). Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Anal Chim Acta*. 458, 119-130.
117. L. Hui, C. Bo, N. Lihua, Y. Shouzhuo (2004). Solvent Effects on Focused Microwave Assisted Extraction of Polyphenolic Acids from *Eucommia ulmodie*. *Phytochem. Anal*, 15,306–312.
118. H.M. Merken, G.R. Beecher, (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 577,
119. I. Vulcano, M. Halabalaki, L. Skaltsounis, M. Ganzera, (2015). Quantitative analysis of pungent and anti-inflammatory phenolic compounds in olive oil by capillary electrophoresis, *Food Chem*, 169, 381-386.

120. J. L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann. (2003). Application of LC–NMR in the structure elucidation of polyphenols, in *Methods in Polyphenol Analysis*, Santos-Buelga, C., and Williamson, G., Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, Chap. 6
121. R.M. Smith. (2003). Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A*, 1000, 3,
122. A.M.,
123. Nuutila, K. Kammiovirta, K.M. Oksman-Caldentey, (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis, *Food Chem.*, 76, 519,
124. F. Giusti, G. Caprioli, M. Ricciutelli, S. Vittori, G. Sagratini. (2017). Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. *Food Chem* 221, 689–697
125. A. Sabir, M. Rafi, L.K. Darusman. (2017). Discrimination of red and white rice bran from Indonesia using HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics. *Food Chem* 221, 1717–1722.
126. I.K. Bae, H. Mi-Ham, M.H. Jeong, D.H. Kim, H.J. Kim. (2014). Simultaneous Determination of 15 Phenolic Compounds and Caffeine in Teas and Mate Using RP-HPLC/UV Detection: Method Development and Optimization of Extraction Process. *Food Chem.* 172: 469–75.
127. Torgils Fossen, Øyvind M. Andersen. (2006). *The Flavonoids-Advances in Research Since 1986. Chapitre 2: Spectroscopic Techniques Applied to Flavonoids.* 37; Edited by Jeffrey B. Harborne, Taylor & Francis Group, LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group
128. Z. Zhu, Q. Guan, M. Koubaa, F.J Barba, S. Roohinejad, G. Cravotto, Yang, X., Li, S., He, J. (2017). HPLC-DAD-ESI-MS2 analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction. *Food Chem*, 215, 391–400.
129. R. G. Cooks, R. Caprioli. (2000). Special Feature on electrospray ionization *J. Mass Spectrom.* 35,761-761.

Chapitre II :

Présentation Des Plantes Etudiées

Eude de La sauge officinale (*Salvia officinalis* L)

En 1551, un herboriste anglais observait que la sauge « restaure la chaleur naturelle, améliore la mémoire et stimule les sens ». La sauge demeure l'une des plantes médicinales les plus renommées, aux multiples vertus, dont celle de stimulé l'ensemble de l'organisme [1].

La *Salvia* est une plante annuelle et biannuelle d'origine méditerranéenne de la famille des labiées (Labiacées). Il existe environ 900 espèces identifiées dans le monde. En Algérie les espèces qui ont été recensées sont de l'ordre d'une trentaine [2].

I. Description morphologique

Cette plante vivace à tige ligneuse à la base, formant un buisson dépassant parfois 80cm, a rameaux vert-blanchâtre et de feuilles assez grandes, épaisses et opposées, de couleur vert-blanchâtres, ses fleurs sont bleu-violet clair en épis terminaux lâches, disposées par 3 à 6 en verticilles espacés. Le calice campanulé à 5 dents longues et corolle bilabée supérieure en casque et lèvre inférieure trilobée, le fruit est en forme de tétra akènes (Fig. II.1) [3].



Figure II.1 : la sauge (*Salvia officinalis* L.)

II. Classification taxonomique

La sauge suit la classification suivante [3].

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Salvia</i>
Espèce	<i>Salvia officinalis</i> L.

III. Habitat

- La sauge officinale est originaire du pourtour du bassin méditerranéen.
- Elle pousse dans les zones tempérées ; son habitat type se situe dans les pelouses basophiles méso-méditerranéennes, méso-xérophiles.
- Aire de répartition : introduite d'Asie occidentale [4]. Les espèces *Salvia* représentent un groupe d'espèces cosmopolites, qui montrent une gamme remarquable de variation [5]. Ce genre est distribué dans trois régions principales dans le monde: 530 espèces à l'Amérique centrale et latine, 250 espèces en Asie centrale et en régions méditerranéennes, 30 en Afrique du Sud et 90 espèces en Asie de l'Est [6] (**Figure. II.2**).

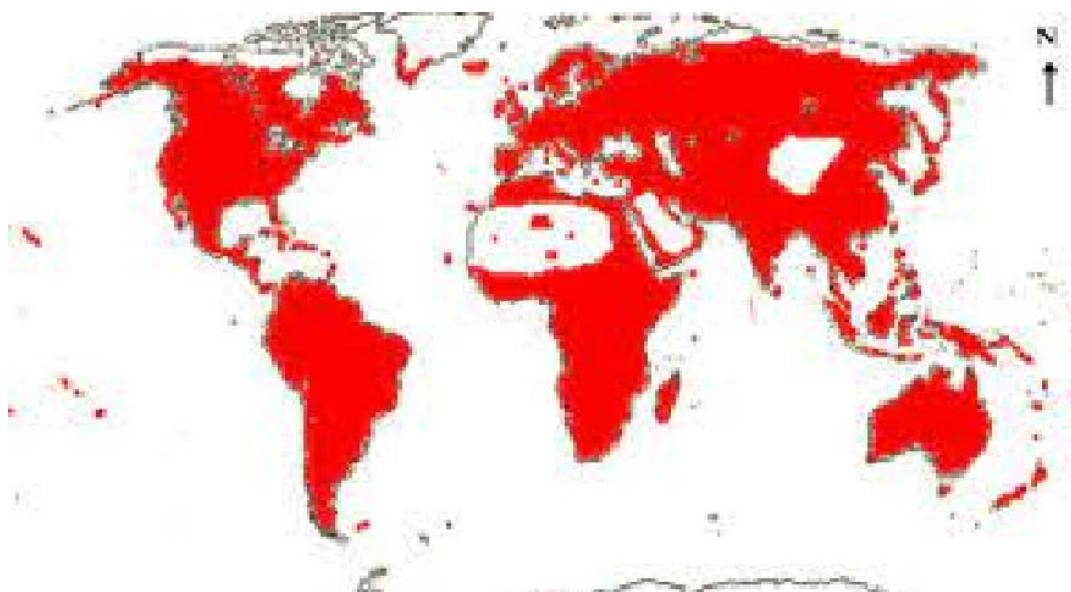


Figure II.2 : Répartition géographique du genre *Salvia* dans le monde [6].

IV. Composition chimique de l'huile essentielle de la sauge

Plusieurs travaux récents ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L dans différentes régions de part et d'autre du bassin méditerranéen , Plusieurs travaux récents ont étudié la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* dans différentes régions de part et d'autre du bassin méditerranéen tel que, la Yougoslavie [7], la Bulgarie [8], l'Italie [9], l'Egypte [10] et le Maroc [11],... etc.

Tableau II.1: Composition de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* [12].

Hydrocarbures terpéniques		Cétones	
Myrcène	0,3 à 3 %	Camphre	4,1 à 27,5 %
Limonène	Trace à 7,6 %	α -Thujone	1,5 à 44,2 %
Humulène	Trace à 18,9 %	β - Thujone	1 à 36,7 %
α -Pinène	1,7 à 13,1 %	Ester	
β -Pinène	0,5 à 17,9 %	Bornyl acétate	0,1 à 3,5 %
Camphène	1,1 à 10,3 %	Alcools	
β -Caryophyllène	Trace à 9,4 %	Linalol	Trace à 1,8 %
β -cymène	Trace à 1,1%	Bornéol	0,7 à 6,2 %
		Viridiflorol	0 à 9,9 %
		Autres	
		1,8-Cinéole	0,7 à 20,8 %

V. Composition chimiques de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. dans certains pays

Tableau II.2: Les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. d'origines diverses.

Pays	Composition chimique
Algérie [13]	β -thujone (16.44%), viridiflorol (10.93%), camphre (8.99%), 1,8-cinéole (8.11%), trans-caryophyllène (5.85%), α -humulène (4.69%)
Tunisie [14]	α -thujone (20.5%), β -thujone (5.6%), Camphre(18.8%), 1,8-Cinéole (7.4%), Viridiflorol(9.4%) et Manool (7.8%)
Liban [15]	α -thujone (21.04%), Caryophyllène (12.48%), γ -Gurjunène (9.85%), 1,8-Cinéole (9.83%), oxided'epimanoyle(8.2%), Bornéol (6.32%).
Espagne [16]	α -thujone (40.1 - 46.5%), β -pinène (2.6 - 4.5%), 1,8-cinéole (3.5 - 8.7%), β -thujone (4.1 - 5.6%), camphre (4.1 - 8.0%), viridiflorol (3.4-12.6%)
Italie [17]	Camphène (1.14–5.65%), 1,8-cinéole (4.98–13.4%), α -Thujone (35.9–45.8%), β -Thujone (4.35–9.60%), Camphre (15.5–21.1%), β -Caryophyllène (tr.-3.78%),
Grèce [18]	α -Pinene (4.12%), Camphene (2.87%), β -Pinene (6.06%), Eucalyptol (11.17%), Thujone (35.86%), Camphor (8.13%),

VI. les propriétés pharmacologiques de la sauge

Les sauges ont été employées comme des plantes à propriétés médicinales salutaires pendant des milléniums. La sauge était un composant fréquent des mélanges de tisanes, recommandés pour les patients tuberculeux [19,20].

L'huile essentielle de la sauge est encore utilisée en condiments d'assaisonnement, viandes traitées et liqueurs. Outre ces utilisations, les feuilles de la sauge (*S. officinalis*), montrent une gamme des activités biologiques; antibactérienne, antioxydant, antifongique, antivirale, anti-inflammatoire, astringente, et activité anticancer [17,23-29].

A notre connaissance il n'existe pas rapports écrit sur les effets secondaires associés à l'utilisation de la *Salvia officinalis* L. Malgré leur utilisation pendant de nombreux siècles. L'utilisation normale de la sauge est très sûre ; cependant, il pourrait y avoir un effet négatif sur l'utilisation de *S. officinalis* en quantité excessive, ce qui peut être lié au taux élevé de la thujone [21].

L'huile essentielle (HE) de *Salvia officinalis* peut contenir jusqu'à 50% de thujone qui peut se révéler épiléptisante et neurotoxique. Néanmoins, aucune toxicité aigüe ou chronique n'a été signalée après emploi aux doses usuelles des feuilles de sauge et de son huile essentielle (jusqu'à 15 gouttes par jour).

Cependant, la thujone provoque non seulement un effet local irritant, mais également des effets centraux psycho mimétiques, après sa résorption. Une consommation chronique de thujone peut ainsi conduire à des troubles irréversibles du système nerveux central, à des perturbations des fonctions hépatiques, rénal et cardiaques.

Une toxicité aigüe peut avoir lieu après administration d'une forte dose d'HE (2 g et plus). Ainsi, la consommation régulière de sauge, même sous forme de tisane ne paraît pas recommandée [22].

II : Eude des feuilles olivier « *Olea europaea* L. »

L'olivier (*Olea europaea*) est l'un des arbres les plus importants dans les pays méditerranéens, il recouvre ainsi environ 8 millions d'hectares ce qui représente environ 98% de la récolte du monde [30].

I. Description botanique

L'olivier fait partie de la famille des oléacées, il était et il est toujours principalement cultivé pour ses olives bien qu'il a aujourd'hui intègre le statut d'arbre d'ornement. C'est un arbre moyennement trapu (moyenne de 2m) qui peut pour certain sujet atteindre les 15 mètres de hauteur. L'olivier peu vivre plus de 1000 ans, son tronc tourmenté et noueux porte à sa base de nombreux rejets dans sa condition mi- sauvage. Le bois d'olivier est brun clair veiné de marbrures sombres, il est apprécié par les ébénistes et les sculpteurs.

Les feuilles de l'olivier ne tombent jamais, (durée de vie, trois ans) leur situation sur le rameau est dite "opposée", le pétiole est court. La face supérieure des feuilles est luisante vert foncé, tandis que la face inférieure présente un aspect argenté dû à la pruine, ses fleurs blanches forment des grappes courtes. (**Figure II.3**). Le fruit, l'olive, est une drupe avec une pulpe charnue riche en matière grasse. D'abord vert, il devient noir à maturité complète, vers octobre novembre.

L'olivier, *Olea europea*L, est une espèce très cultivée en méditerranée, il est utilisé en gastronomie ; mais également pour l'éclairage, en cosmétique et en thérapie...etc.

L'oléiculture s'est répandue avec l'envahissement de la civilisation phénicienne et romaine, presque tout le bassin méditerranéen pour être enfin un symbole de la méditerranée. On le trouve également en Amérique du Nord et du Sud, en Chine, en Australie, avec un pourcentage ne dépassant pas les 3% de l'oliveraie mondiale [31].

L'Algérie, comme les autres pays méditerranéens, a sa part des oliviers avec une superficie de 226337 ha, ce qui présente un nombre de 24.000.000 arbres [32]. Du fait de son adaptation à tous les étages bioclimatiques, l'olivier est présent un peu partout dans le territoire national.

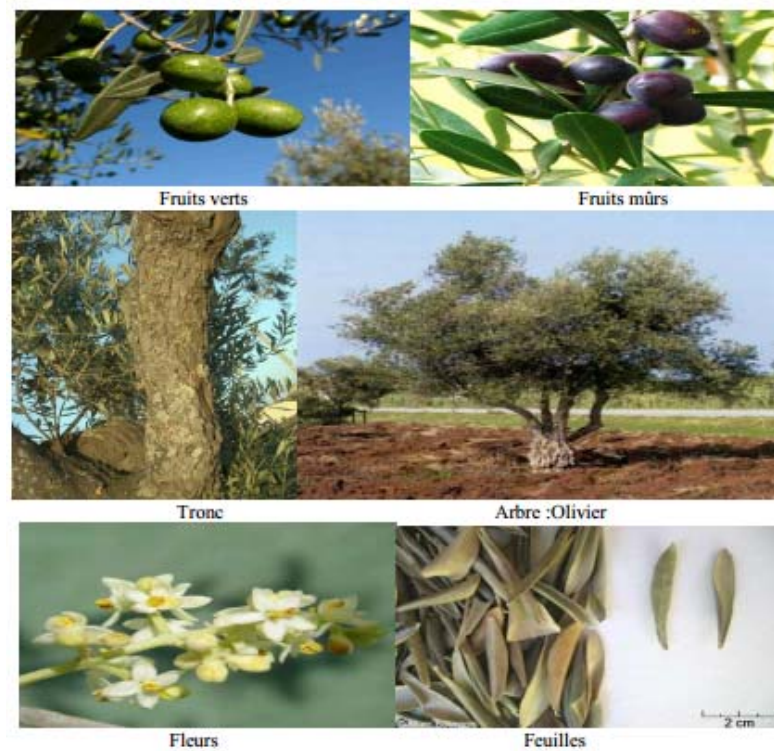


Figure II.3 : Aspect morphologique de la plante *Olea europaea*L.et leurs parties

II. Classification botanique

L'olivier appartient à la famille des oléacées. Le genre est appelé "*Olea*" et comporte 30 espèces différentes réparties sur la surface du globe. L'espèce cultivée en Méditerranée est "*Olea europaea*", dans laquelle on trouve l'oléastre ou l'olivier sauvage, et l'olivier cultivé.

La classification botanique de l'olivier est la suivante [33] :

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Scrophulariales
Famille	Oleaceae
Genre	<i>Olea</i> L.
Espèce	<i>Olea europea</i> L.



Figure II. 4 : La plante *Olea europaea*L.

III. Distribution géographique

III.1. Répartition de l'olivier dans le monde

La culture d'olivier a une grande importance économique et sociale dans les pourtours méditerranéens. En fait, elle est l'une des activités agricoles la plus importante dans les pays méditerranéens, elle couvre 8 millions d'héctare, presque 98% de la récolte mondiale[34].

En Afrique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Tunisie (56 millions), Maroc (50 millions), Algérie, Libye, Egypte, Afrique du Sud et Angola. Les pays d'Europe cultivant l'olivier sont par ordre d'importance : L'Espagne (309 millions d'oliviers), l'Italie (238 millions), la Grèce (170 millions), le Portugal (72 millions) et la France (7 millions). Au Moyen Orient et en Asie, les pays cultivateurs d'olivier sont par ordre d'importance Turquie, Syrie, Palestine, Liban, Israël, Jordanie, Irak, Iran et Chine. En Amérique, l'olivier est cultivé par ordre d'importance en Argentine, Mexique, Chili, Pérou, Uruguay, Brésil et Etats Unis (Californie). L'Australie fait partie des nouveaux producteurs. Le bassin méditerranéen reste une zone privilégiée par rapport au reste du monde pour la culture de l'olivier grâce à son climat adéquat tant au niveau de la température mais aussi au niveau de l'hydrométrie [35].

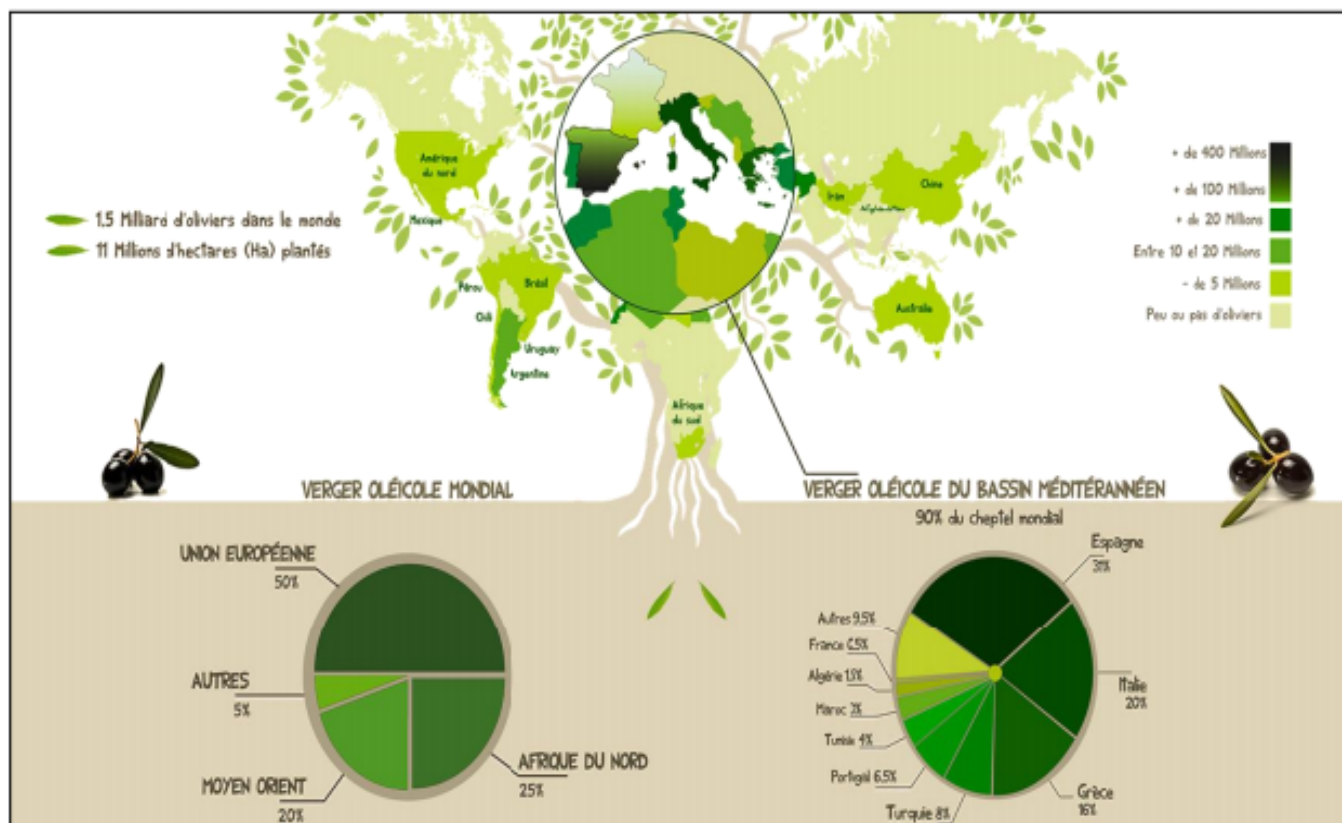


Figure II.5. L'olivier dans le monde [36]

III.2. Répartition de l'olivier dans le bassin méditerranéen

Pour les botanistes, l'aire de répartition de l'olivier est synonyme de "région méditerranéenne". L'olivier (*Olea europaea* L.) est cultivé depuis très longtemps autour de la méditerranée et de la mer noire surtout en : Espagne, Italie, Grèce, Turquie, France, Tunisie, Algérie et Croatie (figure 19). Aujourd'hui si l'on trouve des plantations en Californie, Australie, Afrique du Sud. Cette répartition géographique est influencée par des facteurs climatiques et pédologiques [37].

III.3. Répartition de l'oléiculture en Algérie

L'Algérie fait partie des principaux pays méditerranéens dont le climat est plus propice à la culture de l'olivier. Le patrimoine oléicole Algérien est estimé à 32 millions d'oliviers, ce qui représente 4,26% du patrimoine mondial. Cette filière se concentre dans certaines wilayas comme Bejaia, Tizi-Ouzou et Bouira qui ont produit à elle seules en 2008, 179 180 hectolitres d'huile sur une superficie de 108 893 ha, sont 51% de la production nationale et environ 44% du verger national oléicole. Ces trois wilayas sont spécialisées beaucoup plus sur la production d'huile [38].

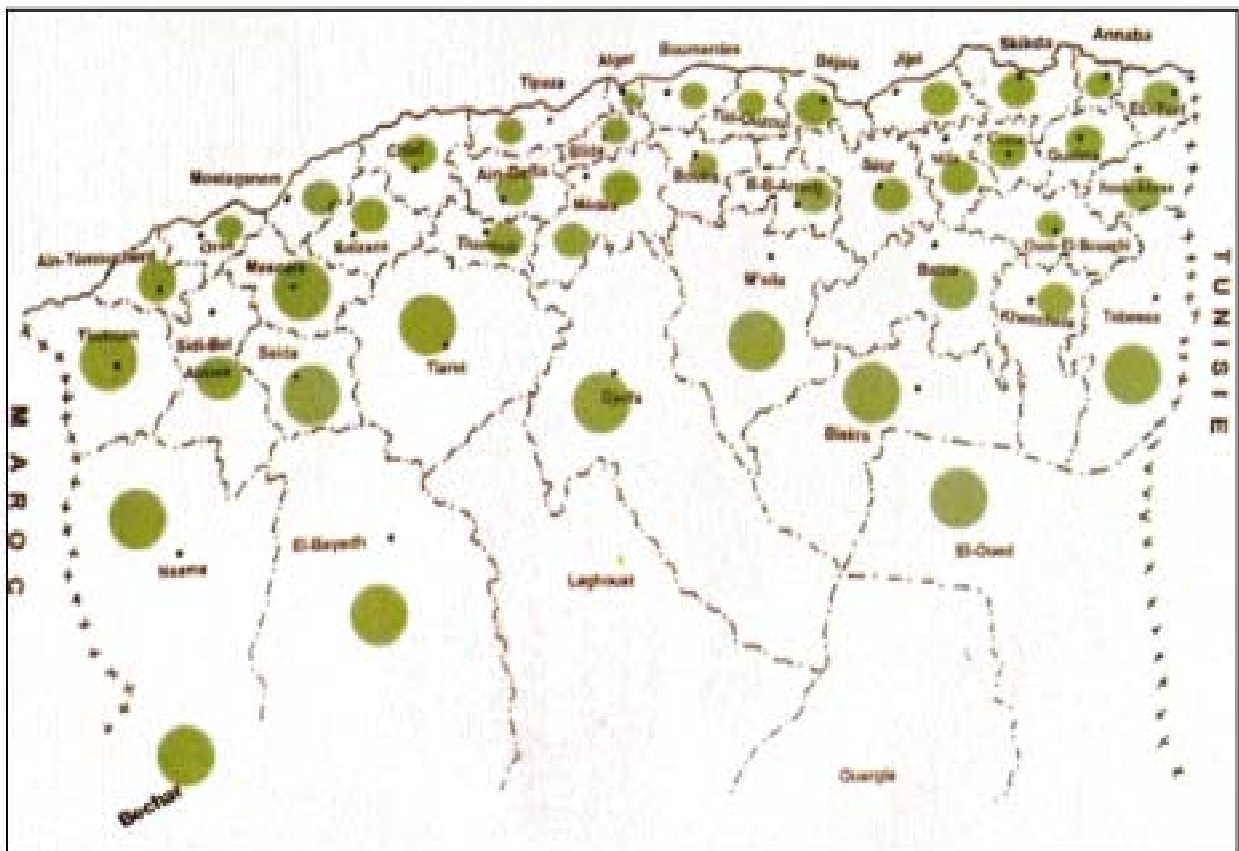


Figure II.6 : Localisation de l'olivier en Algérie [39]

IV. Les différentes variétés d'oliviers cultivées en Algérie

La détermination et la classification des variétés sont difficiles à établir avec précision du fait de l'existence de sous espèce. Les travaux de Chaux, [40] et de Hauville, [41] on permet de décrire les principales variétés cultivées en Algérie ; tout on soulignant que leur nombre dépasserait 150.

IV.1. La variété Chemlal :

Cette variété est cultivée essentiellement en grande Kabylie ou elle occupe une place importante dans l'économie de la région. Elle représente environ 40 % des oliviers cultivés en Algérie. Il ne s'agit pas d'une variété mais probablement d'une population, car il existe plusieurs types de Chemlal :

- Chemlal de Tizi Ouzou
- Chemlal précoce de Tazmalt
- Petite Chemlal pendante
- Chemlal de l'Oued Aissa
- Chemlal Blanche d'Ali- Chérif

Les arbres sont très vigoureux, de grande dimension à port sphérique et semi-retombant. Ses rameaux fruitiers sont longs et souples. Les fruits sont petits d'un poids de 2.5 g et sont destinés à la production d'huile. Le rendement en huile est de l'ordre de 18 % à 24 %.

La variété Chemlal est réputée pour produire une huile d'excellente qualité. Cette variété est reconnue pour être auto stérile par absence de pollen. En Kabylie, elle se trouve toujours associée à d'autres variétés qui assurent sa pollinisation.

IV.2. La variété Azeradj : (Synonyme : Adjeraç)

Cette variété représente 5 % des oliviers cultivés en Algérie. Elle se trouve localisée en Kabylie en mélange avec d'autres variétés dont Chemlal. On la rencontre surtout en petite Kabylie, dans la vallée d'Oued Soummam. Il existe également plusieurs types locaux de cette variété :

- Azeradj de Seddouk
- Azeradj de Beni bouMelak
- Grosse Azeradj d'Ali Chérif.

L'arbre est de vigueur moyenne, à port légèrement étalé et à feuillage dense. Les rameaux sont grêles, sinueux plus ou moins pendants et disposés en touffes. C'est une variété auto fertile. Les fruits sont assez gros (3 à 5 g) et donnent un rendement en huile de l'ordre de 15%. Cette variété est utilisée pour son huile mais aussi pour la conserverie.

IV.3. La variété Limli : (Synonyme : Imli, Imeli)

Cette variété est localisée dans la vallée d'Oued Soummam. On la rencontre surtout dans la basse Soummam (de Sidi Aïch à Bejaïa) à une altitude de 300 à 400 m. Elle représente 8% du verger oléicole algérien, l'arbre a une vigueur moyenne, le port est légèrement étalé. Les fruits sont petits (2g) avec un rendement en huile de 15% à 16%. On lui reproche de donner une huile légèrement acide. Sa maturité est assez précoce. C'est une variété régulièrement productive en conditions normales de culture.

IV.4. La variété Bouchouk :

Cette variété est cultivée surtout dans la basse vallée de l'Oued Soummam, dans la petite Kabylie. Mais on la trouve également en grande Kabylie en mélange avec Chemlal. Elle est également présente dans l'est du pays (Constantine). Il existe plusieurs types de Bouchouk suivant la localisation des aires de culture :

- Bouchouk de Guergour
- Bouchouk de Sidi Aïch
- Bouchouk lafayette (Bougââ).

Les fruits sont relativement gros (3 à 5g) avec une teneur en huile de 16 à 20%. C'est une variété à deux fins (huile et conserve).

IV.5. La variété Rougette de Mitidja :

On rencontre cette variété dans l'Atlas Blidéen, le Sahel Algérois et la plaine de la Mitidja. La couleur du fruit, assez caractéristique, rougeâtre à maturité, d'où son nom de «Rougette». Le fruit pèse environ 1.2g et possède une maturité précoce (fin Novembre). L'arbre est d'une vigueur moyenne à port étalé, sa production peut aller jusqu'à 35kg/an/arbre. Il est peu alternant.

IV.5.1. La variété Abani :

Cette variété est cultivée dans la région de Khenchela, elle présente une floraison tardive, synchrone avec d'autre variété telle que : Mekki, Boughenfous et Ferkani. Elle est

peu alternante. Ses fruits allongés et noir pèsent environ 1 à 2g avec une teneur en huile de 13%. L'arbre est vigoureux et possède une capacité de production annuelle moyenne par arbre de 33.02kg. C'est une variété à huile.

IV.5.2. La variété Ferkani :

Cette variété est également présente dans la région de Khenchela et ses environs. L'arbre est de vigueur moyenne à port très étalé. Les fruits sont relativement moyens (2 à 3g) avec une teneur en huile de 25%. C'est une variété exclusivement cultivée pour son huile.

IV.5.3. La variété Sigoise : (Synonyme : olive de Tlemcen, olive du Tell)

Cette variété est surtout cultivée dans l'ouest du pays, en Oranie, et plus particulièrement dans la plaine de Sig. Elle représente 20% des oliviers cultivés en Algérie. C'est une variété également à deux fins (olive de table et à l'huile). En Oranie elle est surtout cultivée comme olive de table (olive de conserve ou olive confite). Le fruit est moyen d'un poids de 3 à 3.5g et donne un rendement en huile de 18 %. C'est une variété auto fertile. Les rendements en fruits dépassent fréquemment 30qx à l'hectare et pouvant atteindre 50 kg/arbre.

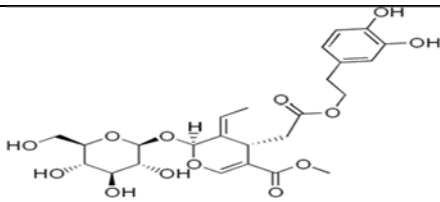
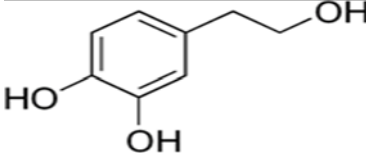
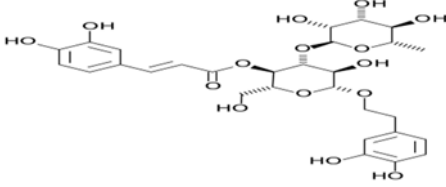
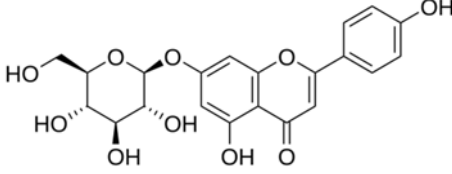
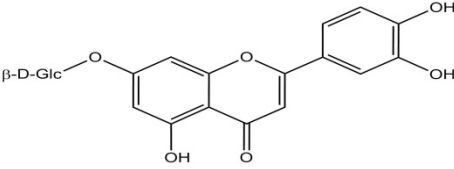
VI. Les composés phénoliques des feuilles d'olivier *Olea europaea* L.

Durant ces dernières années, plusieurs chercheurs se sont intéressés aux composés phénoliques à cause de leur pouvoir à piéger les radicaux libres et les bienfaits potentiels de leur consommation sur la santé humaine.

Plusieurs études ont montré que les feuilles d'olivier sont une source significative des composés phénoliques bioactifs comparable à l'huile et au fruit d'olivier [42]. La teneur en ces composés bioactifs est dépendant de l'âge des feuilles, de l'origine, des conditions climatiques, de la variété, du mode de séchage et de la période de récolte, les conditions d'extraction et le type de solvant d'extraction [34].

Les feuilles d'olivier sont riches en flavonoïdes (l'acide olenolique), sécoiridoides (oleuropéine et l'oleuropeoside), acides phénoliques (l'acide vanillique) et alcools phénoliques (tyrosol et hydrotyrosol) [33], les polymères phénoliques sont représentés par les tannins hydrolysables et condensés et principalement par la lignine selon Benavente-García et coll (2000) [43] l'oleuropéine est le composé phénolique majoritaire dans les feuilles d'olivier (tableau.II.4).

Tableau II.3: Structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants des feuilles d'olivier cultivé [43].

Composé phénolique	Structure chimique
Oleuropéine	
Hydroxytyrosol	
Verbascoside	
Apigenin-7-glucoside	
Lutéolin-7-glicoside	

Oleuropéine est un sécoiridoides, présent dans l'olivier et ses produits dérivés (huile d'olive, margines et grignons). C'est le composé bioactif majeur dans les feuilles d'olivier. Plusieurs auteurs ont rapporté que les feuilles d'olivier sont une source utile pour l'extraction de l'oleuropéine [44]. L'oleuropéine possède de nombreux effets bénéfiques sur la santé humaine.

Ainsi cette molécule est utilisée pour sa propriété antioxydante [43], antimicrobienne [35], antivirale [45], et anti- inflammatoire [46]. En outre, l'oleuropéine possède un effet cardioprotecteur et neuro protecteur [47].

Des études in vitro ont démontré que l'oleuropéine agit comme un composé antitumoral [48], inhibe l'activité du facteur d'activation des plaquettes [49] et peut-être un

modulateur du métabolisme. Il améliore aussi le Métabolisme des lipides pour se protéger contre les problèmes d'obésité.

L'oleuropéine intervient dans le développement du processus de l'auto-défense de l'olivier contre l'attaque d'agents pathogènes et des insectes [50].

VII. Les propriétés pharmacologiques des feuilles d'olivier

Les composés triterpénoïques, abondants dans les feuilles d'olivier, possèdent des propriétés pharmacologiques ayant des effets anti-inflammatoires, hépato protecteurs, antitumoral, antiviral, antimicrobien, antifongique, antidiabétique, gastroprotecteur et anti hyperlipidémique [31,52-67].

VII.1. Activité antioxydante

Les composés phénoliques de l'olive dont les sécoiridoides sont susceptibles de réagir avec la plupart des (ERO) espèces réactives de l'oxygène.

En effets, l'oleuropéine et ses dérivés l'hydroxytyrosol et le tyrosol ont montré un pouvoir anti radicalaire important. Ils sont capables de piéger les ERO et les espèces réactives de l'azote ce qui permet la protection d'ADN contre les lésions [68]

Les flavonoïdes exercent aussi leur activité antioxydante via leur groupe hydroxyle. Cette action est également due à la présence de triterpènes.

En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices [69].

VII.2. Activité antibactérienne

L'utilisation des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages, transposons, intégrons). Ces résistances ont conduits à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques d'une part et bien acceptés par l'organisme d'autre part (sans exercer des effets délétères sur la santé humaine) [70,71]. Beaucoup de travaux portés sur l'activité

antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que fenel (*Foeniculumvulgare*), peppermint (*Menthapiperita*), thyme (*Thymus vulgaris*), ont montré que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries mai aussi contre les champignons, les levures et les virus [72].

D'autres ont franchi une étape plus loin, où les chercheurs ont isolé et identifié les L'extrait de feuille d'olivier est actif in vitro contre un grand nombre de germes (*Staphylocoques*, *streptocoques*, *hémophiles*, *pseudomonas*...etc). Ces données montrent l'emploi potentiel de ses principes actifs comme additifs alimentaire, *Olea europaea* peut être considère comme une source potentielle d'agent antimicrobiens prometteurs pour le traitement des infections des systèmes gastro-intestinal et respiratoire de l'homme. La feuille d'olivier elle-même est un fongicide, son oleuropéine protège l'arbre des champignons et moisissures.

1. A. Chevrllier. (2007). Le spécialiste, Les plantes médicinales, Avant propos du Dr ANN WALKER, Éditions Gründ pour l'édition française « GRUND » REMEDES .posologie .préparations .propriétés thérapeutiques. Soins.
2. A. Djerroumi, M. Nacef. (2013). 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed. Houma.
3. M. Maksimovic, V. Danijela, M. Mladen, E.S. Marija, A. Sabaheta, S.Y. Sonja. (2007). effet of the environmental condition on essential oil profile in two dinaric salviaceae: *salviabrachydon* and *salvia officinalis* L. Biochem Sys and Eco. 35: 473- 478
4. A. Madi. (2010). Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (thym et sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Research Master, Mentouri Constantine University, Constantine.
5. K. Alloun. (2013). Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L. et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.).
6. L. Pistelli. (2006). Photochemicals from lamiaceae: from nutraceuticals to Hallucinogens. International symposium The Lamiaceae: Advances in Production, Biotechnology and Utilization, Sanremo, 22-25
7. J. B. Walker, J. Kenneth, J. Treutlein, M. Wink. (2004). *Salvia* (lamiaceae) is not monophyletic: Implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. Am J Bot, 91 (7), pp. 1115–1125.
8. A. J. Perry, N. J. Baxter, J. W. Brennan, J. Van Klein. (1996). Flavour Frag. 11, 213.
9. A. N. Tsankova, E. M. Konchichev, J. Genova. (1994). Essent. Oil. Res, 6, 375.
10. R. Place, J. Piccaglia. (1995). Oil. Res. 7, 443.
11. S. Karawya-El Hawary. (1981). J. Pharm. Sci. 19, 301.
12. S. Belkamel-Drouet, M. Rouzet. (1990). Rev. Mar. Pharmacol. 4, 7.
13. O. Belfadel, T. Menasria, A. Messaili. (2017). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Three Medicinal Plants from Algerian Semi-Arid Climatic Zone Mehalaine · Phytothérapie.1007/s10298-017-1143.
14. S. Rgueza, K. Msaadaa, M., Daami-Remadib, I. Chayebc, I. Bettaieb Rebeya, M. Hammamia, A. Laarific, I. Hamrouni-Sellamia. (2019). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Salvia officinalis* aerial parts as affected by diurnal variations. Plant Bios, 153, 2, 264–272

15. N, Arnold-Apostolides H. Nasser, S. Baydoun. (2018). Chemical Composition of the Essential Oils of Five *Salvia* Species Growing Wild or Cultivated From Lebanon. *Food Sci Nutr Res.*; 1(1): 1-5.
16. M.P.C. Arraiza, Arrabal, J. Lopez, V. Seasonal. (2012). Variation of Essential Oil Yield and Composition of Sage (*Salvia officinalis* L.) Grown in Castilla - La Mancha (Central Spain). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca.*, 40(2):1842-4309
17. I.H. Sellami, I.B. Rebey, J. Sriti, F.Z. Rahali, F. Limam, B. Marzouk. (2012). Drying Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants and Its Effects on Content, Chemical Composition, and Radical Scavenging Activity of the Essential Oil. *Food Bioprocess Technol.*, 5, 2978–2989.
18. F.G. Koubaa, R. Abdennabi, A. Soussi Ben Salah, A. El Feki, (2018). Microwave extraction of *Salvia officinalis* essential oil and assessment of its GC-MS identification and protective effects versus vanadium-induced nephrotoxicity in Wistar rats models. *Arch. Physiol. Biochem.*, 8, 1–10.
19. Wolters kluwer, (2007). botanique pharmacognosie phytothérapie.1, rus Eugène et Armand Peugeot. 92500 Rueil-Malmaison Cedex.
20. V. Radulescu, C. Silvia, O. Eliza. (2004). Capillary gas chromatography-mass Spectrometry of volatile and semi volatile compound of *Salvia officinalis*. *J of Chroma A*. Vol.1027, pp.121-126.
21. E.N. Duling, J.C. Owen, B.G. John, F.W. Rosmary, A.M. Kevin, L.F. Yeap, B.P. Nigel. (2007). Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol- water mixture. *Food chemistry*. Vol.101, app. 1417- 1424.
22. M. R. S. Hamidpour, M. Shahlari. (2014). Chemistry, Pharm, and Med Prop of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. Vol.4, N°, pp.82– 88.
23. R. Sabbobeh, H. Hejaz, A. Jahajha, et al. (2016). Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Leaf Extract of *Salvia palaestina*. *J of Appl Pharma Sci*. 6: 076-082.
24. M. S. Abu-Darwish, C. Cabral, I. V. Ferreira, et al. (2013). Essential Oil of Common Sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan Assessment of Safety in Mammalian Cells and Its Antifungal and AntiInflammatory Potential. *Bio Med Res Int*. 538940.
25. G.C. Tenore, R. Ciampaglia, N.A. Arnold, F. Piozzi, F. Napolitano, D. Rigano, F. Senatore. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food Chem. Toxicol*. 49, 238–243.

26. A. Ghorbani, M. Esmailizadeh. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J of Tradi and Compl Medicine*. 7: 433-440.
27. H. Lim, K.H. Son, H.W. Chang, S.S. Kang, H.P. Kim, (2006). Effects of antiinflammatory biflavonoid, ginkgetin, on chronic skin inflammation. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1046–1049
28. M.Z. Haznedaroglu, N.U. Karabay, U. Zeybek. (2001). Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia*, 72, 829–831.
29. A. Russo, C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Delfine, V. Cardile, S. Rosselli, M. Bruno. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem Toxicol.* 55:42–47
30. A. Guinda, T. Albi, M.C.P. Camino, A. Lanzón. (2004). Supplémentation d'huiles en acide oléanolique de feuille d'olivier (*Olea europaea*). *EUR. J. LipidSci. Technol.*, 106, p 22- 26.
31. Food and Agriculture Organisation (F.A.O). 2005, séries statistiques.
32. Ministère de l'agriculture. (2005). Fiche des données statistiques.
33. Ghedira, K. L'olivier. *Phytothérapie*. 6, 2008 ; 83-89.
34. N. Boudhrioua, N. Bahloul, I. Slimen, N. Ben-Kechaou. (2008). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves, 9, 412–419.
35. F. Aouidi. (2012). Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molécules*, Etude de la valorisation des feuilles d'Olivier *Olea Europaea* dans L'industrie Agro-Alimentaire. Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie. (12). 1153-1162.
36. COI, (2015). World Olive Oil Figures.
37. Y. Carrion, M. Ntinou, E. Badal. (2010). *Olea europaea* L. in the North Mediterranean Basin during the Pleniglacial and the Early–Middle Holocene. *Quaternary Science Reviews*. 29 : 952–968.
38. D. Saad. (2009). Etude des endomycorhizes de la variété sigoise d'olivier (*Olea europea* L.) et essai de leur application a des boutures semi-ligneuses, Mémoire de magister, université d'Oran, 2009, 98 P.
39. ITAFV, (2008). L'oléiculture en Algérie – Situation actuelle de l'oléiculture en Algérie.
40. C, Chaux. (1952). Rapport de la station expérimentale de Sidi-Aîch- Rapports du conseil de l'expérimentation et ses recherches agronomiques.

41. A. Hauville. (1953). La répartition des variétés d'oliviers en Algérie et ses conséquences pratiques. *Bull. de la Soc des agric d'Algérie*, 580 : 8.
42. F. Brahmi, B. Mechri, S. Dabbou, M. Dhibi, M. Hammami. (2012). The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *In Cro and Prod.* 38(1), 146
43. O. Benavente-García, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuño, J.A. Del Rio. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*. 68, 4, 457-462.
44. S. Cyril, B. Baghdikian, R. Elias, F. Dargouth-Kesraoui, K. Boukef, G. Balansard. (2001). Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves J. Agric. *Food Chem.*, 49, 2, 618-625.
45. V. Micol, N. Caturla, L. Pérez-Fons, V. Más, L. Pérez, A. Estepa. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research*. 66, (2–3), 129-136
46. F. Visioli, A. Romani, N. Mulinacci, S. Zarini, D. Conte, F. F. Vincieri, C. Galli. (1999). Antioxidant and Other Biological Activities of Olive Mill Waste Waters. J. Agric. *Food Chem.* 47, 8, 3397–3401
47. S.H. OMAR. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Sci. Pharm.*, 78, 133-154.
48. K. Hamd, R. Castellon. (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem and Biophy Rese Com.* 334, (3, 2), 769-778
49. N. K. Andrikopoulos, S. Antonopoulou, A. C. Kaliora. (2002). Oleuropein Inhibits LDL Oxidation Induced by Cooking Oil Frying By-products and Platelet Aggregation Induced by Platelet-Activating Factor. *LWT - Food Sci and Tech.* 35(6), 479-484
50. O. N. S.A. Malik, J. M. Bradford. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina'. *Scientia Horticulturae*. 110, 3, 274-278
51. H. F. Al-Azzawie, M. S. Saeed Alhamdani. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*. 78, 12(16), 1371-1377
52. N. Bennani-Kabchi, H. Fdhil, Y. Cherrah, L. Kehel, F. el Bouayadi, A. Amarti, M. Saïdi, G. Marquié. (1999). Effects of *Olea europea* var. oleaster leaves in hypercholesterolemic insulin-resistant sand rats. *Thérapie*. 54(6):717-723

53. E. Altıok, D. Bayçın, O. Bayraktar, S. Ülkü. (2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Sep and Pur Tech.* 62, 2(1) 342-348
54. M. Moudache, C. Nerínb, M. Colonb, F. Zaidia. (2017). Antioxidant effect of an innovative active plastic film containing olive leaves extract on fresh pork meat and its evaluation by Raman spectroscopy. *Food Chem.* 229, 98-103
55. Ok. H. Lee, B.Y. Lee, (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bio Tech.* 101,10, 3751-3754
56. H. Jemai, M. Bouaziz, I. Fki, A. El Feki, S. Sayadi. (2008). Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem-Bio Int.* 176, 2(3), 88-98
57. M. Kiritsakis Kostas, G. Kontominas, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, A. Moustakas, A. Kiritsakis. (2010). Composition and Antioxidant Activity of Olive Leaf Extracts from Greek Olive Cultivars. *J of the Amr Oil Chem Soci.* 87(4) 369-376
58. N. Sudjana, C. D'Orazio, V. Ryan, N. Ng. J. Rasool, N. Islam, T. V. Riley, K. A. Hammer. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *Int J of Antimc Age.* 33(5), 461-463
59. C.V. Cobrançosa, A. P. Pereira, I. CFR Ferreira, F. Marcelino, P. Valentão, P. B. Andrade, R. Seabra, L. Estevinho, A. Bento, J. A. Pereira. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves. *Mole.* 12(5), 1153-1162
60. S. Lee-Huanga, L. Zhanga, P. L. Huangb, Y-T. Changc, P.L. Huangd. (2003). Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochm and Bioph Resch Com.* 307, 4(8), 1029-1037
61. E. KOMAKI, S. YAMAGUCHI, I. MARU, M. KINOSHITA, K. KAKEHI, Y. OHTA, Y. TSUKADA. (2003). Identification of Anti- α -Amylase Components from Olive Leaf Extracts. *Food Sci and Techn Resch.* 9 (1), 35-39
62. H. Jemai, A. El Feki Sayadi, S. (2009). Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *J of Agri and Food Chem.* 57 (19), 8798-8804
63. M. Eddouks, M. Maghrani, A. Lemhadri, M.L. Ouahidi, H. Jouad. (2009). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes

- mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *J of ethnopharm* 82 (2-3), 97-103
64. E. Susalita. N. Agus, I. Effendi, R. Tjandrawinata, R. Nofiarny, T. Perrinjaquet-Moccetti, M. Verbruggen. (2011). Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedic* 18, 4(15), 251-258
65. D. Miljković, D. Dekanski, Ž. Miljković, M. Momčilović, M. Mostarica-Stojkovic. (2009). Dry olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical Nutrition*. 28, 3, 346-350
66. Benavente Garcia, Kim et al., 2003.
67. L. Abaza, T. P. N. Talorete, P. Yamada, Y. Kurita, M. Zarrouk, H. Isoda. (2007). Induction of Growth Inhibition and Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells by a Tunisian Gerboui Olive Leaf Extract. *Biosc, Biotech, and Biochem*. 71, 5(23) 1306–1312
68. Z. Bouallagui, J. Han, H. Isoda, S. Sayadi. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chem Toxicol*. 49, 1, 179-184
69. S. Menendez, I. Graham, D. Atar, K. Borch-Johnsen, G. Boysen, G. Burell, R. Cifkova, J. Dallongeville, G. De Backer, S. Ebrahim, B. Gjelsvik. (2007). Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Euro Heart J*, 28, 19, 2375–2414,
70. E. Niki. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Rad Bio and Med*. 49, 4(15) 503-515
71. R. García-Ruiz, V. Ochoa, B. M. Hinojos, J. A. Carreira. (2008). Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Bio and Biochem*. 40, 9, 2137-2145
72. I. Kempf, S. Zeitouni. (2009). The cost of antibiotic resistance: analysis and consequences. *Pathologie-biologie*. 60(2): 9-1

Chapitre III :

Matériels et Méthodes

Etude de la Sauge officinale «*Salvia officinalis* L.»

I. Matériel végétal et extraction

I. 1. Matériel végétal :

Les échantillons de *Salvia officinalis* L. ont été récoltés au niveau du jardin d'essai d'El-Hamma à Alger en Mai 2015. Le matériel végétal a été divisé en trois parties, une partie a été utilisée à l'état frais. La deuxième partie a été divisée en deux parties qui ont subies un séchage à l'air libre, l'une pendant sept (07) jours et l'autre pendant vingt un (21) jours. La troisième partie, divisée elle aussi en deux parties qui ont subies un séchage à l'étuve pendant 4 heures, l'une à une température de 40°C et l'autre à une température de 60°C.

I.2. Extraction des huiles essentielles

Pour l'échantillon frais l'huile essentielle a été extraite par trois méthodes :

- L'hydrotistillation (HD)
- L'hydrotistillation assistée par micro-ondes (HDMO)
- L'entraînement à la vapeur d'eau (EVE).

Pour les échantillons séchés seule l'extraction par hydrodistillation a été utilisée.

Les différents montages des extractions sont donnés dans les figures **III.1**, **III.2**, **III.3**.



Figure III.1. Schéma du dispositif d'hydrodistillation



Figure III.2. Schéma du dispositif de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes



Figure III.3. Schéma du dispositif d'Entrainement à la vapeur

Tableau III.1.: Conditions opératoires des différentes techniques d'extraction utilisées

Technique d'extraction	La masse de l'échantillon (g)	Temps de l'extraction (min)
Hydrodistillation(HD)	300	3h
Hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO)	300	30 min
entrainement à la vapeur d'eau (EV)	300	3 h

NB : P= 400W

II. Méthodes de caractérisation physico-chimique des HE

La détermination des indices physico-chimiques des différents extraits d'huiles essentielles a été faite selon les protocoles de la pharmacopée européenne [5] et la commission française de normalisation [6].

II.1. Densité à 20°C

La densité relative d_{20}^{20} a été calculée à l'aide d'un pycnomètre à une température de 20°C. On détermine la masse du pycnomètre vide (M_0), ensuite la masse du pycnomètre rempli d'eau distillée (M_1). On détermine ensuite la masse du pycnomètre contenant l'huile essentielle (M_2). La densité relative est calculée par l'expression suivante.

$$d_{20}^{20} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

II.2. Indice de réfraction à 20°C

L'indice de réfraction a été enregistré par lecture directe à l'aide d'un réfractomètre. Nous avons étalonné le réfractomètre par l'éthanol, après nous avons déposé deux gouttes d'huile essentielle sur le réfractomètre. L'indice de réfraction est calculé par la relation suivante :

$$\eta^T_d = \eta^{T'}_d + 0,0004 (T' - T)$$

η^T_d : Indice de réfraction à la température de référence (20 °C).

$\eta^{T'}_d$: Indice de réfraction à la température ambiante.

II.3. Pouvoir rotatoire à 20°C

Nous avons rempli un tube de 100 mL avec de l'éthanol, puis nous l'avons placé dans le polarimètre afin d'étalonner l'appareil.

Nous avons vidé, et nettoyé le tube avec de l'éthanol, puis séché au moyen d'un papier filtre.

En parallèle, nous avons préparé une solution d'huile essentielle, en transvasons 0,1 g d'huile essentielle dans 15 ml d'éthanol, après, nous l'avons versé dans le tube puis introduit dans le polarimètre afin de le confronter à la lumière polarisée. La valeur de l'angle de rotation du plan est ainsi mesurée et lue sur l'oculaire de l'appareil. Le pouvoir rotatoire est calculé par la relation suivante :

$$\alpha_D^t = \frac{A}{l} \times 100$$

A : la valeur de l'angle de rotation, en milliradians et/ ou degrés d'angle ;

l : la longueur du tube utilisé, en mm.

II.4. Indice d'acide

Nous avons réalisé un dosage acido-basique. La solution titrante est la potasse alcoolique, que l'on a introduite dans la burette.

La solution titrée est préparée comme suit : nous avons introduit dans un erlenmeyer de 250ml dans l'ordre : 1g d'huile essentielle, 2,5ml d'éthanol et 3 gouttes de phénolphthaléine 1%.

Nous avons titré le contenu de l'erlenmeyer en ajoutant progressivement la potasse alcoolique jusqu'au virage de l'indicateur coloré. Nous avons noté le volume, VE, versé à l'équivalence. L'indice d'acide est calculé par la relation suivante :

$$IA = (V \times C \times 56,11) / m$$

V : volume en ml de KOH utilisé pour le titrage.

C : concentration exacte en mol/l de la solution de KOH.

m : masse en g de la prise d'essai

II.5. Indice d'ester

Nous avons introduit 1g d'HE, puis 12,5 ml de KOH 0,5N dans un ballon de 250 ml. Le ballon est adapté au réfrigérant et l'ensemble est porté à ébullition pendant 60 min, à compter de l'apparition de la première goutte. Après refroidissement, nous avons ajoutés 10 ml d'eau distillée et 3 gouttes de phénolphthaléines au mélange.

Nous avons titré cette solution avec HCl en solution aqueuse 0,5 N sous agitation continue. Au virage de la coloration le volume V1 versé a été soigneusement noté.

En même temps, il été nécessaire de faire un témoin dans les mêmes conditions. Ainsi, 12,5 ml de KOH (0,5 N) sont bouillis pendant une heure dans un ballon de 250 ml. Après refroidissement, nous avons ajouté 10 ml d'eau distillée et 3 gouttes de phénolphthaléine. Ensuite, Nous avons titré cette solution avec HCl en solution aqueuse 0,5 N sous agitation continue. Au virage de la coloration le volume V0 versé a été soigneusement noté, l'indice d'ester est calculé par la relation suivante :

$$IE = (28,05 \times (V0 - V1) / m) - IA$$

V0 : volume en ml de HCl 0,5 N utilisé pour l'essai à blanc.

V1 : volume en ml de HCl 0,5 N utilisé pour la prise d'essai.

m : masse en g d'huile essentielle.

IA : valeur de l'indice d'acide.

III. Méthodes d'analyse des huiles essentielles

III.1. Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)

Les huiles essentielles extraites sont d'abord injectées sur un Chromatographe gazeux GC pour une meilleure analyse semi-qualitative, puis analysées par Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS.

Condition opératoires de la GC:

Mode d'injection : splitless ;

- Température détectée : 220°C ;
- Température d'injection : 300°C ;
- Volume injectée : 0,5µl ;
- Colonne utilisée : HP5-MS;
- Programmation du four : [60°C/8mn-4°C/mn-250°C/20mn] ;
- Débit gaz vecteur : 0,5µl/mn.

III.2. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-MS

Chacune des huiles essentielles récupérées par les différents procédés a été injectée sur une colonne capillaire apolaire HP5-MS placée dans un appareil de chromatographie gazeuse de marque Hewlett Packard 6890 et par couplage de celui-ci à la spectrométrie de masse (appareil Hewlett Packard 5973A). Le tableau I.6 montre les conditions opératoires de ces analyses.

Un mélange d'alcane (C5-C34) a été injecté en GC/MS sous les mêmes conditions afin de calculer les indices de rétention des différents constituants.

L'analyse qualitative est effectuée par la comparaison des indices de rétention (I_r) calculés selon Van Den Dool (équation ci-dessous) et les spectres de masse donnés par les banques de données NIST et Adams [7, 8].

$$I_r = 100z + 100n [(t_{R(x)} - t_{R(z)}) / (t_{R(z+1)} - t_{R(z)})]$$

$t_{R(x)}$: temps de rétention du soluté étudié

$t_{R(z)}$: temps de rétention de l'alcane à (z) atomes de carbone qui précède (x).

$t_{R(z+1)}$: temps de rétention de l'alcane à (z+n) atomes de carbone qui suit (x).

n : différence du nombre d'atomes de carbone entre les 2 alcanes (n=1 généralement).

Chapitre III : Matériels et méthodes

Tableau III.2. Conditions d'analyse par GC-MS

Colonne capillaire	HP5-MS
Longueur	30m
Diamètre interne	0,25mm
Epaisseur de phase	0,25µm
Température de détecteur (FID)	230°C
Gaz vecteur	Hélium
Débit	0,5ml/mn
Température de l'injecteur	280°C
Programmation de four	60°C durant 8 minutes
	De 60°C à 250°C à raison de 4°/1minute
	Reste 250°C pendant 20 minutes
Concentration de l'échantillon	Pur
Quantité injectée	0,3µl
Mode d'injection	Splitless
Mode de détection	Impact électronique
Mode de balayage	Scan

IV. Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *S. officinalis* L.a été réalisé ont utilisant le test de piégeage des radicaux libres DPPH (1,1 diphényl-2picryl-hydrazyl),selon le protocole décrit par Brand-Williams et al[9].

Une solution de 25 µl de différentes concentrations (200, 400, 600, 800 et 1000 mg/L) des HE dans le méthanol ont été ajoutés à une solution méthanolique de DPPH (60 M, 975 L). Les solutions standard ont été agitées vigoureusement et stockées dans l'obscurité pour incuber pendant 30 minutes à température ambiante. La densité optique a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Optizen 3220).

Un antioxydant synthétique butyl hydroxyl toluène (BHT) (20, 25, 50, 100 et 200 mg/L) a été utilisé comme solution standard. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été calculé comme suit :

$$AA\% = [(Abs \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}) / Abs \text{ contrôle}] \times 100$$

A contrôle : absorbance de la réaction de contrôle contenant tous les réactifs sauf l'extrait.

A échantillon : absorption de l'échantillon contenant une dose de l'extrait à tester.

V. L'activité antibactérienne

Les souches bactériennes et fongiques suivantes ont été utilisées dans les tests antimicrobiens : deux bactéries Gram-positives (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P) et deux bactéries Gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 43300), deux champignons filamenteux (*Umbelopsis ramanniana* NRRL1829, *Aspergillus carbonarius* M333) et une levure (*Candida albicans* ATCC 10259). L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur disque [10]. Les suspensions ajustées ont été tamponnées sur les surfaces de gélose Muller Hinton (pour les bactéries) et de gélose Sabouraud (pour les champignons filamenteux et les levures), puis sur des disques de papier filtre de 6 mm. Ont été imbibés de 20 µL d'huile essentielle qui ont été déposés sur les boîtes ensemencées. Les boîtes de Pétri ont été conservées pendant 2 h à 4°C, puis incubées pendant 24 h à 37°C dans le cas des bactéries, tandis que les champignons filamenteux et les levures ont été incubés à 25°C pendant 48 h.

L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (y compris le diamètre du disque de 6 mm) de la souche de micro-organisme testée avec l'huile. Des tests en triple ont été effectués dans toutes les expériences et les valeurs moyennes avec les écarts types respectifs sont tracées dans chaque cas. Les antibiotiques amoxicilline et lamidaz® (= chlorhydrate de terbinafine) dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 25 µg/mL ont servi de témoins positifs pour les bactéries et les champignons, respectivement. Du DMSO stérile a été utilisé comme contrôle négatif.

VI. Méthodes d'extractions des polyphénols

VI.1. Macération à froid (MAF)

La macération à froid (MAF) consiste à mettre dans un récipient quelques grammes de la matière végétale déjà séchée et finement broyée puis on ajoute le solvant. Le mélange est laissé à l'abri de la lumière pendant quelques heures (48 ou 72 heures). En filtrant le mélange, on obtient un filtrat qui va être passé par la suite dans un rota vapeur à 40°C pour éliminer le solvant et récupérer l'extrait brute.

VI.2. Macération assistée par micro-ondes (MAMO)

Pour la macération assistée par micro-ondes (MAMO), la technique est la même sauf que la différence réside dans l'étape de l'infusion remplacée par un passage du mélange (solvant + matière végétale) dans le four à micro-ondes durant 30 à 45 minutes selon la matière végétale traitée. Le mélange est ensuite filtré et passé dans le rota vapeur.

VI.3. Macération assistée par ultrasons (MAU)

Dans un erlenmeyer, on immerge, 10g d'échantillon dans 100 ml de solvant (méthanol, éthanol ou acétate d'éthyle). ce récipient est placé dans un appareil générateur d'ultrasons (type 710 DH, Prolabo) d'une fréquence de 40Hz, contenant de l'eau froide maintenue à une température comprise entre 25-28⁰ C. le milieu est ensuite agité pendant 4h à une puissance entre 60 et 80W. L'extrait final est ensuite filtré, puis concentré pour éliminer le solvant, et conservé jusqu'à utilisation.

VII. Analyse quantitative des extraits

VII.1. Dosage des polyphénols totaux

Dans un tube à essai, on introduit 0,25 ml d'extrait et 1,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1 ml de folin-ciocalteu dilué à 10 avec de l'eau distillée). On agite vigoureusement puis, trois minute après, on ajoute 1 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 : 7,5 %) et on incube à l'abri de la lumière et à une température ambiante pendant 30 mn. L'absorbance est mesurée à 764 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide gallique comme standard, les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec de la plante (mg EAG/g Ps).

VII.2. Dosage des flavonoïdes totaux

1 ml de la solution d'extraits est ajouté à 1 ml d' AlCl_3 à 2% dans le méthanol, le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'abri de la lumière et une température ambiante pendant 1 heure, l'absorbance est lue à 430 nm.

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g Ps).

IV. Evaluation de l'activité antioxydante

IV.1.1. Test de DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]) est un radical libre relativement stable à température ordinaire, de couleur violette et qui présente une bande d'absorption maximale à 517 nm dans le méthanol. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), il est réduit en 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPHH) et change de couleur en virant au jaune (Figure III.4.). La réduction du DPPH[•] est suivie par la mesure de la diminution de son absorbance à 517 nm, selon le protocole décrit par Brand-Williams et al. (1995)[9].

IV.1.2. Test d'ABTS

La méthode d'ABTS est basée sur l'évaluation du degré de la réduction du radical cation d'ABTS (vert) obtenu par oxydation avec du persulfate de potassium pendant 12-16 h à 4° C à l'abri de la lumière[24]. Le jour de l'analyse la solution d'ABTS^{•+} sera diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Après l'addition d'une solution de 25 µL d'échantillon à 1 mL de la solution d'ABTS^{•+}, la diminution de l'absorbance sera mesurée après 7 min à 734 nm dans le spectrophotomètre. L'ABTS^{•+} est utilisé comme témoin négatif et le TROLOX comme témoin positif.

Etude des feuilles d'olivier « *Olea europaea* L. »

I. Matériel végétal et extraction

I. 1. Matériel végétal

L'étude a été menée sur des feuilles d'olivier des deux variétés Chemlal et Limli de la région de Tizi Ouzou. Les échantillons ont été collectés d'une manière aléatoire et à partir de plusieurs arbres. La récolte des feuilles d'olivier a été effectuée pendant les mois Mai-Juin 2014.

L'identification a été faite par le laboratoire de biologie végétale (Faculté de biologie, Université des sciences des de la technologie Houari Boumediene). Les feuilles d'olivier collectées ont été séparées puis nettoyées, séchées à température ambiante et à l'ombre pendant 2 semaines.

I. 2. Méthodes d'extractions des polyphénols

Pour parvenir à des extraits riches en polyphénols, il est important de développer des méthodes d'extraction efficaces conduisant à des rendements élevés. Le choix de la méthode d'extraction et l'optimisation de ses paramètres ont fait l'objet de nombreuses études [11,12]. Des méthodes conventionnelles (macération à froid) et non-conventionnelles (macération assistée par micro-onde) et macération assistée par ultrasons sont utilisés pour extraire les polyphénols sous des conditions d'extraction sans cesse améliorées.

I.2.1. Macération à froid (MAF)

La macération à froid (MAF) consiste à mettre dans un récipient quelques grammes de la matière végétale déjà séchée et finement broyée puis on ajoute le solvant. Le mélange est laissé à l'abri de la lumière pendant quelques heures (48 ou 72 heures). En filtrant le mélange, on obtient un filtrat qui va être passé par la suite dans un rota vapeur à 40°C pour éliminer le solvant et récupérer l'extrait brute [13].

I.2.2. Macération assistée par micro-ondes (MAMO)

Pour la macération assistée par micro-ondes (MAMO), la technique est la même sauf que la différence réside dans l'étape de l'infusion remplacée par un passage du mélange (solvant + matière végétale) dans le four à micro-ondes durant 30 à 45 minutes selon la matière végétale traitée. Le mélange est ensuite filtré et passé dans le rota vapeur [14].

I.2.3. Macération assistée par ultrasons (MAU)

Dans un erlenmeyer, on immerge, 10g d'échantillon dans 100ml de solvant (méthanol, éthanol ou acétate d'éthyle). Ce récipient est placé dans un appareil générateur d'ultrasons (type 710 DH, Prolabo) d'une fréquence de 40Hz, contenant de l'eau froide maintenue à une température comprise entre 25-28°C. Le milieu est ensuite agité pendant 4h à une puissance entre 60 et 80W. L'extrait final est ensuite filtré, puis concentré pour éliminer le solvant, et conservé jusqu'à utilisation.

Les conditions opératoires sont illustrées dans le **tableau III.2**

Chapitre III : Matériels et méthodes

Tableau III.3. Conditions opératoires des différentes techniques d'extraction utilisées

Variété	Chemlal			
Méthode d'extraction	Masse (g)	Temps d'extraction	Puissance (Watt)	Solvant
Macération à froid (MAF)	10	72h	-	1. Méthanol 2. Ethanol 3. Acétate d'éthyle
Macération assistée par micro-ondes (MAMO)	10	45min	374	1. Méthanol 2. Ethanol 3. Acétate d'éthyle
Macération assistée par Ultrasons (MAU)	10	4h		1. Méthanol 2. Ethanol 3. Acétate d'éthyle
Variété	Limli			
Méthode d'extraction	Masse (g)	Temps d'extraction	Puissance (Watt)	Solvant
Macération à froid (MAF)	10	72h	-	1. Méthanol 2. Ethanol 3. Acétate d'éthyle
Macération assistée par micro-ondes (MAMO)	10	45min	374	1. Méthanol 2. Ethanol 3. Acétate d'éthyle
Macération assistée par Ultrasons (MAU)	10	4h		1. Méthanol 2. Ethanol 3. Acétate d'éthyle

II. Screening phytochimique des principales familles chimiques

Le screening phytochimique ou le criblage phytochimique permet de révéler de manière qualitative à travers des réactions physico-chimiques, les différentes familles chimiques contenus dans un organe végétal ou son extrait. Cette étude a nécessité divers réactifs. La mise en évidence des stérols et des terpènes s'est faite grâce à la réaction de Liebermann. Les composés appartenant au groupe des tanins ont été montrés grâce à la réaction de Stiasny. La recherche des saponosides est basée sur la propriété qu'ont les solutions aqueuses contenant des saponosides de mousser après agitation[15,16].

Chapitre III : Matériels et méthodes

Tableau III.4 : Protocoles opératoires

Familles chimique	Protocole opératoire
Terpènes et stérols	Introduire dans un erlenmeyer environ 1g de poudre et 20ml d'éther. Boucher, agiter et laisser en contact pendant 24 heures. Après ce temps, filtrer et compléter à 20ml avec de l'éther Caractérisation par la réaction de Liebermann-Buchard Evaporer à sec dans une capsule 10ml d'extrait. Dissoudre le résidu dans 1ml d'anhydride acétique avec 1ml de chloroforme et recueillir la solution dans un tube à essais. Ajouter 1 à 2 ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube à essais à l'aide d'une pipette pasteur et ne pas agiter. La formation d'un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides et la coloration verte ou violette de la couche surnageante révèlent la présence de terpènes et stérols.
Tanins	Introduire dans un tube à essais 5ml d'infusé à 5% et ajouter 1ml de solution aqueuse diluée de FeCl₃ à 1%. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.
Saponosides	Préparation du décocté à 1% : A l'aide d'un erlenmeyer de 250ml, faire une décoction de 1g de poudre dans 100ml d'eau distillée. Chauffer pendant 15 minutes tout en maintenant une ébullition modérée. Filtrer après refroidissement et ajuster à 100ml. Caractérisation des saponosides : Introduire dans un tube 5 ml d'HCl à 0,1 N, introduisez dans un deuxième tube 5 ml de NaOH à 0,1N, puis rajouter dans chacune d'elle 2 à 3 gouttes d'infusé à 1%. La formation de mousses indique la présence des saponosides.
Alcaloïdes	Réaction de Bouchardat : Faire macérer 5 g de poudre végétale humectée avec de l'Ammoniaque (0,5N) pendant 24 heures. Filtrer, puis mélangé avec 50ml d'un mélange éther chloroforme (3 : 1) v/v. Le filtrat est épuisé par l'HCl 2N. A la phase aqueuse rajouter quelques gouttes de réactif de Réactif de Bouchardat (iodo-ioduré : 2 g d'iode + 2 g Iodure de potassium + 100 ml d'eau distillée). La réaction est positif s'il ya apparition d'une coloration Rouge à brun rougeâtre.

III. Analyse quantitative des extraits

III.1. Dosage des polyphénols totaux

Principe

Le taux des polyphénols totaux ont été déterminés par un spectrophotomètre UV-visible (OPTIZEN POP) selon la méthode de Folin-Ciocalteu [17]: ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés [18].

Mode opératoire

Dans un tube à essai, on introduit 0,25 ml d'extrait et 1,25 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1 ml de folin-ciocalteu dilué à 10 avec de l'eau distillée). On agite vigoureusement puis, trois minute après, on ajoute 1 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 : 7,5 %) et on incube à l'abri de la lumière et à une température ambiante pendant 30 mn. L'absorbance est mesurée à 764 nm contre un blanc.

Une courbe d'étalonnage est préparée en utilisant l'acide gallique comme standard, les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec de la plante (mg EAG/g Ps).

III.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode du trichlorure d'aluminium AlCl_3 légèrement modifiée a été adoptée pour quantifier les flavonoïdes dans les différents extraits [19].

Mode opératoire

1 ml de la solution d'extraits est ajouté à 1 ml d' AlCl_3 à 2% dans le méthanol, le mélange est vigoureusement agité, puis l'ensemble est incubé à l'abri de la lumière et une température ambiante pendant 1 heure, l'absorbance est lue à 430 nm.

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard, la quercétine.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de poids sec de la plante (mg EQ/g Ps).

IV. Evaluation des activités biologiques

IV.1. Activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être évaluée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la potentialité antioxydante de l'échantillon à tester [20]. Deux tests chimiques ont été utilisés : le test de DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) et le test d'ABTS sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique).

IV.1.1. Test de DPPH

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]) est un radical libre relativement stable à température ordinaire, de couleur violette et qui présente une bande d'absorption maximale à 517 nm dans le méthanol. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), il est réduit en 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPH-H) et change de couleur en virant au jaune (Figure III.4.). La réduction du DPPH[•] est suivie par la mesure de la diminution de son absorbance à 517 nm, selon le protocole décrit par Brand-Williams et al. (1995)[9].

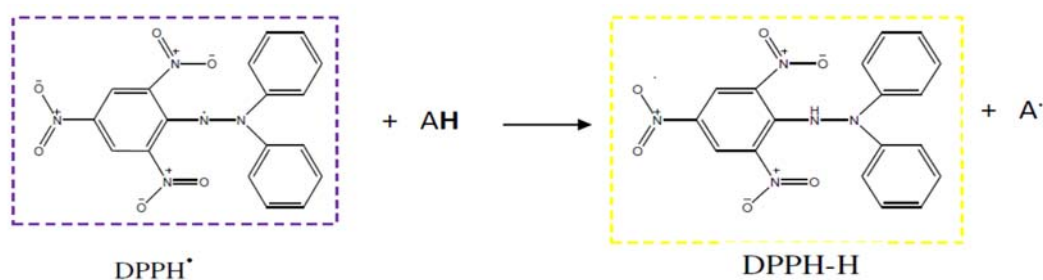


Figure III.4. Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant (AH)

Mode opératoire

975 µl de solution méthanolique de DPPH (0,0024 g de DPPH dans 100 ml de méthanol ou éthanol) et ajouté à 25 µl de la solution d'extraits à diverses concentrations (5-300 mg/l), le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 mn.

Le blanc est représenté par le méthanol, le témoin négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique de DPPH, le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard : le BHT.

La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (OPTIZEN POP).

Le pourcentage d'inhibition (AA%) du radical libre DPPH a été calculé avec la formule suivante :

$$AA\% = [(Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{échantillon}}) / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Où :

$A_{\text{contrôle}}$: absorbance de la réaction de contrôle contenant tous les réactifs sauf l'extrait.

$A_{\text{échantillon}}$: absorption de l'échantillon contenant une dose de l'extrait à tester.

IV.1.2. Test d'ABTS

Le radical cation (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6- sulfonique) ($ABTS^{•+}$), de couleur bleu vert (absorbant à 734 nm), est formé par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS en présence de persulfate de potassium [21]. L'addition d'un antioxydant (donneur de $H^{\bullet}$) à une solution de ce radical cation entraîne sa réduction, l'atome d'azote concerné piège un $H^{\bullet}$, conduisant à l' $ABTS^+$, ce qui provoque la décoloration du mélange et une diminution de l'absorbance [22](Figure III.5).

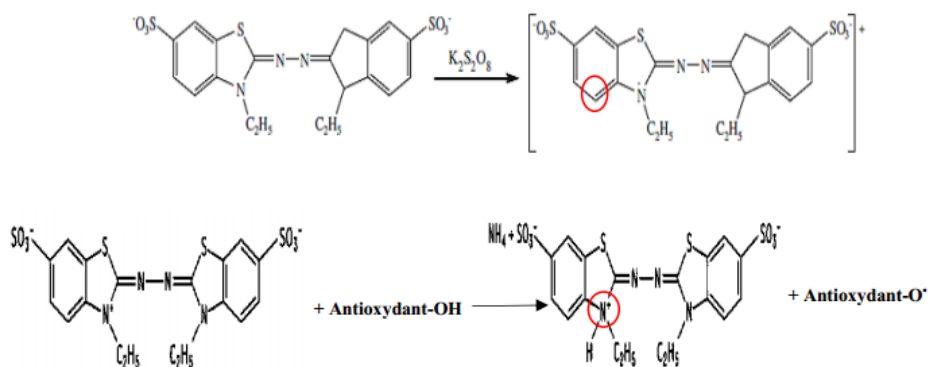


Figure III.5. Génération et piégeage du radical $ABTS^{•+}$ par un antioxydant donneur de H^+ [23]

La méthode d'ABTS est basée sur l'évaluation du degré de la réduction du radical cation d'ABTS (vert) obtenu par oxydation avec du persulfate de potassium pendant 12-16 h à 4° C à l'abri de la lumière [24]. Le jour de l'analyse la solution d'ABTS ^{•+} sera diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734nm.

Après l'addition d'une solution de 25 µL d'échantillon à 1mL de la solution d'ABTS ^{•+}, la diminution de l'absorbance sera mesurée après 7min à 734 nm dans le spectrophotomètre. L'ABTS ^{•+} est utilisé comme témoin négatif et le TROLOX comme témoin positif.

IV.2.L'activité antibactérienne

Méthode de diffusion sur disque

L'activité antibactérienne des extraits bruts a été évaluée selon la méthode de diffusion sur disque décrite par Bauer et coll (1966)[10].

Les échantillons ont été testés contre deux bactéries à Gram ⁺: *Bacillus subtilis* ATCC6633 et *Staphylococcus aureus* MRSA 639c et deux bactéries à Gram ⁻ : *Escherichia coli* ATCC43300 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ainsi que deux champignons pathogènes: *Aspergillus carbonarius* M333et *Umbulopsis ramanniana* NRRL1829.

Les souches bactériennes et fongiques ont été cultivées dans des géloses Mueller-Hinton (MH) à 37 ° C et de la gélose de Sabouraud (SDA : Sabouraud dextrose agar) à 30° C respectivement. L'amoxicilline (25 µg / disque) a été utilisée comme contrôle positif, tandis qu'un disque imprégné de 25 µL de DMSO a été considéré comme le contrôle négatif.

Les milieux d'agar appropriés (MH ou SDA) ont été versés dans des boîtes de Petri puisensemencés avec les cultures d'inoculum microbien (10^6 UFC.mL⁻¹) en utilisant un écouvillon stérile. Un volume de 25 µL de l'extrait dilué dans le DMSO a été ajouté sur les disques stérilisés placés à la surface des boîtes de Petri. Les boîtes de Petri ont été incubées pendant 24 h pour les souches de bactéries et 48 h pour les souches de champignons, après un temps de diffusion d'une heure à 4°C. L'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition.

V. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les extraits présentant une activité antibactérienne ont été sélectionnés pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice par microdilution en bouillon conformément aux directives du Comité national de Normalisation des Laboratoires Cliniques [25]. Des dilutions en série comprises entre 7,8 et 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été réalisées à partir d'une solution initiale préalablement préparées dans du DMSO à une concentration de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Chaque solution de l'extrait (0,5 ml) a été ajoutée à un milieu d'agar (5 ml) (MH ou SDA). Le mélange obtenu a été versé dans des boîtes de Petri qui ont été inoculées avec des souches d'inocula de 10^6 CFU. mL^{-1} et incubé immédiatement à 37°C pendant 24 heures pour les souches de bactéries et 48 heures pour les souches de champignons. L'amoxicilline et le DMSO ont servi de contrôle positif et négatif respectivement. Les tests ont été effectués en triple.

VI. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'étude expérimentale a été réalisée selon la méthode décrite par Colot et al (1972) et basée sur celle de Winter et al (1962) [26,27]. Elle consiste à évaluer la capacité de l'extrait testé à inhiber l'œdème provoqué par l'injection de la carragénine (1%) sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souris.

L'étude a été réalisée sur des souris albinos de sexe mâle pesant 25 g. Ces dernières ont été alimentées avec des granulés « O.N.A.B » et hydratées avec l'eau du robinet jusqu'à satiété et ce jusqu'à la veille de l'expérience où elles ont été maintenues à jeun (pendant 12H).

Les souris ont été élevées et maintenues dans des conditions expérimentales constantes ($20 < T^{\circ} < 24$; humidité : $50 \pm 5\%$, éclairage : 10 H/jour).

L'antalgique ACEPRAL (acide acétylsalicylique) à 500 mg commercialisé par SAIDAL a été utilisé en tant que référence.

En se basant sur le protocole opératoire, chaque souris reçoit 1 mg d'ACEPRAL qui est considéré comme étant la quantité suffisante pour soulager. Cette quantité est dissoute dans 0.5 mL d'eau distillée (le volume administré à une souris).

Le poids moyen est de 25 g, donc la dose efficace est de 1mg /25 g de poids corporel ce qui correspond à 40 mg.kg^{-1} .

Chapitre III : Matériels et méthodes

Un comprimé d'ACEPRAL est broyé à l'aide d'un mortier puis dissout dans 250 mL d'eau distillée et mélangé sous agitation magnétique pendant 10 minutes puis soumise à homogénéisation avant d'être administré.

Les doses testées sélectionnées sont 500,1000 et 2000 mg.kg⁻¹. Chaque extrait a été dissous dans de l'eau distillée.

Différents lots comprenant chacun 6 souris ont été constituées et identifiées comme suit :

Lot de référence (1) : Chaque souris reçoit 0.5 mL de la solution d'ACEPRAL à la dose de 40 mg.kg⁻¹

Lot du témoin (2) : Un volume de 0.5 mL d'eau distillée a été administré à chaque souris

Lot des essais : L'injection de 0.5 mL de l'extrait a été injecté à chaque souris en fonction des doses préalablement établies . Les lots 'essai' notés 3, 4, 5 ont reçus respectivement les doses de 500, 1000 et 2000 mg.kg⁻¹.

Une solution de carragénine (0.025 ml) a été injectée à toutes les souris 30 minutes après l'administration des différentes solutions. Quatre heures plus tard, les animaux ont été sacrifiés par rupture de la nuque afin de permettre la dissection des pattes à hauteur des articulations. La pesée a été réalisée sur une balance analytique.

La figure 14 représente des photographies des étapes expérimentales de l'activité anti inflammatoire.



Photographie 1 : Administration des solutions par gavage.



Photographie 2 : Injection de la solution de carragénine.

Figure III.6. Photographies montrant les étapes expérimentales de l'activité anti inflammatoire

Chapitre III : Matériels et méthodes

L'expression des résultats a été réalisée suivant ces deux équations :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{Moyenne des poids de la patte gauche} - \text{Moyenne des poids de la patte droite}}{\text{Moyenne des poids de la patte droite}} \times 100$$

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème du témoin} - \% \text{ de l'œdème de l'essai}}{\% \text{ d'œdème témoin}} \times 100$$

VII. Analyse par Chromatographie liquide ultra-haute performance-spectrométrie de masse (UHPLC-DAD-ESI / MSn)

Pour l'analyse UHPLC-DAD-ESI / MSn, 100 mg de chaque extrait polyphénolique ont été dissous dans 5 ml d'éthanol (concentration finale, 20 mg / ml) et les solutions résultantes ont été filtrées à travers une membrane en nylon de 0,2 µm (Whatman). L'analyse a été réalisée à l'aide d'un Thermo Scientific Ultimate 3000RSLC (Dionex) équipé d'un détecteur à barrette de diodes Dionex UltiMate 3000 RS et couplé à un spectromètre de masse. La colonne utilisée était une colonne d'or hypersil thermo-scientifique (100 mm x 2,1 mm) d'une taille de pièce de 1,9 µm et sa température était maintenue à 30 ° C. La phase mobile était composée de (A) acétonitrile et (B) 0,1% d'acide formique (v / v), à la fois dégazés et filtrés avant utilisation. Le débit était de 0,2 ml / min. Le gradient de solvant a commencé avec 5% de solvant B sur 14 min suivi de 40% de solvant B pendant 2 min, 100% sur 7 min et enfin 5% sur 10 min. Le volume d'injection était de 2 µL. Les données spectrales UV-vis ont été recueillies dans une plage de 250 à 500 nm et les profils chromatographiques ont été documentés à 280 nm. Le spectromètre de masse utilisé était un piège à ions linéaire LTQ XL 2D équipé d'une source d'ions électrospray orthogonale (ESI).

L'équipement a été utilisé en mode ion négatif avec une source d'ionisation par électrospray de 5,00 kV et une température de capillarité ESI de 275 ° C. Le balayage complet a couvert une plage de masse de 50–2000 m / z. Des expériences de dissociation induites par collision MS / MS et MSn ont été acquises simultanément pour les ions précurseurs. Trios analyses indépendants ont été réalisées pour la reproductibilité.

1. M. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja, (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydrodistillation. *J of Chroma A*, 1043(2), 323-7, 7.
2. E.E. Stashenko, B.E. Jaramillo, J.R. Martinez. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J of chroma A*, 1025(1), 93-103.
3. M.E. Lucchesi, F. Chemat, J. Smadja. (2004). Solvent free microwave extraction of essential oils from aromatic herbs: Comparison with conventional hydro-distillation. *J of Chroma A*, 1043(2), 323-327.
4. M. Lucchesi. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Doctorat en Chimie. Paris.
5. Pharmacopée européenne, 3^{ème} édition, 1997, Tome 1, 57-62.
6. D. Didier. Huiles essentielles, Monographie relative aux huiles essentielles (A à G), 6^{ème} Ed, AFNOR 2000, Tome 2, vol, 1, 180-219.
7. Nist. 2005–2008. Standard Reference Database 1A, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program, Data Versions: NIST 05 and NIST 08.
8. R.P. Adams. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4th edn, Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
9. A. Bucic'-Kojic, M. Planinic, S. Thomas, M. Bilic, D.Velic.' (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* 81, 236–242
10. R. Canals, M. Llaudy, J. Valls, J. Canals, F. Zamora. (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skins and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J of Agr and Food Chem*, 53, 4019-402
11. S. Jokic, D. Velic, M. Bilic, A. Bucic-Kojic, M. Planinic, Tomas. S. (2010). Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. *Czech J of Food Sci*, 28(3), 206-212.
12. H.W. Wang, Y.Q. Liu, S.L. Wei, Z.J. Yan, K. Lu. (2010). Comparison of microwave-assisted and conventional hydrodistillation in the extraction of essential oils from mango (*Mangifera indica* L.) flowers. *Molecules*, 15(11), 7715-7723,

13. N. Dohou, K. Yamni, S. Tahrouch, L.M.I. Hassani, A. Bodoc, N. Gmira. (2003). Screening phytochimique d'une endémique Ibero-marocain, *Thymelaea lytroides*. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 142: 61- 78.
14. J. Bruneton, (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème Edition. Lavoisier, Paris, 1288 p.
15. V.L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *In Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
16. N. Boizot, J.P. Charpentier. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le cahier des techniques de l'INRA, In Numéro spécial* 79-82.
17. I. Kosalec, M. Bakmaz, S. Pepeljnjak, S.A.N.D.A. Vladimir-Knezevic, (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharma*, 54(1), 65-72.
18. C. Sanchez-Moreno. (2000). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci and Tech Int*, 8(3) : 121 - 137.
19. W., Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT. Food Sci and Techn*, 28 (1): 25- 30.
20. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A., Pannala, M. Yang, C. Rice- Evans. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Bio and Med*, 26 (9-10): 1231- 1237.
21. E.J. Lien S. Ren, H.H. Bui, R. Wang. (1999). Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Med*, 26 (3-4) : 285-294.
22. S., De Oliveira, G. A. De Souza, C. R. Eckert, T. A. Silva E. S. Sobral, O.A. Favero, J. P. Ferreira, P. Romoff, W. J. Baader. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quimica Nova*, 37 (3) : 497- 503. 56
23. J. Scalzoa, A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzetti, M. Battino. (2005). Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 21, 2, 207- 213.
24. A.w. Bauer, (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* 45, 149-158.

25. Comité national des normes de laboratoire clinique. NCCLS (1997). Normes de performance pour le test de sensibilité aux disques antimicrobiens. 6e éd. Norme approuvée. M2-A6. Wayne.
26. C.A. Winter, E.A. Risley, G. W. Nuss. (1992). Œdème induit par la carraghénine dans la patte arrière du rat comme test pour les médicaments anti-inflammatoires. *Biologie expérimentale et médecine*. 111, 3.

Chapitre IV : Résultats et Discussion

Etude des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. :
Composition Chimique, Activité Anitoxydante et
Activité Antibactérienne

Etude des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L.: Composition Chimique, Activité Antioxydante et Activité Antibactérienne

I. Introduction

Dans ce chapitre, nous donnerons les résultats de l'extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. par les trois techniques citées précédemment (l'hydrodistillation classique (HD), hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO) et l'entraînement à la vapeur d'eau (EV)). Nous donnerons par la suite les résultats de l'analyse qualitative et semi-quantitative des différents échantillons et enfin les résultats de l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne, la discussion est orientée selon les techniques d'extraction et le temps de séchage.

II. Influence des techniques d'extraction sur le rendement et la composition chimique

II.1. Influence des techniques d'extraction sur le rendement

L'huile essentielle de *Salvia officinalis* extraite par HD, HDMO et EV se présente sous forme d'un liquide transparent et de couleur jaune claire et d'une odeur caractéristique camphrée. Le rendement a été calculé en rapportant la masse de l'huile essentielle extraite sur la masse de la matière végétale.

Les rendements obtenus par les trois méthodes sont donnés dans le **Tableau IV.1.** (Figure IV.1). Nous remarquons que le rendement obtenu par la technique HDMO (0,41%) est le double de celui obtenu par la méthode HD (0,22%) avec un temps d'extraction plus court qui est de 30 minutes au lieu de 180 min pour l'HD c'est à dire 6 fois plus réduit, ce qui a permis un gain de temps et d'énergie.

Tableau IV.1: Rendement des huiles essentielles de la sauge officinale

Technique d'extraction	Durée d'extraction	Masse (g)	Rendement(%)
HD	3h	300	0,22
HD-MO	30 min	300	0,41
EV	3 h	300	0,99

L'extraction par EV a donné le rendement le plus élevé (0,99%) qui est trois fois plus élevé que celui obtenu par HD (0,22%) après 3 heures d'extraction. Ce résultat indique que la technique d'extraction EV est la plus appropriée pour extraire l'huile essentielle de la sauge ce qui est en accord avec un travail réalisé sur le *Rosmarinus officinalis* [1]

II.3. Comparaison des rendements de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* obtenus dans différents pays.

Dans le **Tableau IV.2** sont regroupés à titre formel les rendements obtenus par HD pour la *Salvia officinalis* dans un certain nombre de pays.

Tableau IV.2: Rendements en HE de *Salvia officinalis* obtenus dans différents pays

Pays	Technique d'extraction	Durée d'extraction	Rendement (%)	Référence
Ce travail	HD	3h	0,22	--
Tunisie	HD	5h	0.78	[3]
Italie	HD	4h	0.29	[4]
Espagne	HD	3h	1.00	[5]
Liban	HD	4h	0.40	[6]

Il est intéressant de noter que la comparaison aux essences étrangères doit être prise avec précaution. En effet, au vu du nombre important de paramètres pouvant intervenir dans la composition des huiles essentielles, celle-ci ne peut-être que subjective.

A partir de ces valeurs nous remarquons que les valeurs obtenues pour les essences d'Algérie (0,22%) et d'Italie (0,29%) sont inférieures à ceux des autres pays. De plus nous constatons que les temps d'extraction sont différents, ce qui montre que l'espèce espagnole donne le meilleur rendement (1%). Cette variation dans les rendements peut être attribuée non seulement à l'origine de la plante et la durée de l'extraction mais également au cycle végétatif et la période de récolte qui peuvent avoir une influence directe sur le rendement et la qualité de l'essence.

II.4. Constantes physico-chimiques

Les valeurs des indices physico-chimiques calculés selon les normes AFNOR sont reportées dans le **Tableau IV.3**. On note les valeurs maximale et minimale de la densité respectivement pour les HE obtenues par HD et HDMO.

Tableau IV.3 : les constantes physico-chimiques des HE de la *Salvia officinalis*

Méthode Indice	HD	HDMO	EV	Référence [8,9]
Densité	0,929	0,945	0,909	0,910-0,922
Indice d'acide	1,643	1,504	1,820	1,340-1,925
Indice d'ester	49,020	43,120	38,060	8,220-10,250
Indice de réfraction	1,473	1,528	1,308	1,440-1,474
Pouvoir rotatoire	3,400	4,230	4,500	16,301-30,012

Nous constatons également que les valeurs de l'indice de réfraction ne sont pas très différents elles oscillent entre 1,3 et 1,5, cependant celles du pouvoir rotatoire des huiles essentielles obtenues par HDMO (4,23) et EV(4,50) sont nettement supérieures à celui de l'essence obtenue par HD (3,4).

Généralement les valeurs de la densité sont reliées à la teneur en composés monoterpéniques et celles de l'indice de réfraction au pourcentage des composés oxygénés. Pour le pouvoir rotatoire il dépend du pouvoir rotatoire spécifique du 1,8 cinéole et des monoterpènes majoritaires.

Pour ce qui des différences observées pour les valeurs des indices d'ester des huiles essentielles obtenues par HD (49,02) et HDMO (43,12), elle peut être expliquée par la faible durée d'extraction pour la technique HDMO ce qui a permis de protéger les huiles contre les réactions thermiques et hydrolitiques ayant lieu lors de l'exposition prolongée à la chaleur. En revanche, l'hydrodistillation conventionnelle (HD) à long chauffage peut conduire à l'estérification des acides et des alcools contenus dans l'HE.

Pour l'extraction par EV (38,06) le phénomène d'hydrolyse ne se manifeste pas comparé aux techniques précédentes étant donné que la matière végétale n'est pas en contact direct avec l'eau.

Les valeurs des paramètres physico-chimiques de nos HE sont en accord avec celles répertoriées dans les normes AFNOR [7].

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de ces huiles essentielles, c'est-à-dire leurs compositions chimiques.

II.5. Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues par les trois techniques d'extraction ont été analysées tout d'abord par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) sur la colonne capillaire HP5-MS. Pour une identification plus exhaustive, ces huiles essentielles ont été analysées, par la suite, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) sur la même colonne capillaire HP5-MS. Les conditions d'analyse ont été données dans le chapitre précédent.

L'identification des composés a été effectuée par comparaison des spectres de masse obtenus expérimentalement à ceux de références répertoriés dans les banques de données spectrales NIST et Willey, en se basant sur les huit premiers pics les plus intenses. Les indices de rétention ont été utilisés comme données filtre pour vérifier l'ordre d'élution des composés.

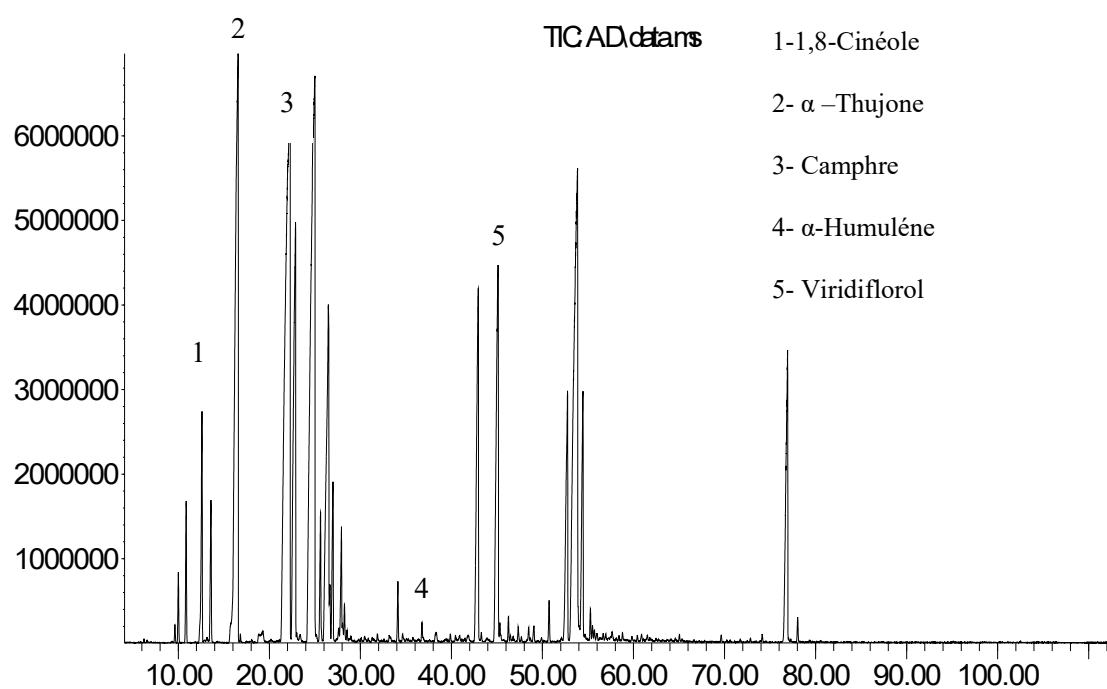
Pour ce qui de l'analyse semi-quantitative elle a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID) sur la colonne capillaire HP5-MS. Pour la détermination quantitative centésimale des constituants, nous avons admis que le détecteur à ionisation de flamme réagissait de manière sensiblement analogue à tous les composés et que leurs coefficients de réponse étaient tous égaux à l'unité.

La teneur de chaque constituant a donc été calculée à partir des aires fournies par l'intégrateur. Ceci est en conformité avec la norme AFNOR NF T 75-401 utilisée dans l'analyse des huiles essentielles.

Les chromatogrammes obtenus sur la colonne HP5-MS sont reportés dans les figures IV.1 à IV.3. Nous répertorions dans chaque chromatogramme une quarantaine de pics plus ou moins bien séparés dont certains correspondent à des composés en très faible concentration, ce qui complique d'avantage leur identification.

Nous remarquons également que les trois chromatogrammes ont de grande similitude et que la différence réside uniquement dans l'intensité de certains pics.

Abundance

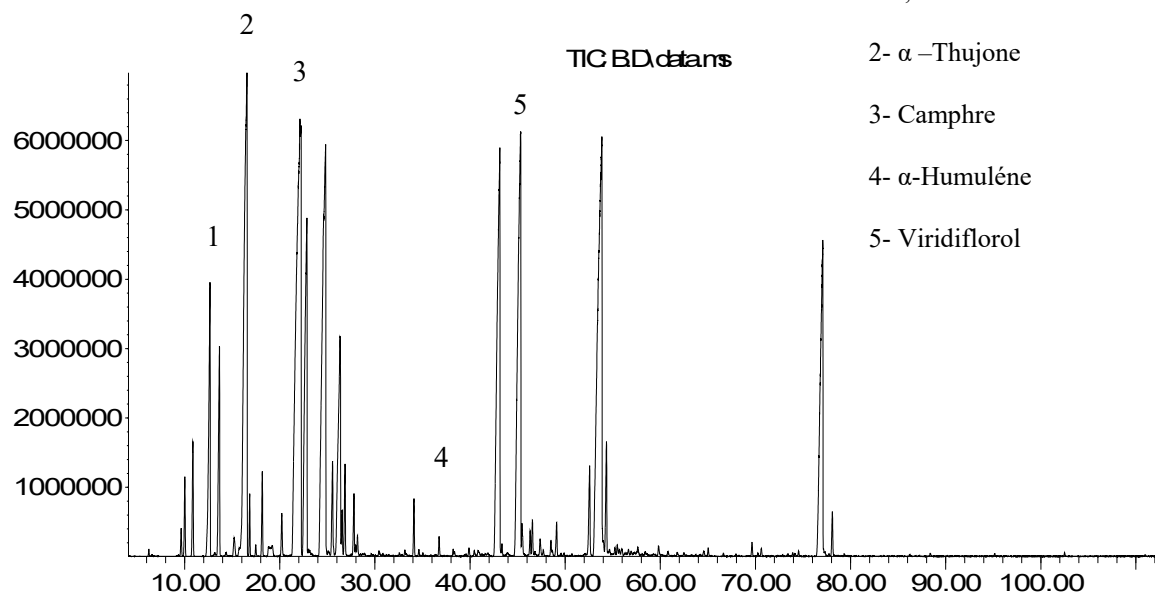


Time→

Figure IV.1 : Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Salvia officinalis* obtenue par HD

&

Abundance



Time→

Figure IV. 2: Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Salvia officinalis* obtenue par HDMO

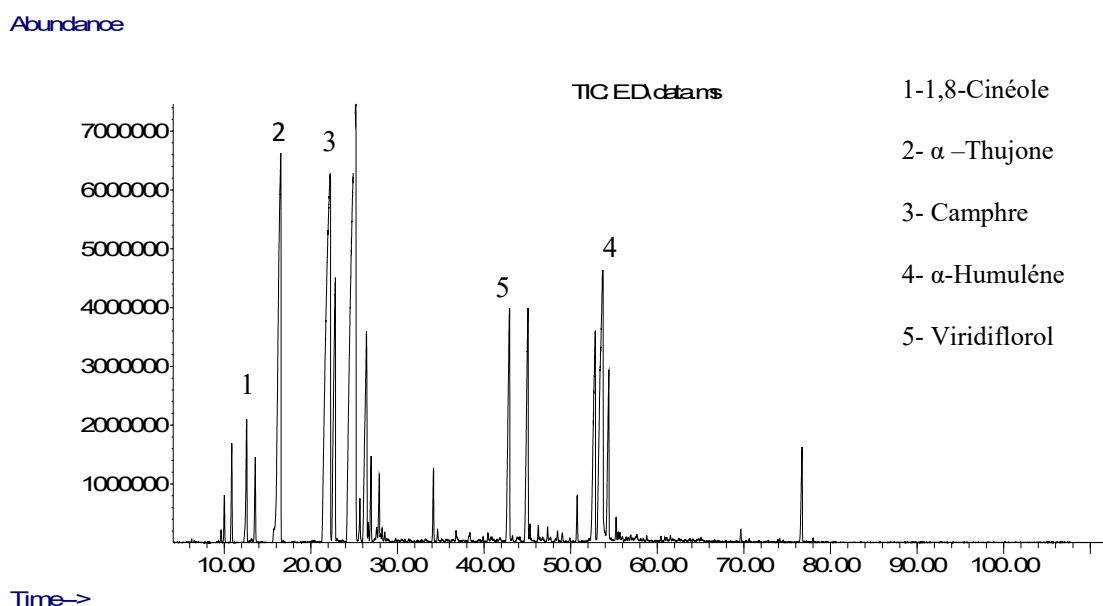


Figure IV. 3 : Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Salvia officinalis* obtenue par EV

II.5.1. Variation de la composition chimique en fonction de la méthode d'extraction

L'analyse des HES de la *Salvia officinalis* par GC-FID et GC-MS a permis d'identifier 25, 28 et 30 composés respectivement dans les échantillons obtenus par HD, EV et HDMO. Le taux d'identification pour chaque essence est de 98,17 % pour l'extrait obtenu par HD, de 96,17% l'échantillon obtenu par EV et de 99,3% l'HE obtenue par HDMO.

Dans le **Tableau. IV.4** sont reportés les indices de rétention et les pourcentages de phytoconstituants selon l'ordre d'élution sur la colonne HP5MS, ils sont donnés par famille chimique.

Tableau IV.4 : Composition chimique des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* obtenues par HD, HDMO et EV

Composés	I ^a	I ^b	HD ^c	HDMO ^c	EV ^c
Monoterpènes Hydrocarbures					
Tricyclène	909	926	0.18	0.10	0.10
α -Thujène	930	922	tr	0.30	Tr
α -Pinène	939	939	0.52	0.39	0.40
Camphène	965	954	0.83	0.85	0.92
β -Pinène	972	979	3.03	1.75	1.59
Myrcène	982	991	1.92	0.97	0.88
α -Phellandréne	1003	1001	tr	0.13	Tr
α -Terpinène	1020	1016	0.20	tr	Tr
Cis-Ocimène	1045	1040	0.33	0.04	Tr
γ -Terpinène	1060	1060	0.63	tr	Tr
α -Terpinolène	1091	1088	0.34	tr	Tr
Monoterpènes Oxygénés					
1,8-Cinéole	1032	1033	11.00	12.16	11.71
Cis-Sabinène hydrate	1071	1068	0.30	1.03	Tr
α-Thujone	1102	1102	15.80	17.56	17.92
β-Thujone	1114	1114	5.65	6.16	5.19
Camphre	1144	1143	10.70	16.02	23.95
Isobornéol	1156	1156	0.77	0.91	0.42
Bornéol	1160	1165	3.88	5.84	4.59
Pinocamphone	1167	1173	0.31	0.30	0.15
Terpinén-4-ol	1175	1177	0.67	1.20	0.84
α -Terpinéol	1187	1189	0.66	1.01	0.92
Verbenone	1205	1205	tr	0.28	0.18
Bornyl acétate	1290	1289	0.42	0.44	0.81
Sesquiterpènes Hydrocarbures					
β-Caryophyllène	1423	1420	8.50	4.48	4.56
α-Humulène	1456	1455	9.61	5.72	4.56
Sesquiphellandréne	1525	1524	0.26	0.11	0.10
Sesquiterpènes Oxygénés					
Elémol	1547	1549	tr	0.26	0.42
Caryophyllénoxyde	1585	1581	0.81	3.05	4.64
Viridiflorol	1595	1593	13.10	12.35	9.49
Humulène oxyde	1600	1600	2.59	2.40	2.59

Autres					
Cis-Salvéne	854	842	tr	0.16	Tr
Manool	2051	2056	6,44	3,79	1,21
Abietadiène	2088	2080	0.33	0.14	0.03
% Monoterpènes Hydrocarbonés			7.98	4.1	3.89
% monoterpènes Oxygénés			50.16	62.91	66.68
% sesquiterpène hydrocarbonés			18.37	10.31	9.22
% sesquiterpène Oxygénés			12.89	18.06	17.14
% Autres			6.77	3.93	1.24
Total identifié (%)			96.17	99.31	98.17

tr. traces <0.01%.

^aIndices de rétention de la littérature, colonne HP5MS.

^bIndices de rétention calculés, colonne HP5MS.

^cPourcentages des composés (air des pics sur HP5MS (GC-FID)).

Au regard des résultats de la composition chimique des différentes huiles essentielles nous remarquons que la classe des monoterpènes oxygénés est dominante dans les trois échantillons (HD : 50,16% ; HDMO : 62,91% et EV : 66,68%). Cependant on remarque que les essences obtenues par HDMO et EV sont plus riches en sesquiterpènes oxygénés (HD : 12,89% ; HDMO : 18,06% et EV : 17,14%), alors que les sesquiterpènes hydrocarbonés sont plus abondants dans l'extrait obtenu par HD (HD : 18,37% ; HDMO : 10,31% et EV : 9,22%).

Les principaux composés des huiles essentielles extraites par HDMO et EV sont : le Camphre (23,95 et 16,02 %), l' α -Thujone (17,92 et 17,56%), le 1,8-Cinéole (11,91 et 12,16%) et le β -Thujone (5,19 et 6,16 %). Pour l'huile essentielle extraite par la technique HD, les composés majoritaires sont : l' α -Thujone (15,80 %), le 1,8-Cinéole (11,00 %), le camphre (10,70 %) et le β -Thujone (5,65 %). Cette composition chimique est identique à celle relevée en littérature sur l'huile essentielle de la région méditerranéenne [10] ou à l'exception de l' α -pinène l' α -Thujone, le 1,8-Cinéole et le camphre) sont également majoritaires. De plus nos résultats sont en accord avec ceux de Dob et coll. Dans leur étude sur la feuille de sauge de la région d'Algérie des travaux antérieurs [11]

De plus, nous remarquons que le viridiflorol a une teneur relativement élevée dans les trois échantillons (HD : 13,10% ; HDMO : 12,35% et EV : 9,49%).

On note, également que l' α -Humulène et le β -Caryophyllène ont des teneurs élevées dans les HES obtenues par hydrodistillation respectivement 9,16% et 8,50%, alors que ce taux et

moins important pour les HES extraites par les deux autres techniques (pour l' α -Humulène (HDMO : 5,72% et EV : 4,56%) et pour le β -Caryophyllène (HDMO : 4,48% et EV : 4,56%)). L'étude sur l'HE originaire de Tunisie a montré la dominance de 1,8-Cinéole, l' α -Thujone, et le camphre ce qui montre une similitude composition avec nos échantillons [12].

Il est à noter que la famille principale dans les huiles essentielles extraite par les trois techniques est la famille de monoterpènes Oxygénés avec les trois composés majoritaires, le Camphre, l' α -Thujone et le 1,8-Cinéole. La famille des sesquiterpènes oxygénés avec le composé majoritaire, le Viridiflorol. Cependant, nous remarquons qu'il y a une différence qualitative et semi-quantitative dans leurs compositions chimiques.

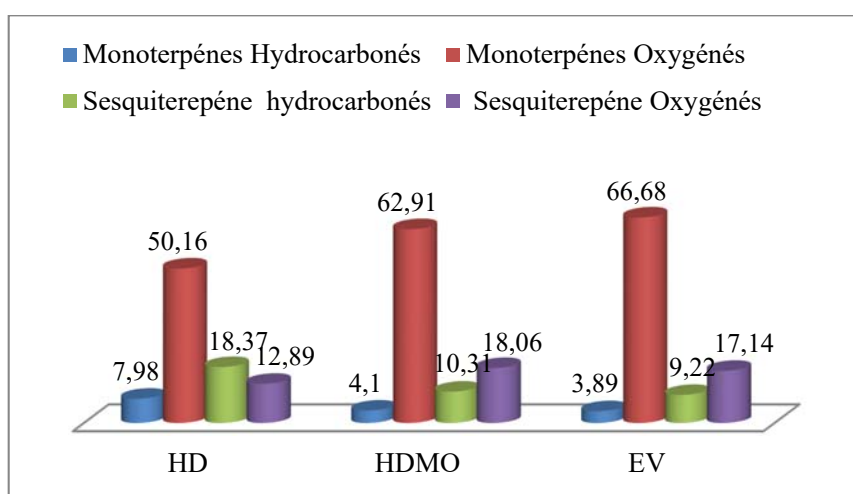


Figure IV.4: Pourcentage des familles chimiques de l'huile essentielle d'*Salvia officinalis* obtenues par HD, HDMO et EV

III. L'influence de la méthode de séchage sur le rendement et la composition chimique

III.1. Influence de la méthode de séchage sur le rendement

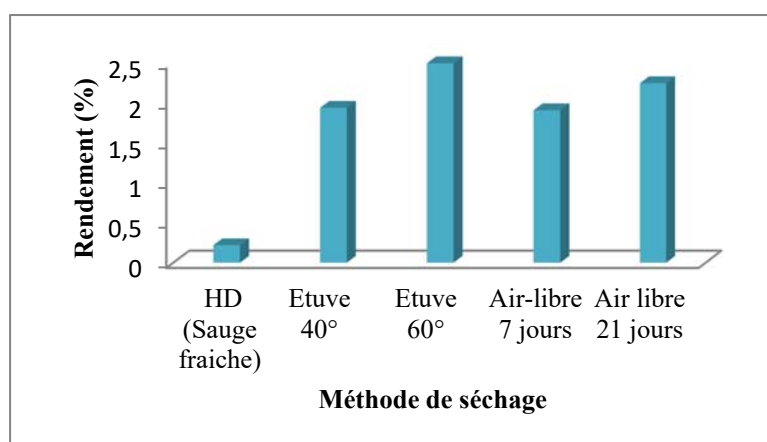
L'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. extraite par HD des feuilles séchées par différente méthode, un séchage à l'air libre durant 7 jours et 21 jours et un séchage à l'étuve pendant 4 heures à $T=40^{\circ}$ et $T=60^{\circ}$ se présente sous forme d'un liquide transparent et de couleur jaune claire, l'odeur est caractéristique citronnée. Les rendements obtenus sont donnés dans le **tableau IV.5**

Tableau IV.5 : Rendement des HES de la saignée officinale obtenu HD des différents échantillons

Durée d'extraction	Matière Végétale	Méthode de Séchage	Masse (g)	Rendement(%)
3h	Fraiche	--	300	0,22
3 h	Sèche	Etuve (T=40°)	90	1,94
3 h	Sèche	Etuve (T= 60°)	90	2,5
3 h	Sèche	Air libre (7 jours)	90	1,91
3 h	Sèche	Air libre (21jours)	90	2,25

Les résultats obtenus montrent que le rendement en HE de la saignée est significativement influencé par la méthode de séchage. En effet les rendements obtenus du matériel végétal séché varient de 1,9 à 2,5 contre 0,22 pour le matériel végétal frais. Selon des études sur la menthe verte et le basilic [13-14] les cellules épithéliales des échantillons séchés peuvent s'être effondrées et ouvertes, ce qui indique que les structures de la biomembrane ont été modifiées sous des températures sublétales qui ont entraîné une perméabilité plus élevée.

En Comparant les rendements obtenus en HES des échantillons séchés différemment la différence n'est pas très significative, mais permet un gain de temps.

**Figure IV.5 :** Rendements des HES de la saignée officinale obtenus par HD des différents échantillons séchés.

III.2. Influence de la méthode de séchage sur la composition chimique des huiles essentielles

Plusieurs études ont montré que le de séchage est un paramètre important, qui a une influence directe sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles. Nous présentons dans cette partie l'analyse qualitative et semi-quantitative des différentes huiles essentielles obtenues par HD des différentes matrices végétales séchées.

Tableau IV.6 : Composition chimique des HEs de la *Salvia officinalis* obtenues par HD des différents échantillons séchés.

Composés	I ^a	I ^b	HD	Aire libre 7 jours ^c	Aire libre 21 jours ^c	Etuve ^c 40° C	Etuve ^c 60° C
<u>Monoterpènes</u>							
<u>Hydrocarbonés</u>							
Tricyclène	909	926	0.18	0.09	0.12	0.11	0.09
α -Thujène	930	922	Tr	0.37	0.20	0.39	0.31
α-Pinène	939	939	0.52	1.86	2.66	2.35	1.88
Camphène	965	954	0.83	3.92	4.42	4.63	3.80
β-Pinène	972	979	3.03	2.60	1.89	2.96	2.46
Myrcène	982	991	1.92	2.14	1.96	2.40	1.78
α -Phellandrène	1003	1001	Tr	0.12	0.14	0.14	0.12
α -Terpinène	1020	1016	0.20	0.37	0.48	Tr	tr
Cis-Ocimène	1045	1040	0.33	tr	tr	Tr	tr
γ -Terpinène	1060	1060	0.63	0.98	0.62	0.84	0.76
α -Terpinolène	1091	1088	0.34	0.90	0.62	0.91	0.95
<u>Monoterpènes</u>							
<u>Oxygénés</u>							
1,8-Cinéole	1032	1033	11.00	15.42	15.15	17.10	16.08
Cis-Sabinène hydrate	1071	1068	0.30	tr	tr	Tr	tr
α-Thujone	1102	1102	15.80	16.84	17.30	17.40	17.03
β-Thujone	1114	1114	5.65	4.63	6.07	5.26	7.13
Camphre	1144	1143	10.70	25.29	21.78	24.63	25.36
Isobornéol	1156	1156	0.77	0.17	0.15	0.17	0.24
Bornéol	1160	1165	3.88	2.20	1.71	1.65	2.23
Pinocamphone	1167	1173	0.31	tr	tr	Tr	0.08
Terpinén-4-ol	1175	1177	0.67	0.45	0.47	0.43	0.43
α -Terpinéol	1187	1189	0.66	0.47	0.35	0.37	0.58

Verbenone	1205	1205	Tr	tr	tr	Tr	tr
Bornyl acétate	1290	1289	0.42	0.74	0.79	0.78	0.61
<u>Sesquiterpènes</u>							
<u>Hydrocarbonés</u>							
β-Caryophyllène	1423	1420	8.50	6.01	3.86	4.58	5.41
α-Humulène	1456	1455	9.61	3.94	2.25	2.85	3.46
Sesquiphellandréne	1525	1524	0.26	tr	tr	Tr	tr
<u>Sesquiterpènes</u>							
<u>Oxygénés</u>							
Elémol	1547	1549	Tr	tr	tr	Tr	tr
oxyde de Caryophyllène	1585	1581	0.81	6.07	8.42	5.57	5.46
Viridiflorol	1595	1593	13.10	0.15	0.66	0.17	0.14
oxyde d'Humulène	1600	1600	2,59	-	tr	Tr	tr
<u>Autres</u>							
Cis-Salvéne	854	842	Tr	tr	0.24	0.21	0.13
Manool	2051	2056	6,44	3.44	5.66	3.60	2.40
Abietadiène	2088	2080	0.33	tr	tr	0.09	tr
% Monoterpènes			7.98	13.35	13.11	14.73	12.15
Hydrocarbonés							
% Monoterpènes			50.16	66.21	63.77	67.79	69.77
Oxygénés							
% sesquiterpène			18.37	9.95	6.11	7.43	8.87
hydrocarbonés							
% sesquiterpènes			12.89	6.22	9.08	5.74	5.6
Oxygénés							
% Autre			6.77	3.44	5.9	3.9	2.53
Total identifié (%)			96.17	99.17	97.97	99.59	98.92

tr. traces <0.01%.

^aIndices de rétention de la littérature, colonne HP5MS.

^bIndices de rétention calculés, colonne HP5MS.

^cPourcentages des composés (air des pics sur HP5MS (GC-FID)).

Qualitativement les HES n'ont pas été affectées par la méthode de séchage, cependant qualitativement des différences ont été observées pour certains composés. En effet nous remarquons une augmentation significative du pourcentage du camphre entre l'HE issue de la matrice fraîche et sèche, puisque celui passe de 10% (sauge fraîche) jusqu'à atteindre un pourcentage de plus de 20% (sauge sèche) (entre 21,78-25,36%), il en est de même pour l'oxyde de caryophyllène qui voit son taux passer 0,81% (sauge fraîche) à plus de 5% (sauge sèche) (entre 5,46-8,42%). Pour ce qui est du viridiflorol, ce composé est presque à l'état de trace dans l'HE de la sauge sèche (entre 0,66-0,15%) alors que son taux était de 13,1% dans l'HE de la sauge fraîche, le séchage a eu le même effet sur l'oxyde d'humulène. Pour les

autres composés, nous remarquons une diminution pour certains en passant de HE de la sauge fraîche à celle de la sauge sèche, comme le β -caryophyllène (de 8,50% à 3,86-6,01%), l' α -humulène (de 9,61% à 2,25-3,94%), alors que pour d'autres composés il y a eu augmentation de leurs taux en passant de HE de sauge fraîche à celle de la sauge sèche, comme l' α -Thujone (de 15,80 % à 16,84-17,40 %), le 1,8-Cinéole (de 11,00 % à 15,15-17,10 %).

La comparaison des résultats par rapport à la méthode de séchage, montre que certains composés ont été mieux extraits que d'autres, ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Hamrouni et coll. [15] qui ont trouvé que la variation la plus importante était enregistrée pour le sesquiterpène oxygéné. Selon Asekun et coll. [16], l'évolution des concentrations des composés volatils au cours du séchage dépend de plusieurs facteurs, tels que la méthode de séchage et les paramètres caractéristiques du produit soumis au séchage.

Selon la méthode de séchage utilisée, des changements significatifs ont été observés dans la composition chimique des différentes HES. On notera la prédominance des monoterpènes oxygénés (62,21-69,77 %) suivis des hydrocarbures monoterpéniques (13,11-14,73 %), des hydrocarbures sesquiterpéniques (6,11-9,95 %) et enfin des sesquiterpènes oxygénés (5,60-9,08 %) (**Figure IV.7**).

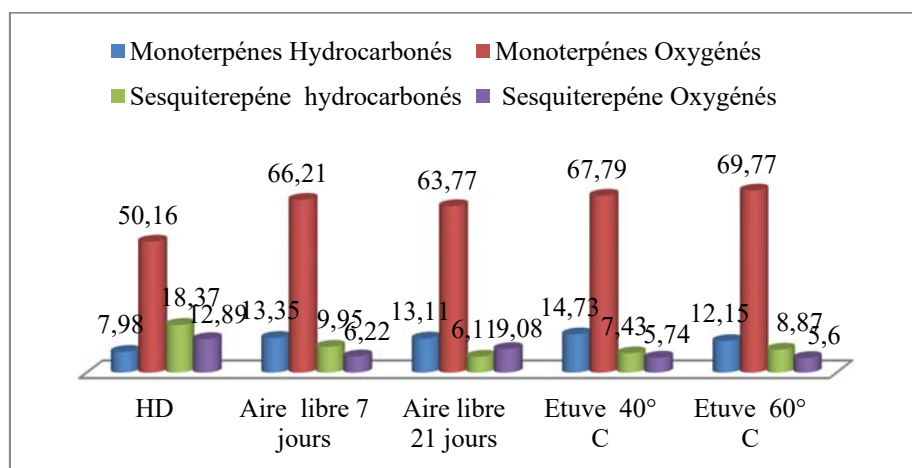


Figure IV.6: Pourcentage des familles chimiques de l'huile essentielle d'*Salvia officinalis* différents méthode de séchage

IV. Activité antioxydante :

L'activité antioxydante des HES des plantes aromatiques est principalement attribuée à leurs composés actifs. Cela pourrait être dû aux composés majoritaire mais aussi à la présence d'autres constituants en petites quantités ou à la synergie de tous les composés de l'HE [17].

L'activité antioxydante des HE de *S. officinalis* obtenues par les différentes techniques d'extraction a été déterminée par piégeage du radical DPPH et comparée au témoin positif BHT, les résultats sont présentés dans le **Tableau IV.7**.

Tableau IV.7: Activité antioxydante de l'huile essentielle de la *Salvia officinalis* et le BHT à différentes concentrations (mg/L)

	DPPH inhibition (%)				
	200	400	600	800	1000
Sauge HD	9.69±2.12	10.63±1.45	13.47±0.75	17.56±0.85	36.75±1.25
Sauge HDMO	7.43±1.06	8.89±0.17	11.99±0.73	12.30±0.50	34.72±0.63
Sauge EV	9.75±1.23	11.25±2.15	15.37±1.90	20.29±1.06	40.25±0.85

	DPPH inhibition (%)				
	2	5	10	15	20
BHT	11.46±1.21	27.07±0.70	53.16±1.62	69.74±1.15	73.76±0.60

Les résultats montrent que l'activité de piégeage des radicaux (pourcentage d'inhibition) des HE de sauge fraîche obtenue par HD et EV sont les plus élevées (36,75 % et 40,25 %, respectivement) à la concentration de 1 000 mg/L, suivie par HE obtenue par MAHD (34,72 %). Pour le BHT (antioxydant synthétique), le pourcentage d'inhibition varie entre 11,46 et 73 % pour la concentration allant de 2 à 20 mg/L, la plus faible concentration de 5 ppm donne 27 % d'inhibition du DPPH.

Cet antioxydant synthétique a été utilisé dans l'industrie alimentaire [18] à 0,05 ppm (0,05 mg/L), avec un pourcentage d'inhibition de 30 %. Donc on peut conclure que pour un pourcentage d'inhibition d'huiles essentielles supérieur à 27 %, que celles-ci sont plus actives que le BHT, elles peuvent donc être une alternative à cet antioxydant synthétique dans

l'industrie alimentaire. Cependant, certaines études ont rapporté des activités antioxydantes significatives d'autres échantillons d'huiles de *S. officinalis* [19].

V. Activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles obtenues par les différentes méthodes d'extraction ont été testées vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, et *Escherichia coli* ATCC 43300) et deux champignons pathogènes (*Umbelopsis amanniana* NRRL 1829 et *Aspergillus carbonarius* M333 et une levure *Candida albicans* ATCC 10259 de référence) en utilisant la technique de diffusion sur gélose. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré afin de déterminer l'importance de cette activité en utilisant la méthode des disques. Les résultats sont présentés dans le **Tableau IV.8**.

Tableau IV.8: Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *S. officinalis* obtenues par HD, HDMO et EV.

Micro- organismes	Zone d'inhibition* (mm)				
	huile essentielle			Standard	
	HD	HDMO	EV	Amoxicilline	Lamidaz
Bactérie					
<i>Bacillus subtilis</i>	17±0.67	15±0.56	19±0.45	28±0.29	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	17±0.55	13±0.44	23±0.69	26±0.33	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NI	NI	NI	22±0.54	-
<i>Escherichia coli</i>	9±0.33	8±0.67	12±0.56	23±0.25	-
Champignons					
<i>Umbelopsis amanniana</i>	17±0.44	19±0.66	36±0.33	-	28±0.50
<i>Aspergillus carbonarius</i>	13±0.56	11±0.44	25±0.75	-	23±0.33
Levure					
<i>Candida albicans</i> ATCC 10259	NI	NI	NI	-	23±0.60

NI: aucune inhibition. *zone d'inhibition de 6 mm de diamètre.

Au regard des résultats obtenus, nous constatons que l'HE obtenue par la technique d'extraction EV donne l'activité antimicrobienne la plus élevée pour toutes les souches bactériennes testées par rapport aux HE extraites par HD et HDMO. L'huile essentielle extraite par EV présente une forte activité pour les bactéries *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*, et pour les champignons *U. ramanniana* et *A. carbonarius*, pour les bactéries des zones d'inhibitions

de 19 mm, 23 mm et 12 mm ont été enregistrés respectivement alors que pour les Champignons les diamètres d'inhibition enregistrés sont de 36 mm et 25 mm respectivement.

Pour l'HE extraite par HD les diamètres d'inhibition enregistrés pour *B. subtilis*, *S. aureus* sont de 17 mm et 9 mm pour *E. coli*. On note que l'HE extraite par HDMO présente une zone d'inhibition de 15 mm et 13 mm pour les bactéries *B. subtilis*, *S. aureus* et de 8 mm pour la bactérie *E. coli*.

Pour les activités des champignons, le Champignon *U. ramanniana* présente une zone d'inhibition de 17 mm et 19 mm, les zones d'inhibition du Champignon *A. carbonarius* de 13 mm et 11 mm pour l'HE extraite par HD et HDMO respectivement. Ces résultats sont en accord à l'étude de d'Annane et coll [20].

Les travaux de Bouaziz et coll [21], ont montré l'efficacité de l'HE de *S. officinalis* contre le développement d'un large spectre de micro-organismes (bactéries et champignons). Ces auteurs ont attribué cette forte activité antibactérienne et antifongique de l'HE de sauge à sa forte concentration en monoterpènes. Ils précisent que l'activité antifongique enregistrée dans l'HE de *S. officinalis* pourrait être le résultat d'une synergie entre constituants majeurs et mineurs.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Perovskia abrotanoides* Karel a été étudiée par Mahboubi et coll [22]. Ces auteurs ont montré l'effet de l'activité antimicrobienne des composés camphre, de l' α -pinène et du 1,8-cinéole contre les bactéries Gram-positives *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*, la bactérie Gram-négative *Escherichia coli* et le microchampignon *Aspergillus niger*.

En Algérie, l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba*, riche en camphre mais aussi en 1,8-cinéole et bornéol, s'est révélée très active contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*, et très peu active contre *Pseudomonas aeruginosa* [23].

De plus, l'huile EV a montré plus d'efficacité contre les champignons (zone d'inhibition de 25 à 36 mm) que l'antibiotique antifongique lamidaz® (zone d'inhibition de 23 à 28 mm). Lamidaz® est un composé utilisé dans le traitement antifongique de certaines infections causées par des champignons de la peau et des ongles.

Toutes ses études montrent que les composés comme le camphre, le 1,8 cinéole, un pourcentage élevé en monoterpènes peuvent être à l'origine d'une bonne activité

antimicrobienne d'une huile essentielle, ce qui nous conforte dans les résultats trouvés pour nos extraits qui concordent bien avec leurs compositions chimiques.

VI. Analyse quantitative des extraits

VI.1. Rendement des différents extraits

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenu à la masse de la matière végétale utilisée par cent.

Les rendements des différents extraits de la sauge officinale obtenus par les trois techniques en utilisant différents solvants (méthanol, éthanol et l'acétate d'éthyle) sont présents dans le tableau IV.9 et la Figure IV.7. Les conditions opératoires sont illustrées dans le **chapitre précédent**.

Tableau IV.9 : Rendement des différents extraits

Méthode	Solvant	Aspect	Couleur	R(%)
Macération à froid (MAF)	Méthanol	pâteux	Vert foncé	10,00
	Ethanol	pâteux	Vert foncé	16,23
	Acétate d'éthyle	poudre	Vert clair	8,56
Macération assistée par micro-ondes (MAMO)	Méthanol	pâteux	Vert foncé	13,25
	Ethanol	pâteux	Vert foncé	25,02
	Acétate d'éthyle	poudre	Vert clair	15,24
Macération assistée par Ultrasons (MAU)	Méthanol	pâteux	Vert foncé	8,26
	Ethanol	pâteux	Vert foncé	18,34
	Acétate d'éthyle	poudre	Vert clair	7,89

Au vu des résultats obtenus on remarque que le rendement des extraits dépend de la nature du solvant et la méthode d'extraction. Les meilleurs rendements ont été obtenus avec des solvants polaires. Pour toutes les techniques d'extraction l'éthanol donne le meilleur rendement, le plus élevé est obtenu par la macération assistée par micro-ondes (MAMO) (25,02%) suivi par celui obtenu par la macération assistée par ultrasons (MAU) (18,34%) suivi par celui obtenu par la macération à froid (MAF) (16,23%).

Pour le méthanol le rendement obtenu par MAMO (13,25%) est plus important que ceux obtenus par MAU (8,26%) et MAF (10%). Pour l'acétate d'éthyle le rendement obtenu par la macération assistée par micro-ondes (MAMO) (15,24%), est le double de ceux obtenus

par la macération à froid (MAF) (8,56%) et la macération assistée par ultrason (MAU) (7,89%).

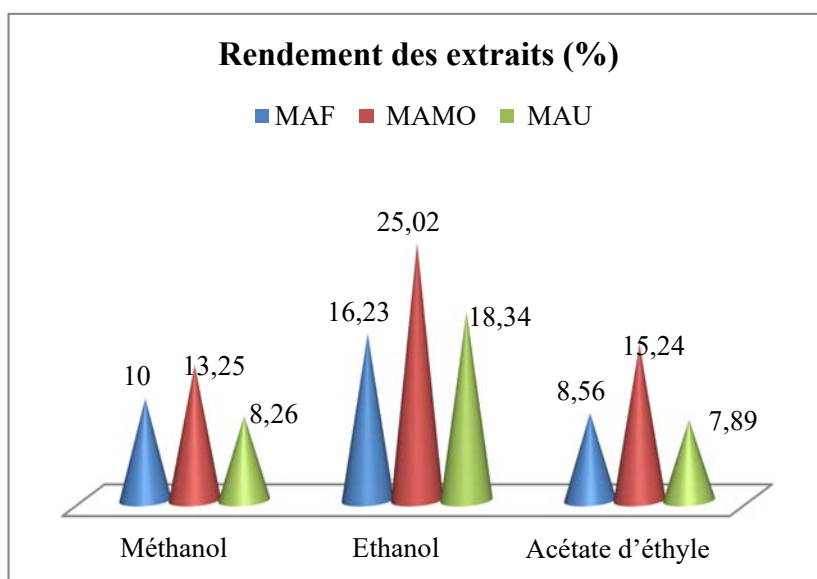


Figure IV.7 : Rendement des extraits de *Salvia officinalis*

VI.2. Effet de la polarité du solvant et la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux

VI.2. 1. Teneur en polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme standard, l'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm. La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par gramme de poids d'extrait (mg EAG/g).

Les teneurs en polyphénol totaux des différents extraits sont données par l'histogramme de la **figure IV.8**.

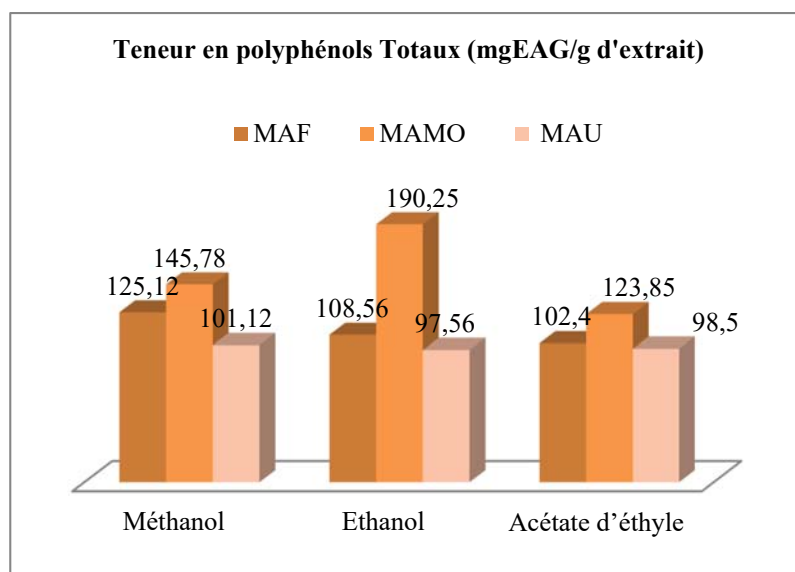


Figure IV.8 : Teneur en polyphénols Totaux de *Salvia officinalis*

L'examen des résultats obtenus montrent que pour les trois solvants utilisés la macération assistée par micro-ondes donne les teneurs en polyphénol totaux les plus importantes, suivie par la technique de macération à froid et enfin la méthode d'extraction par macération assistée par ultrason donne les rendements les plus bas.

Pour les extraits obtenus par MAMO les teneurs en polyphénols totaux sont de 190,25 mg EAG/g pour l'extrait éthanolique, suivi de l'extrait méthanolique avec un taux de 145,78 mg EAG/g, alors que pour l'extrait d'acétate d'éthyle on enregistre une teneur de 123,85 mg EAG/g.

Pour l'échantillon obtenu par MAF les extraits méthanolique et éthanolique présentent des teneurs en polyphénols totaux de 125,12 mg EAG/g et 108,56 mg EAG/g respectivement. L'extrait d'acétate d'éthyle donne un taux de 102,40 mg EAG/g. Les teneurs en polyphénols totaux obtenus pour l'extrait de la MAU sont les plus faibles par rapport aux autres techniques d'extraction, on enregistre un taux de 101,12 mg EAG/g pour l'extrait méthanolique, 101,12 mg EAG/g et un taux de 97,56 mg EAG/g pour l'extrait éthanolique et 98,50 mg EAG/g pour l'extrait d'acétate d'éthyle.

VI.2.2. Teneur en flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), la quercétine a été utilisée comme étalon, l'absorbance a été lue à une longueur

d'onde de 430 nm. Les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits sont présentés dans l'histogramme de la **figure IV.9**.

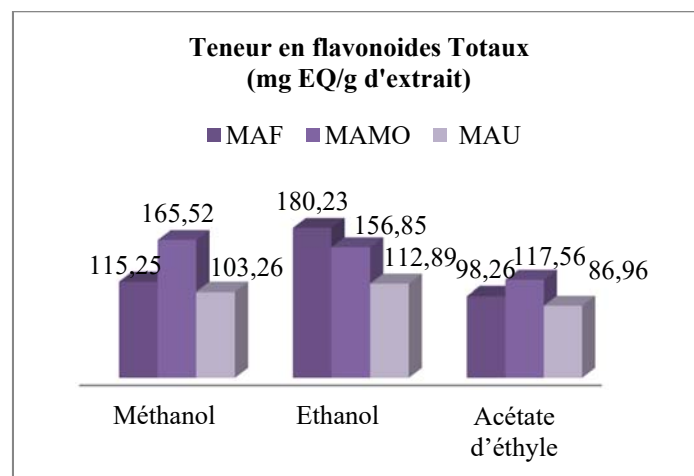


Figure IV.9: Teneur en flavonoïdes totaux de *Salvia officinalis*

Au regard des résultats obtenus, nous constatons que :

- l'extrait éthanolique obtenu par MAF est le plus riche en flavonoïdes (180,23 mg EQ/g), alors que pour les autres techniques c'est les extraits obtenus par MAMO.
- les extraits à l'acétate d'éthyle ont donné les rendements les plus faibles en flavonoïdes pour les méthodes d'extractions
- La technique MAU s'est avérée la moins efficace pour l'extraction des flavonoïdes totaux, les teneurs obtenues varient entre 86,96 et 112,89 mg EQ/g.

VI.3. Effet de la polarité du solvant et de la méthode d'extraction sur l'activité antioxydante des différents extraits

Les activités anti-radicalaires de nos extraits ont été déterminées par deux méthodes : la première est le test du DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl), le BHT a été utilisé comme témoin. La seconde méthode est celle du test radical cation (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6- sulfonique) (ABTS⁺), le Trolox a été utilisé comme témoin positif.

VI.3.1. Teste DPPH

Le protocole expérimental et l'expression des résultats sont détaillés dans le chapitre précédant.

Tableau IV.10 : les valeurs des IC₅₀ des différents extraits

Solvant	IC ₅₀ (mg/l)		
	Méthode d'extraction		
	MAF	MAMO	MAU
Méthanol	80,35	64,09	96,25
Ethanol	74,18	57,41	68,04
Acétate d'éthyle	105,18	98,14	110,45

L'IC₅₀ des différents extraits sont présentés dans l'histogramme de la figure IV.10

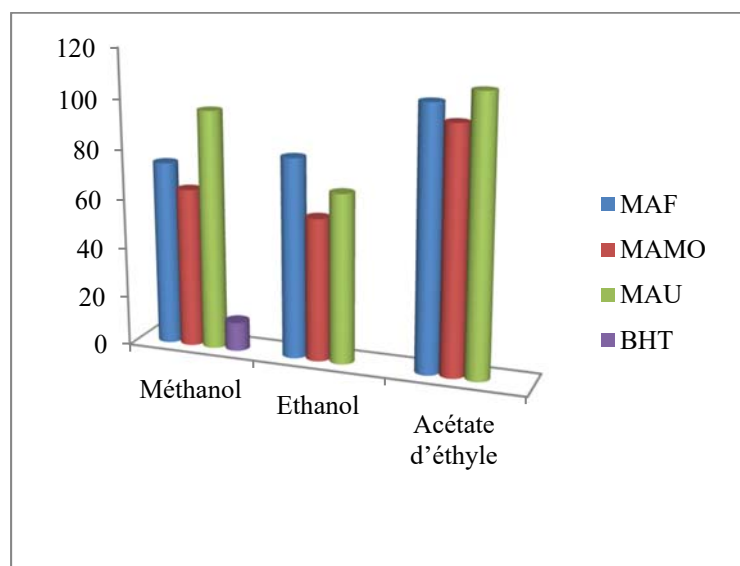


Figure IV. 10: Valeurs IC₅₀ des extraits *Salvia officinalis* (test du DPPH)

Les résultats présentés montrent que les extraits éthanolique et méthanolique obtenus par MAMO et l'extrait éthanolique obtenu par MAU ont les capacités antioxydantes les plus importantes, leur IC₅₀ varie de 57,41 mg/l à 68,04 mg/l comparativement aux autres.

extraits, cependant elle reste faible par rapport à celle du BHT ($IC_{50} = 11,59$ mg/l). Il ressort que l'éthanol et l'extraction par MAMO donne des extraits relativement actifs (tableau IV.10).

VI.3.2. Teste ABTS⁺

Le protocole expérimental et l'expression des résultats sont détaillés dans le **chapitre précédent**.

Tableau IV.11 : les valeurs des IC_{50} des différents extraits

Solvant	IC ₅₀ (mg/l)		
	Méthode d'extraction		
	MAF	MAMO	MAU
Méthanol	101,28	97,18	104,25
Ethanol	96,86	74,47	89,23
Acétate d'éthyle	120,89	111,36	145,78

L' IC_{50} des différents extraits sont présentés dans l'histogramme de la **figure IV.11**.

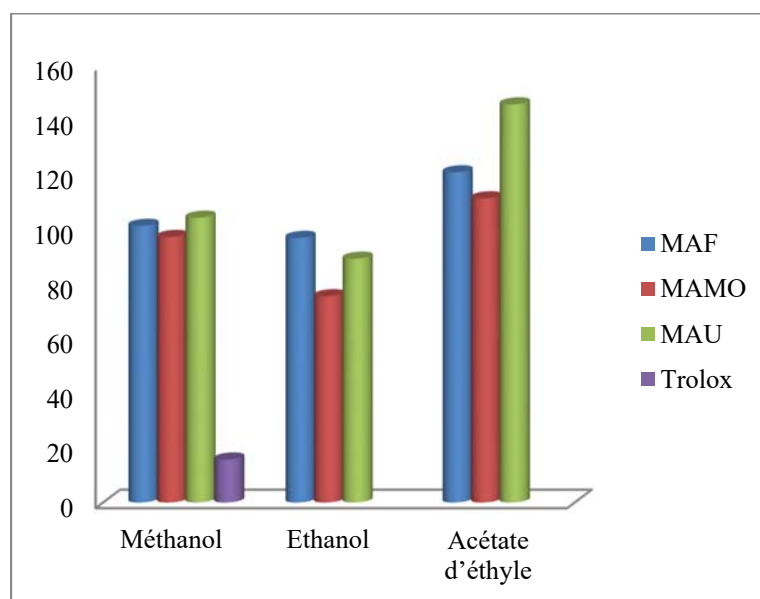


Figure IV.11 : Valeurs IC₅₀ des extraits *Salvia officinalis* par la méthode de ABTS^{•+}

Au regard des résultats obtenus, nous remarquons que les extraits éthanoliques possèdent une activité antioxydante assez prononcée (IC₅₀ = 75,47 mg/l (MAMO), IC₅₀ = 89,23 mg/l(MAU) et IC₅₀ = 96,86 mg/l(MAF)) par rapport à ceux obtenus par le méthanol et l'acétate d'éthyle. La technique macération assistée par micro-ondes semble être celle qui donne les extraits les plus actifs pour les trois solvants utilisés, en effet les IC₅₀ obtenus sont les plus faibles (Tableau IV.11)

Toutefois l'antioxydant synthétique possède la meilleure activité antioxydante avec une concentration inhibitrice 15,68 mg/l.

**Etude des extraits d'*Olea europaea* L : Analyse par
HPLC- MS, Activité Anitoxydante, Activité
Antibactérienne et Activité Antifongique**

Etude des extraits d'*Olea europaea* L : Analyse par HPLC- MS, Activité Antioxydante, Activité Antibactérienne et Activité Antifongique

I. Introduction

La recherche de nouveaux agents antioxydants et antibactériens d'origine naturelle s'oriente de plus en plus vers les acides organiques, les huiles essentielles ou bien les extraits végétaux. Les plantes restent la source la plus commune d'agents biologiquement actifs. Leur utilisation comme remèdes traditionnels est la plus populaire pour 80 % de la population mondiale [1]. En Asie, Amérique Latine et Afrique, plus de 35000 espèces de plantes sont utilisées à des fins médicinales [2]. Les huiles essentielles, les épices ainsi que les plantes médicinales sont connues depuis des siècles pour leur activité biologique, en particulier antifongique, antibactérienne et antioxydante. Ces propriétés dépendent du chémotype de la plante qui détermine la composition chimique de ses propres substances de réserve [3]. Ces dernières années, les laboratoires pharmaceutiques ont beaucoup investi dans le développement d'extraits de produits naturels à base de plantes pour contrecarrer la résistance des microorganismes pathogènes vis-à-vis d'agents antioxydants et antimicrobiens classiques.

Les objectifs principaux dans cette étude présentée dans ce chapitre sont :

- 1- Valorisation des sous-produits des végétaux par extraction à partir des différents extraits deux variétés Chemlal et Limli ont utilisant différents solvant.
- 2- Dosage des molécules bioactives (les polyphénols totaux et les flavonoïdes).
- 3- Evaluation de l'activité anti-oxydante par deux méthodes DPPH et ABTS.
- 4- Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique in vitro des extraits sur un ensemble de bactéries et champignons pathogènes.
- 5- Analyse des différents extraits par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée avec spectrométrie de masse (UHPLC-DAD-ESI / MSn).

Les différentes conditions opératoires et protocoles expérimentaux effectués dans cette étude sont détaillés dans le **chapitre III**.

II. Résultat et discussion

II.1. Etude du rendement en fonction de la méthode d'extraction et du solvant :

L'extraction des polyphénols à partir de la matière végétale est une étape très importante. En effet, beaucoup d'auteurs ont étudié l'influence des conditions opératoires sur les rendements d'extraction et la teneur EN composés phénoliques [4,5].

Les caractéristiques des différents extraits sont illustrées dans le **tableau IV.1**.

Tableau IV.1 : Aspect, couleur et rendement des différents extraits

Méthode	Solvant	Variété	R(%)	Variété	R(%)	Aspect	Couleur
Macération à froid (MAF)	Méthanol	Chemlal	13,84	Limli	12,00	pâteux	Vert foncé
	Ethanol		14,35		9,80	pâteux	Vert foncé
	Acétate d'éthyle		9,10		10,25	poudre	Vert clair
Macération assistée par micro-ondes (MAMO)	Méthanol		19,45		21,85	pâteux	Vert foncé
	Ethanol		24,00		16,60	pâteux	Vert foncé
	Acétate d'éthyle		11,70		13,02	poudre	Vert clair
Macération assistée par Ultrasons (MAU)	Méthanol		10,05		8,57	pâteux	Vert foncé
	Ethanol		11,25		9,54	pâteux	Vert foncé
	Acétate d'éthyle		8,58		6,46	poudre	Vert clair

Au regard des résultats obtenus **tableau IV.1**, pour les deux espèces d'olivier étudiées nous remarquons que les rendements obtenus en utilisant l'extraction assistée par micro-ondes sont les plus élevés, et ceci est commun aux trois solvants utilisés. Ceci peut s'expliquer par le chauffage qui est plus rapide sous l'effet des radiations micro-ondes, donc le mélange se met rapidement en ébullition provoquant ensuite l'éclatement des parois cellulaires des végétaux et la libération des molécules.

Pour ce qui de l'extraction par les deux autres méthodes, à savoir l'extraction par macération et l'extraction par macération assistée par ultrasons, nous constatons, que pour les deux variétés et les trois solvants, l'extraction par macération à froid donne des rendements plus

élevés par rapport à la macération assistée par micro-onde pour les deux variétés d'olivier (figure IV.1 et IV.2)

On notera que pour la variété chemlal, l'éthanol s'avère être le solvant le plus adéquat puisqu'il donne les rendements les plus grands pour les trois techniques utilisées est obtenus en utilisant.

Pour la variété limli nous remarquons que pour l'extraction par macération assistée par micro-onde, l'éthanol donne le rendement le plus élevé alors que l'méthanol permet une meilleure extraction par les méthodes macération à froid et macération assistée par micro-ondes. Les différences observées sur les rendements en utilisant les différentes technique et différents solvants peuvent être expliqué par la qualité des composés extraits par chaque méthode et les différents solvants qui peuvent donnés des extraits de composition différente.

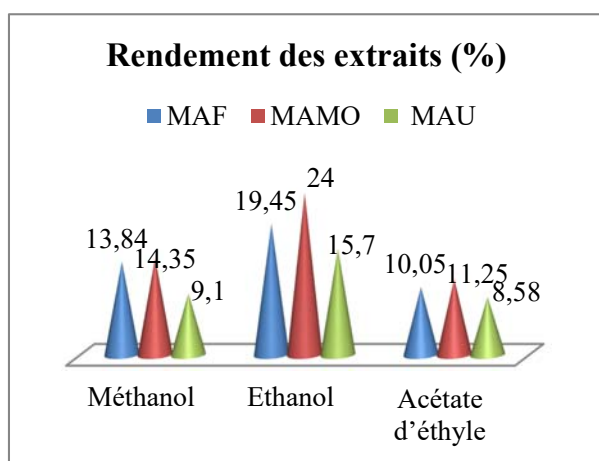


Figure IV. 1: Rendements des extraits de la variété Chemlal

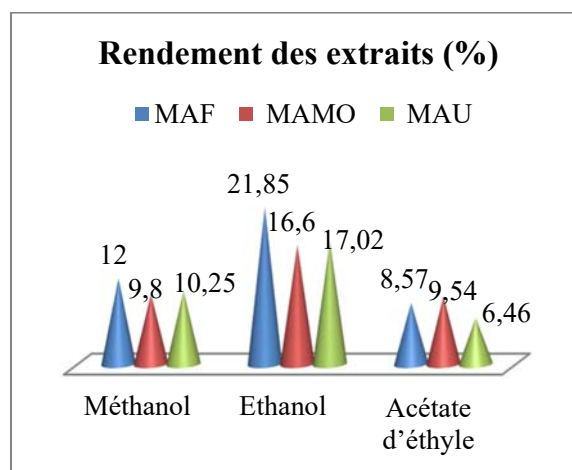


Figure IV. 2: Rendements des extraits de la variété Limli

II.3. Chromatographie liquide ultra-haute performance couplée spectrométrie de masse (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS)

L'analyse qualitative des composés phénoliques de quelques extraits des feuilles d'olivier a été réalisée en utilisant une HPLC-DAD-ESI-MS/MS en mode d'ionisation négative. Le mode d'ion négatif a été sélectionné en raison de sa plus grande sensibilité et sélectivité par rapport au mode positif. En outre, les polyphénols sont des composés faiblement acides, ce qui implique que la dissociation est plus facile que la protonation [6,7].

Les caractéristiques chromatographiques des principaux composés détectés dans les extraits méthanolique et éthanolique d'*Olea europaea* de la variété Chemlal et les hypothèses structurales de ces composés sont rapportés dans le **tableau IV.2**.

Les molécules détectées ont été identifiées sur la base des spectres de fragmentation MS/ MS en comparaison avec ceux rapportés dans la littérature.

Le chromatogramme de l'extrait méthanolique de la variété Chemlal est représenté dans la **figure IV.3**.

Les spectres de fragmentation des différents pics chromatographiques obtenus de l'extrait méthanolique d'*Olea europaea* de la variété Chemlal ont permis l'identification de dix composés phénoliques : Hydroxytyrosol, kaempférol dihexoside Adduit d'acide formique, kaempférol 3-O-glucose Adduit d'acide formique, Lutéoline glucoside, Oleuropéin, Lutéoline, Apigénine, Gliricidine, Benzoylaconitine, dérivé dihydrokaempférol Adduit d'acide formique.

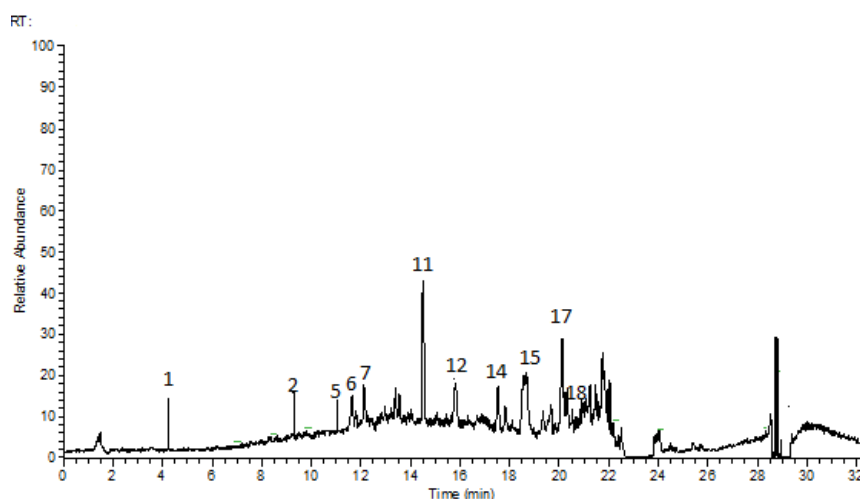


Figure IV.3 : Chromatogramme HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait méthanolique de la variété Chemlal d'*Olea europaea*

Les molécules correspondants aux pics 1, 3, 7, 10 et 11, éluées à 4.32, 10.22, 12.09, 13.38 et 14.48 min, présentent respectivement un rapport m/z de 153, 655, 493, 447 et 593 en mode négatif $[M-H]^-$ et des ions fragments m/z à 109, 637, 285, 285 et 377, correspondant à des pertes respectives d'un CO_2 ($[M-H-44]^-$), d'un H_2O ($[M-H-18]^-$), d'un CH_2O_2 -hexose ($[M-H-208]^-$), d'un glucose ($[M-H-180]^-$).

Les molécules correspondants aux pics 12, 13, 14, 15 et 17, éluées à 15.77, 17.50, 17.80, 18.57 et 20.06 min, présentent respectivement un rapport m/z de 285, 269, 299, 603 et 647 en mode négatif $[M-H]^-$ et des ions fragments m/z à 241, 225, 284, 301 et 287 correspondant à des pertes respectives d'un CO_2 ($[M-H-44]^-$), d'un méthyle ($[M-H-15]^-$), d'un dérivés d'aconitine ($[M-H-646]^-$).

Le chromatogramme de l'extrait éthanolique de la variété Chemlal est représenté dans la **figure IV.4**. Les caractéristiques chromatographiques des principaux composés détectés dans les extraits éthanolique d'*Olea europaea* de la variété Chemlal et les hypothèses structurales de ces composés sont rapportés dans le **tableau IV.2**.

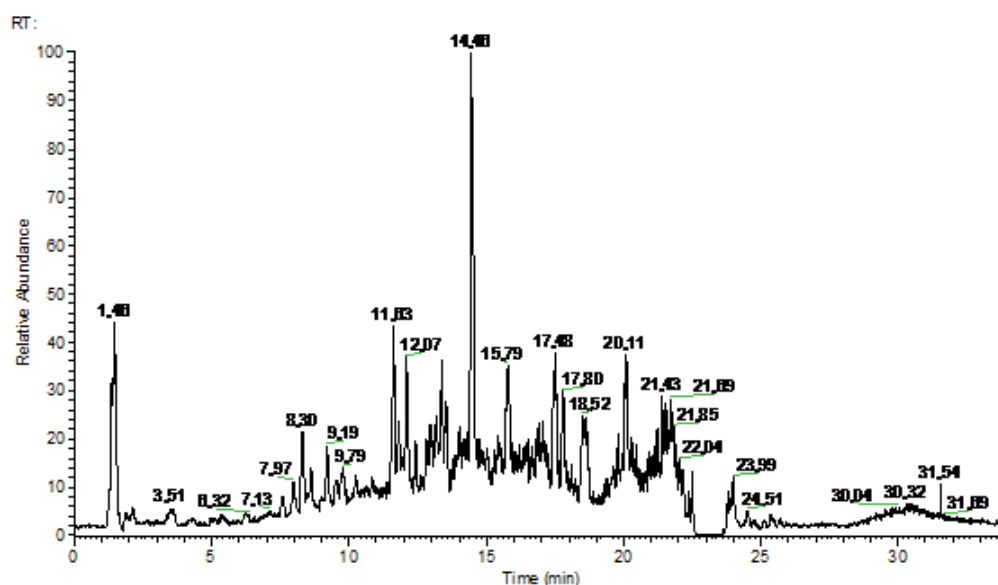


Figure IV.4 : Chromatogramme HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait éthanolique de la variété Chemlal d'*Olea europaea*

Les spectres de fragmentation des différents pics chromatographiques obtenus de l'extrait éthanolique d'*Olea europaea* de la variété Chemlal ont permis l'identification de douze composés phénoliques : Hydroxytyrosol, kaempférol dihexoside Adduit d'acide formique, kaempférol 3-O-glucose Adduit d'acide formique, Dihydroxy méthoxy flavone caféoylC-hexoside, Lutéoline glucoside, Oleuropéine, Lutéoline, Apigénine, Gliricidine, Benzoylaconitine, Dihydrokaempférol, dérivé dihydrokaempférol Adduit d'acide formique.

Les composés correspondants aux pics 1, 3, 7, 10 et 11 et les pics 12, 13, 14, 15 et 17 sont les mêmes que ceux précédemment identifiés dans l'extrait méthanolique, éluées au mêmes temps de rétention et donnant la même fragmentation et un rapport m/z identique.

On remarque en plus deux molécules ont été identifiées dans l'extrait éthanolique de la variété Chemlal : Dihydroxy méthoxy flavone caféoyl C-hexoside et Dihydrokaempférol. Ses deux molécules correspondent aux deux pics 8 et 16 élués à 12.80 et 19.63 min leurs rapports m/z respectifs sont 623 et 287. Le pic 8 indique la libération d'une molécule d'eau ($[M-H-18]^-$) ou une molécule d'eau avec le monoxyde de carbone ($[M-H-46]^-$).

Les composés phénoliques identifiés dans les extraits méthanolique et éthanolique d'*Olea europaea* ont été cités dans études antérieures réalisées sur différentes variétés Chetoui et Koroneiki par Michel et al. [8].

Les caractéristiques chromatographiques des principaux composés détectés dans les extraits méthanolique d'*Olea europaea* de la variété Limli et les hypothèses structurales de ces composés sont rapportés dans le **tableau IV.2**.

Le chromatogramme de l'extrait méthanolique de la variété Limli est représenté dans la **figure IV.5**.

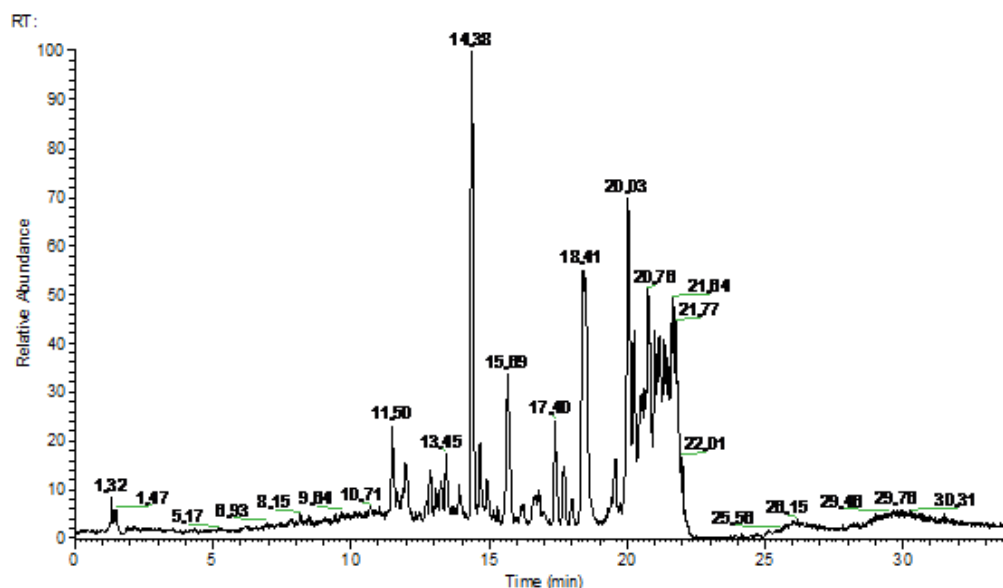


Figure IV.5 : Chromatogramme HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait méthanolique de la variété Limli d'*Olea europaea*

Les spectres de fragmentation des différents pics chromatographiques obtenus de l'extrait méthanolique de la variété Limli d'*Olea europaea* ont révélé la présence de quatorze composés phénolique : Hydroxytyrosol, Apigénine di-C-hexoside, kaempférol dihexoside adduct d'acid Formique, Dihydro kaempférol hexoside, Taxifoline, kaempférol 3-O-glucose Adduit d'acide formique, Lutéoline glucoside, Oleuropéine, Lutéoline, Apigénine,

Gliricidine, Benzoylaconitine, Dihydrokaempférol, dérivé dihydrokaempférol Adduit d'acide formique.

Les composés correspondants aux pics 1, 3, 7, 10 et 11 et les pics 12, 13, 14, 15, 16 et 17 sont les mêmes que ceux précédemment identifiés dans l'extrait éthanolique de la variété chemlal, éluées au mêmes temps de rétention et donnant la même fragmentation et un rapport m/z identique

Les molécules des pics (2, 4 et 6) ont été identifiées seulement dans la variété Limli, éluées à 9.67, 10.81 et 11.98 min présentent respectivement un rapport à m/z de 593, 449, 303 en mode négatif $[M-H]^-$ et des ions fragments m/z à 503, 287 et 125 correspondant à des pertes respectives d'une molécule d'eau pour les trois molécules des mêmes pics ($[M-H-18]^-$) soit d'un glycérone ($[M-H-90]^-$), d'un hexose ($[M-H-180]^-$) et d'un L'hydroxyquinol ($[M-H-126]^-$).

Le chromatogramme de l'extrait éthanolique de la variété Limli est représenté dans la **figure IV.6**. Les caractéristiques chromatographiques des principaux composés détectés dans les extraits éthanolique d'*Olea europaea* de la variété Limli et les hypothèses structurales de ces composés sont rapportés dans le **tableau IV.2**.

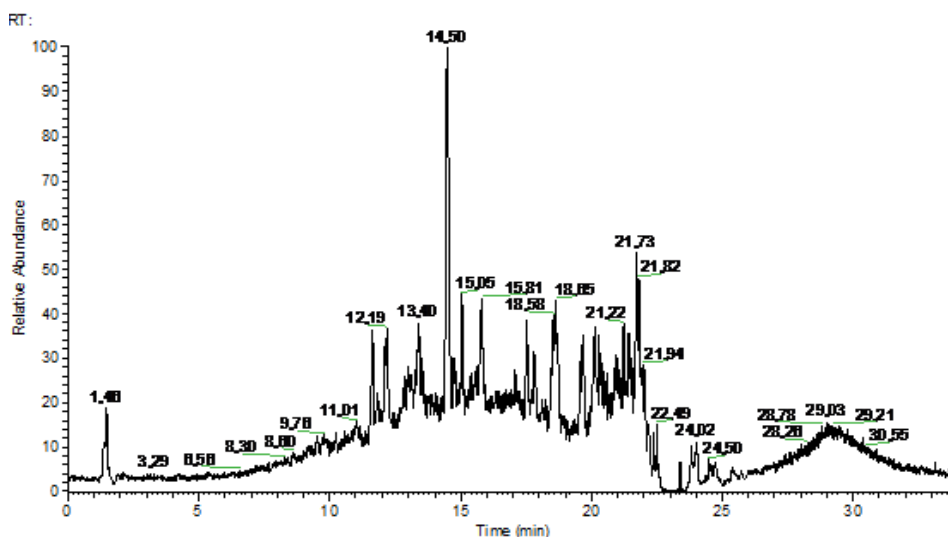


Figure IV.6 : Chromatogramme HPLC-DAD-ESI-MS/MS de l'extrait éthanolique de la variété Limli d'*Olea europaea*

L'identification des profils des spectres de fragmentation de l'extrait éthanolique de la variété Limli d'*Olea europaea* font ressortir seize composés phénolique : Hydroxytyrosol, Apigénine di-C-hexoside, kaempférol dihexoside adduct d'acid Formique, Dihydro kaempférolhexoside, Taxifoline, kaempférol 3-O-glucose Adduit d'acide formique,

Dihydroxy méthoxy flavone cafféoyl C-hexoside, Lutéoline glucoside, Oleuropéine, Lutéoline, Apigénine, Gliricidine, Benzoylaconitine, Dihydrokaempférol, dérivé dihydrokaempférol Adduit d'acide formique, Dérivé de dihydrokaempférol.

Les composés correspondants aux pics 1, 3, 2, 4, 6 7, 10 et 11 et les pics 11, 12, 13, 14, 15, 16 et 17 sont les mêmes que ceux précédemment identifiés dans l'extrait méthanolique, éluées au mêmes temps de rétention et donnant la même fragmentation et un rapport m/z identique

On note la présence de deux molécules phénoliques dans l'extrait éthanolique de la variété Limli : Dihydroxy méthoxy flavone cafféoyl C-hexoside et Dérivé de dihydrokaempférol éluées à 12.80 et 20.51 min présentant respectivement un rapport à m/z de 623 et 601 en mode négatif $[M-H]^-$ et de ion fragment m/z à et 287 pour la molécule correspondant au pic 18.

Les composés phénoliques identifiés dans les extraits d'*Olea europaea* ont déjà été identifiés par García et al. [9] sur les différentes variétés marocaines Arbequina, Hojiblanca, Koroneiki et Picholine Marocaine.

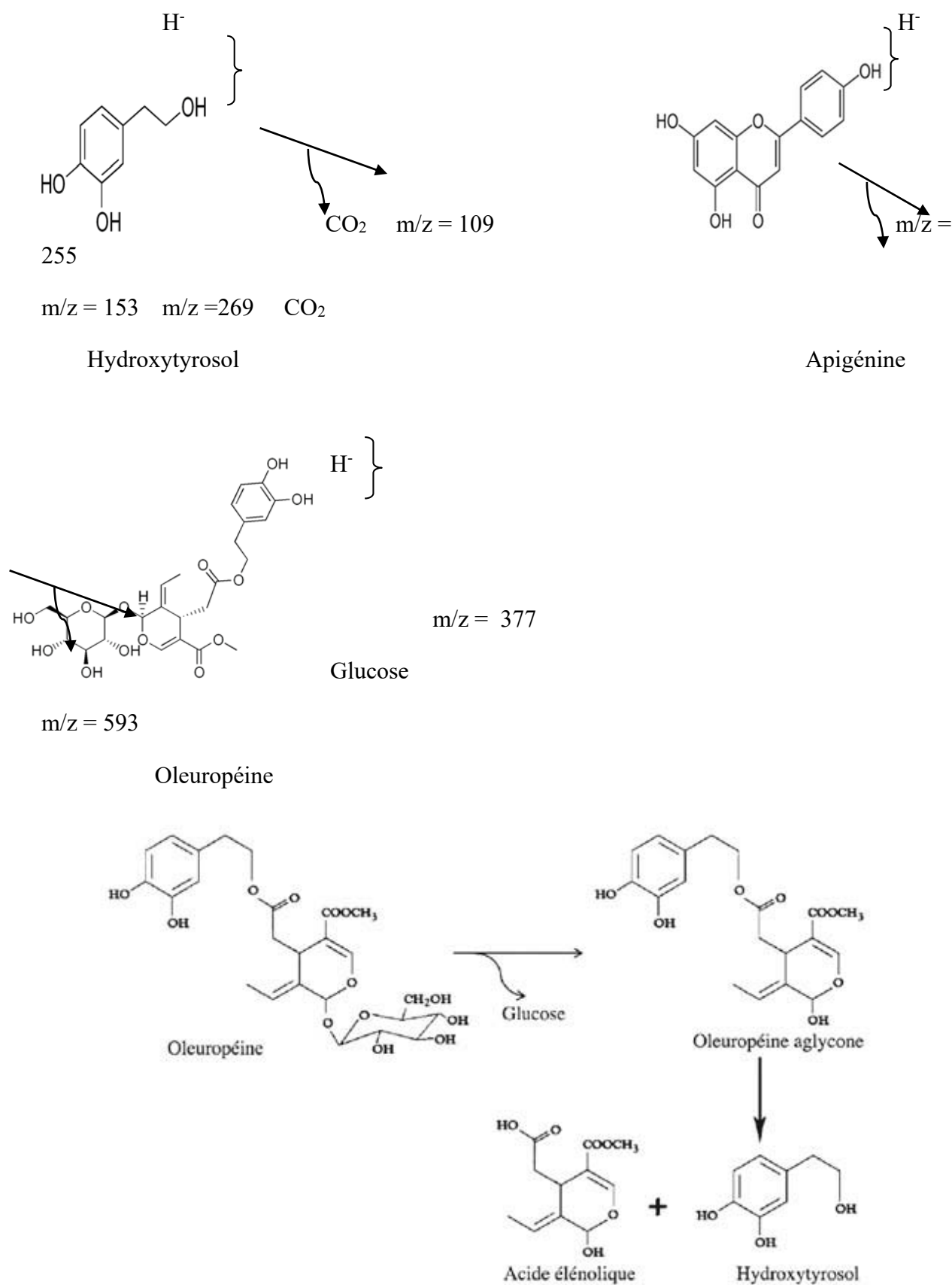


Figure IV.7 : structures de quelque composé phénolique

Tableau IV. 2 : Identification des composés phénolique des quelques extraits d'*Olea europaea*

No.	t _R	λ _{max}	[M-H] ⁻	MS ²	Composé	Chemlal		Limli	
						MOH	EOH	MOH	EOH
1	4.32	280	153,061	109 [M-H-CO ₂] ⁻	Hydroxytyrosol	+	+	+	+
2	9.67	272, 368	593,240	575 [M-H-H ₂ O] ⁻ 503 [M-H-C ₃ H ₆ O ₃] ⁻ 473 [M-H-C ₄ H ₈ O ₄] ⁻ 383 [M-H-C ₇ H ₁₄ O ₇] ⁻ 353 [M-H-C ₈ H ₁₆ O ₈] ⁻	Apigénine di-C-hexoside	-		+	+
3	10.22	268, 367	655,691 [M+CH ₂ O ₂ H] ⁻ 609,025 [M-H] ⁻	637 [M-H-H ₂ O] ⁻ 627 [M-H-CO] ⁻ 285 [M-H-formic acid-2hexose] ⁻	dihexoside de kaempférol adduct d'acid Formique	+	+	+	+
4	10.81	234, 368	449,771	431 [M-H-H ₂ O] ⁻ 359 [M-H-C ₃ H ₆ O ₃] ⁻ 287 [M-H-hexose] ⁻	Dihydrokaempférol hexoside	-	-	+	+
5	11.59	235, 367	525,330		Inconnue				
6	11.98	235, 289	303,218	285 [M-H-H ₂ O] ⁻ 177 [M-H-C ₆ H ₆ O ₃] ⁻ 125 [M-H-C ₉ H ₆ O ₄] ⁻	Taxifoline	-	-	+	+
7	12.09	265, 345	493 [M+CH ₂ O ₂ H] ⁻ 447 [M-H] ⁻	285 [M-H-CH ₂ O ₂ -hexose] ⁻	kaempférol 3-O-glucose adduct d'acide Formique	+	+	+	+

8	12.80	267, 333	623,253		Dihydroxy méthoxy flavone cafféoylC-hexoside	-	+	-	+
9	12.97	265, 336	724,105		Inconnue				
10	13.38	268, 336	447,221	285 [M-H-glucose] ⁻	Lutéoline glucoside	+		+	+
11	14.48	281, 312	539,181	377 [M-H-glucose] ⁻ 307 [M-H-glucose-C ₄ H ₆ O] ⁻ 275 [M-H-glucose-C ₄ H ₆ O ₃] ⁻	Oleuropéine	+		+	+
12	15.77	291, 349	285,235	241 [M-H-CO ₂] ⁻	Lutéoline	+		+	+
13	17.50	267, 335	269,113	225 [M-H-CO ₂] ⁻	Apigénine	+		+	+
14	17.80	267, 344	299,210	284 [M-H-CH ₃] ⁻	Gliricidine	+		+	+
15	18.57	234, 291	603,180	301*	Benzoylaconitine	+		+	+
16	19.63	242, 368	287,125	269 [M-H-H ₂ O] ⁻ 241 [M-H-H ₂ O-CO] ⁻	Dihydrokaempférol	-		+	+
17	20.06	273, 358	647,108 [M+CH ₂ O ₂ H] ⁻	287, 269	dérivé de dihydrokaempférol adduct d'acide formique	+		+	+
18	20.51	288, 367	601,241	287, 269	Dérivé de dihydrokaempférol	-		-	+

*Fragment commun dans les dérivés d'aconitine tr : temps de rétention en min, $\lambda_{\max}$: longueurs d'onde d'absorption maximale dans la région visible (nm), [M-H] : ion pseudo moléculaire (m/z) et MS² : fragments d'ions (m/z)

II.4. Screening phytochimique

Les résultats du screening phytochimique effectué sur les différents extraits des feuilles d'olivier des deux variétés Chemlal et Limli sont donnés dans le tableau ci-dessous. Les tests ont été fait pour la recherche des familles : des terpènes et stérol, des tanins, des saponosides et des alcaloïdes.

Tableau IV.3 : Résultats du Screening phytochimique

familles chimiques recherchées	Variété Chemlal	Variété Limli	des travaux antérieurs [10, 11]
Terpènes et stérols	+++	+++	+
Tanins	+++	+++	-
Saponosides	+	++	+
Alcaloïdes	+++	+++	-

La nature des familles chimiques mises en évidence par le screening phytochimique laisse prévoir des activités biologiques intéressantes de la composition chimique des deux espèces étudiées analysé par HPLC-DAD-ESI-MS/MS.

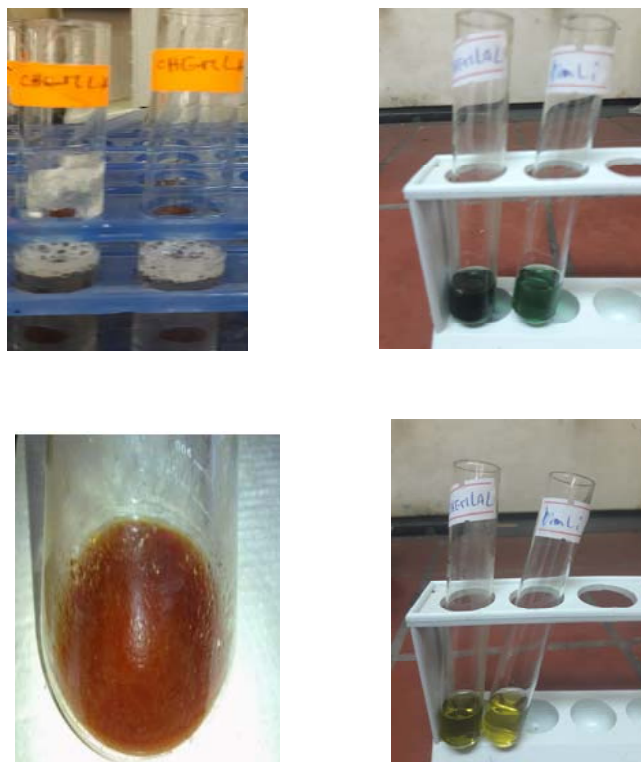


Figure IV.8 : photos des résultats du screening phytochimique terpènes et stérols, saponosides, tanins, et les alcaloïdes

II.5. Dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

II.5.1 Etude des rendements en polyphénols totaux fonction de la méthode d'extraction et du solvant :

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme standard, l'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm.

La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme d'équivalent de l'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g).

Tableau IV.4 : Rendement en polyphénols totaux (PT)

Méthode	Solvant	Variété	PT	Variété	PT
Macération à froid (MAF)	Méthanol	Chemlal	118.1	Limli	112.63
	Ethanol		106.05		133
	Acétate d'éthyle		80.12		78.33
Macération assistée par micro-ondes (MAMO)	Méthanol		128.33		148.3
	Ethanol		165.02		135
	Acétate d'éthyle		70.11		93.33
Macération assistée par Ultrasons (MAU)	Méthanol		102.48		89.25
	Ethanol		82.56		97.63
	Acétate d'éthyle		65.02		61.09

L'examen des résultats obtenus montre que les extraits des feuilles d'olivier possèdent des teneurs en polyphénols totaux significativement différentes en relation étroite avec la nature du solvant d'extraction. Les teneurs élevées ont été observées en utilisant les solvants polaires. Le dosage des polyphénols totaux de la variété chemlal montrent que l'extrait éthanolique obtenu par MAMO (macération assistée par micro-ondes) représente l'extrait le plus riche en polyphénols avec 165,02mg EAG/g d'extrait, suivi de l'extrait méthanolique 128,33 mg EAG/g d'extrait, les extraits méthanolique et éthanolique de la même variété obtenu par MAF (macération à froid) représente des teneurs important en polyphénols 118,10mg EAG/g et 106,05mg EAG/g d'extrait respectivement, alors qu'en présence de l'acétate d'éthyle, le

contenu polyphénolique n'est que de 70,11 mg EAG/g et 80,12 mg EAG/g d'extrait obtenu par MAMO et MAF respectivement de la variété chemlal.

Des quantités élevées en polyphénols ont été décelées dans des extraits des feuilles d'olivier de la variété Limli en utilisant le méthanol comme solvant 148,33 mg EAG/g, l'extrait éthanolique donne 135,00 mg EAG/g obtenu par MAMO. Dans la même variété des quantités importantes en polyphénols en utilisant les solvants polaires, l'éthanol 133,01 mg EAG/g et le méthanol 112,63mg EAG/g obtenu par MAF. Cependant, les extraits obtenus à partir de l'acétate d'éthyle ont montré des teneurs moyens en polyphénols 93,33 mg EAG/g et 78,33 mg EAG/g obtenu par MAMO et MAF respectivement.

Les extraits méthanolique et éthanolique obtenu par la macération assistée par ultrasons (MAU) a donnée des meilleurs teneurs 102,48 mg EAG/g pour la variété Chemlal et 89,25 mg EAG/g pour la variété Limli en utilisant le méthanol comme solvant. L'extrait éthanolique donne des teneurs importantes en polyphénols pour les deux variétés, une teneur de 97,63 mg EAG/g pour la variété Limli et 82,56 mg EAG/g pour la variété Chemlal. L'extrait l'acétate d'éthyle a donnée des teneurs faibles en polyphénols 61,09 mg EAG/g et 65,02 mg EAG/g.

En effet, l'étude effectuée par F. Brahmi et al. a révélé que la teneur des polyphénols totaux présents dans les extrait méthanolique et d'acétate d'éthyle des feuilles d'olivier est de 578,42 et 62,25 mg EAG/100g respectivement, il est important de mentionner que nos résultats donnent des valeurs supérieures à celles trouvées par F. Brahmi et al. [15].

En comparant à d'autres travaux [16], La teneur en polyphénols de nous extraits méthanolique, éthanolique et d'acétate d'éthyle des extraits des feuilles d'olivier est beaucoup plus importante que celle trouvée dans l'étude de T. I. Lafka et al qui ont utilisés les feuilles d'olivier de la Grèce (2,06, 2,73 et 1,35 mg EAG/g d'extrait). Cet intervalle relativement large entre les deux résultats est lié à la différence des origines des feuilles d'olivier.

Les **figures IV.9 et IV.10** illustrent la teneur en PT et FT en utilisant des solvants de polarité différente pour les trois méthodes d'extraction.

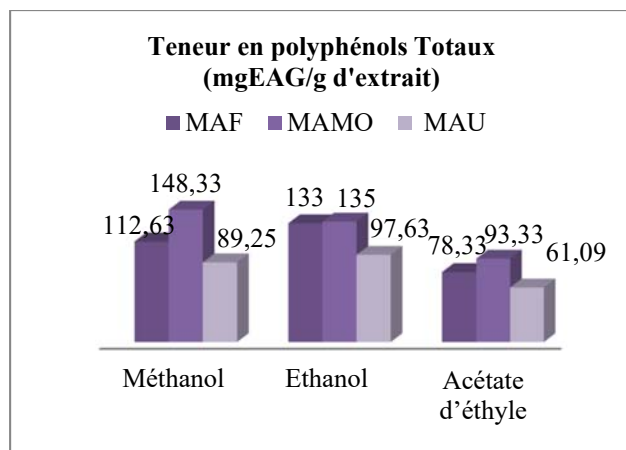


Figure IV.9 : Teneur en polyphénols Totaux de la variété Limli

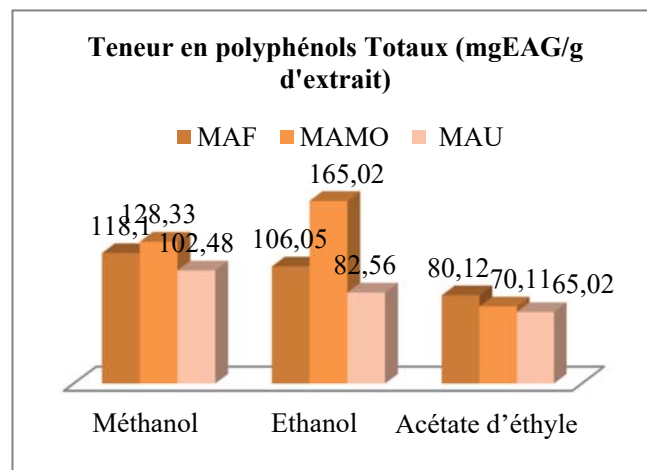


Figure IV.10 : Teneur en polyphénols Totaux de la variété Chemlal

II.5.2. Etude des rendements en flavonoïdes totaux fonction de la méthode d'extraction et du solvant :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), la quercétine a été utilisée comme étalon, l'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm.

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en milligramme d'équivalent de la quercétine par gramme de poids d'extrait (mg EQ/g).

Tableau IV. 5 : Rendements en flavonoïdes totaux (FT)

Méthode	Solvant	Variété	FT	Variété	FT
Macération à froid (MAF)	Méthanol	Chemlal	18.88	Limli	25.70
	Ethanol		24.69		16.21
	Acétate d'éthyle		16.47		22.26
Macération assistée par micro-ondes (MAMO)	Méthanol		38.59		65.86
	Ethanol		41.93		41.50
	Acétate d'éthyle		47.77		27.07
Macération assistée par Ultrasons (MAU)	Méthanol		17.36		22.35
	Ethanol		30.15		18.24
	Acétate d'éthyle		18.05		19.03

Les flavonoïdes sont également des molécules bioactives et parmi les principaux composés responsables sur les différents effets thérapeutiques de nos plantes.

Le dosage des flavonoïdes totaux de la variété Limli montrent que l'extrait méthanolique obtenu par MAMO représente l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec 65,86 mg EQ/g d'extrait, suivi de l'extrait éthanolique 41,50mg EQ/g d'extrait, les extraits méthanolique et éthanolique de la même variété obtenu par MAF représente des teneurs important en flavonoïdes 25,70 mg EQ/g et 16,21 mg EQ/g d'extrait respectivement, alors qu'en présence de l'acétate d'éthyle, le contenu des flavonoïdes donne 22,26mg EQ/g et 27,07mg EQ/g d'extrait obtenu par MAMO et MAF respectivement de la variété Limli.

Des quantités élevées en flavonoïdes ont été décelées dans des extraits des feuilles d'olivier de la variété Chemlal en utilisant l'éthanol comme solvant 41,93 mg EQ/g, l'extrait méthanolique donne 38,57mg EQ/g obtenu par MAMO. Dans la même variété des quantités importantes en flavonoïdes en utilisant les solvants polaires, l'éthanol 24,69mg EQ/g et le méthanol 18,88 mg EQ/g obtenu par MAF. Cependant, les extraits obtenus à partir de l'acétate d'éthyle ont montré des teneurs élevées en flavonoïdes 47,77 mg EQ/g obtenu par MAMO et 16,47 mg EQ/g et MAF respectivement.

Les extraits obtenu par la macération assistée par ultrasons (MAU) a donnée des meilleurs teneurs en flavonoïdes 30,15mg EQ/g en utilisant l'éthanol pour la variété Chemlal et 22,35 mg EQ/g pour la variété Limli en utilisant le méthanol comme solvant, l'extrait éthanolique une teneur de 18,24mg EQ/g pour la variété Limli et 17,36 mg EQ/g de l'extrait méthanolique pour la variété Chemlal. L'extrait l'acétate d'éthyle a donnée des teneurs faibles en flavonoïdes 18,05mg EQ/g et 19,03mg EQ/g.

Les Teneur en flavonoïdes des différents extraits d'*Olea europaea* obtenus en utilisant différents solvants d'extraction sont représentés dans les **figures IV.11 et IV.12**.

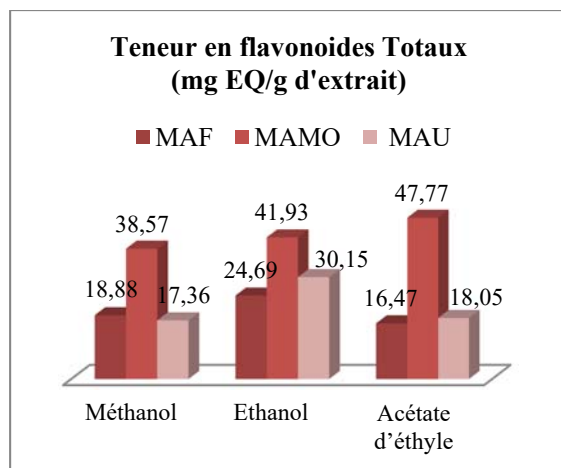


Figure IV.11 : Teneur en flavonoïdes Totaux de la variété Chemlal

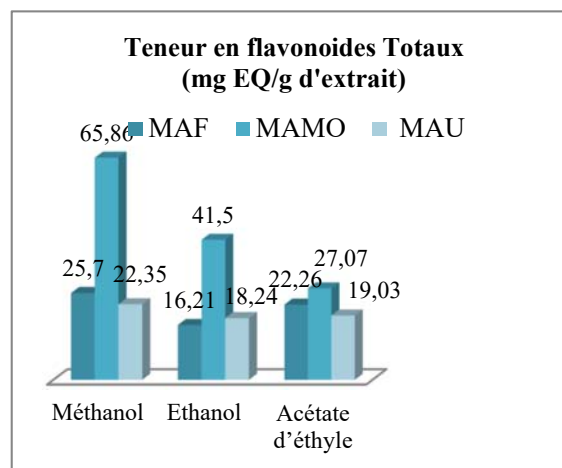


Figure IV.12 : Teneur en flavonoïdes variété Limli

III.1. Activité antioxydante :

Les activités anti-radicalaires de nos extraits ont été déterminées par deux méthodes : le teste de DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) avec le témoin positif BHT (**Figure IV. 13**) et le teste radical cation (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique) (ABTS^{•+}), le Trolox comme témoin positif (**Figure IV. 16**).

- 1. Teste DPPH :** Le protocole expérimental et l'expression des résultats sont détaillés dans le **chapitre III**.

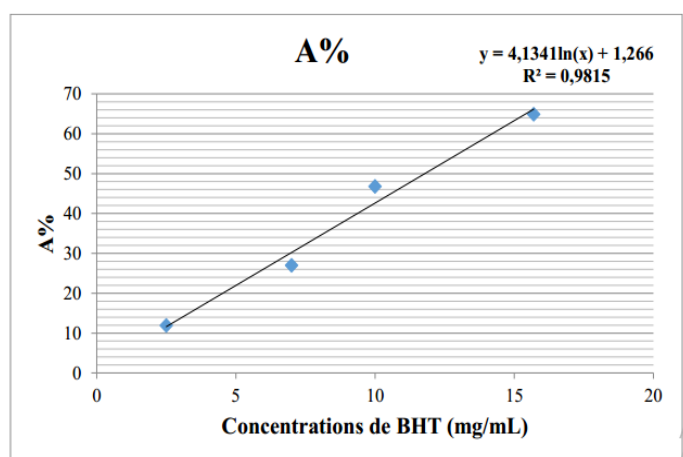


Figure IV. 13: Courbe d'étalonnage de BHT

III.1.1 Etude en fonction du solvant d'extraction.

A-Teste DPPH

Tous les échantillons étudiés des feuilles d'olivier pour les deux variétés (Chemlal et Limli) ont révélé une activité antioxydante relativement moyenne. Les valeurs d'IC₅₀ varient

selon la variété et le solvant d'extraction utilisé. Les extraits obtenus en utilisant le méthanol et l'éthanol ont montré des activités moyennes par rapport au témoin positif le BHT, Les extraits obtenus en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant ont donné des concentrations d'inhibition moyennement faibles.

Au regard des **figures IV.14** et **IV.15**, les extraits des variétés Chemlal et Limli représentent les produits les plus actifs, spécialement l'extrait méthanolique de la variété Chemlal et l'extrait éthanolique de la variété Limli obtenu par la macération assistée par micro-ondes (MAMO) avec une IC₅₀ de l'ordre de 48,30 mg/l 58,21mg/l respectivement.

L'extrait éthanolique de la variété Chemlal et l'extrait méthanolique de la variété Limli ont montré une activité antioxydante moyenne avec une IC₅₀ = 70,49 mg/l et IC₅₀ = 68,89 mg/l respectivement obtenu par MAF. Les solvants polaire ont donné des meilleures activités antioxydante ont utilisant les différents techniques d'extraction avec des valeurs d'IC₅₀ qui varié entre (48,30 mg/l - 113,45 mg/l). Les extraits d'acétate d'éthyle ont montré une faible activité antioxydante avec des IC₅₀ (112,56 mg/l - 180,04 mg/l) ont utilisant les différents techniques d'extraction.

L'extrait éthanolique de la variété Chemlal et l'extrait méthanolique de la variété Limli obtenue par MAU représentent une activité modérée de l'ordre de IC₅₀ = 89,25 mg/ml et 93,75 mg/ml respectivement. Ces résultats sont en accord avec celles trouvées dans des travaux antérieurs [17]

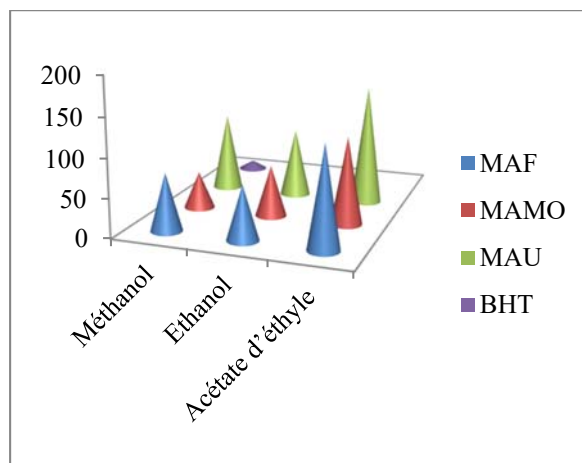


Figure IV.14: Les IC₅₀ des extraits de la variété Chemlal par la méthode de DPPH

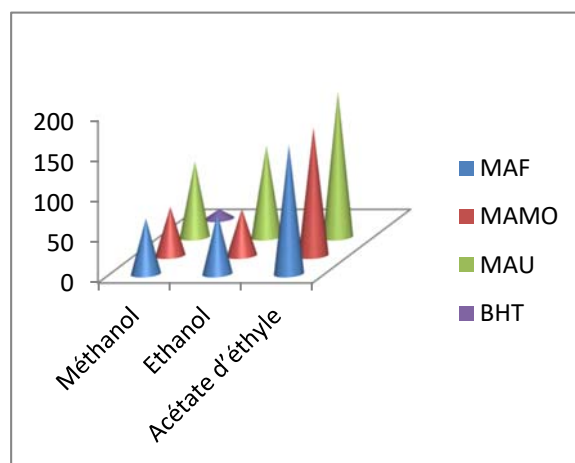


Figure IV.15: Les IC₅₀ des extraits de la variété Limli par la méthode de DPPH

B-Teste ABTS^{•+}

Le protocole expérimental et l'expression des résultats sont détaillés dans le **chapitre III**. Les **figures IV.20 et IV.21** présente les concentrations d'inhibition IC₅₀ des différents extraits d'*Olea europaea* ainsi que témoin positif obtenu du teste de piégeage du radical ABTS^{•+}.

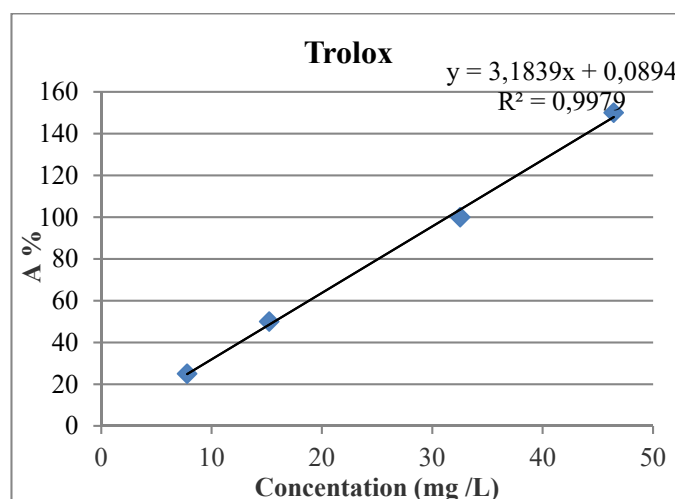


Figure IV. 16 : Courbe d'étalonnage de Trolox

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus ont montré que tous les extraits testés ont des IC₅₀ faibles et donc des activités antioxydantes plus élevées que celle de l'antioxydant de Trolox. Les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires ont montré une forte activité pour les deux variétés.

Les extraits méthanolique et éthanolique obtenus par MAMO ont montré la plus forte activité de piégeage de radicaux de Trolox avec une IC₅₀ = 46,21±0,99 mg/ml et 54,87±1,59 mg/ml pour la variété Chemlal, 57,03±1,83 et 62,23±0,86 pour la variété Limli respectivement. En utilisant les mêmes solvants la MAF a donné des valeurs importantes de IC₅₀ donc une forte activité antioxydante avec des valeurs de IC₅₀ = 50,55±1,45 mg/ml et 65,71±1,52 mg/ml pour les extraits méthanolique, des IC₅₀ = 60,87±0,89 mg/ml et 78,32±1,63 mg/ml pour les extraits éthanolique pour les deux variétés Chemlal et Limli respectivement.

Les extraits d'acétate d'éthyle ont révélé une activité antioxydante relativement moyenne avec des valeurs de IC₅₀ qui varient entre (105,45±1,85 mg/ml - 154,29±1,03 mg/ml) pour les deux variétés en utilisant les différentes techniques d'extraction.

Les extraits obtenus en utilisant méthanol et éthanol comme solvant obtenus par MAU à donner des valeurs élevées qui varient entre ($IC_{50} = 89,25 \pm 1,85$ mg/ml - $109,08 \pm 1,04$ mg/ml) par rapport au témoin positif Trolox ($IC_{50} = 15,68 \pm 1,66$ mg/ml). Il est important de mentionner que nos résultats donnent des valeurs largement inférieures à celles trouvées par Eman et al [17].

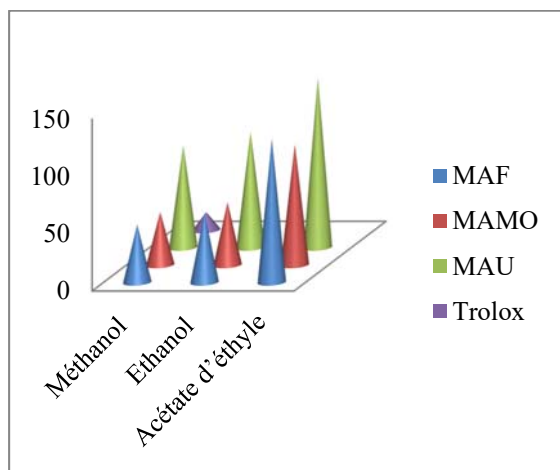


Figure IV.17 : Valeurs IC_{50} des extraits variété Chemlal par la méthode de $ABTS^{++}$

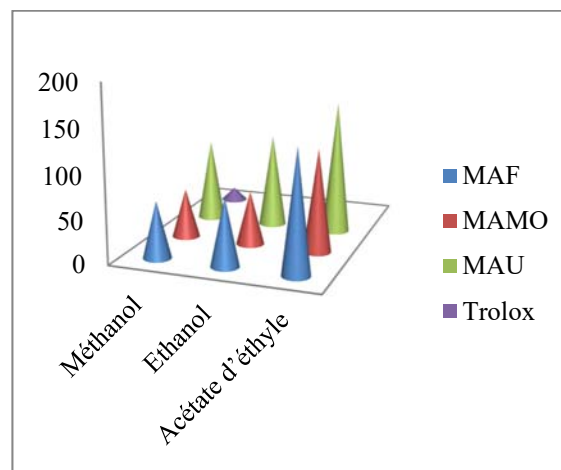


Figure IV. 18: Valeurs IC_{50} des extraits variété Limli par la méthode de $ABTS^{++}$

L'un des avantages de l'extraction assistée par micro-ondes est incontestablement le gain de temps et donc par conséquent l'économie de l'énergie. En ce qui concerne cette partie analytique, nous pouvons conclure que l'extraction assistée par micro-onde des polyphénols et flavonoïdes est plus rapide et plus efficace du point de vue quantitatif.

L'ensemble des résultats quantitatifs obtenus par les dosages spectrométriques (UV-Vis) montre que l'extraction assistée par micro-ondes fournit des rendements plus élevés. L'explication de la différence de composition chimique entre le procédé par chauffage conventionnel et celui par micro-ondes pourrait être basée principalement sur des phénomènes de solubilités.

Le chauffage par micro-ondes peut inhiber la dégradation ou la décomposition des polyphénols, y compris celle des flavonoïdes dans la matrice végétale, et par conséquent augmenter leurs solubilités [18,19]. De plus, la chaleur produite par l'irradiation des micro-ondes peut libérer facilement les composés phénoliques présents dans la matrice végétale [20].

Pour une meilleure compréhension des phénomènes d'extraction par micro-ondes. Paré et Bélanger [21] ont démontré un mécanisme thermique qui explique la domination des produits obtenus par micro-ondes. Ce mécanisme repose sur le principe que la matrice végétale s'endommage en raison de l'explosion produite au niveau de la paroi cellulaire, conséquence de l'augmentation soudaine de la température. Ces dommages sont générés par des points chauds produits à l'interface des parois lors de l'irradiation par micro-ondes. En effet, quand les glandes sont sujettes à un stress thermique très sévère et de haute pression localisée, induit par un chauffage spécifique de type micro-ondes, la pression interne dans les glandes peut excéder leur capacité d'expansion externe. En conséquence, une rupture plus rapide survient par rapport à celle réalisée par chauffage conventionnel ou par macération. De plus, la présence des composés polaires tels que l'eau et les composés oxygénés, peut provoquer une augmentation soudaine de la température favorisant un processus de déshydratation localisé avec une vitesse de chauffage très élevée à l'intérieur de la cellule. Ce dernier phénomène augmente la vitesse de transfert des constituants de la cellule à travers les parois cellulaires.

Les micro-ondes présentent l'intérêt d'être une source d'énergie contrôlable de façon instantanée et réglable avec précision. Le chauffage par micro-ondes n'a pas l'inertie thermique du chauffage par conduction et convection à partir d'une paroi chaude, pour lequel l'efficacité du transfert thermique est limitée. L'extraction sous micro-ondes est caractérisée par des vitesses d'extraction supérieures à celle de l'extraction traditionnelle et qui peuvent s'accompagner d'une modification de la sélectivité et la reproductibilité d'extraction.

L'étude de l'effet du solvant sur le rendement d'extraction, la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux et sur l'activité antioxydante des extraits des feuilles d'olivier des deux variétés Chemlal et Limli, révèle qu'il y a une relation proportionnelle entre la polarité du solvant et l'extraction des antioxydants

Parmi les trois solvants utilisés, l'éthanol semble être le meilleur solvant d'extraction quelles que soient la nature des polyphénols et des flavonoïdes présents dans les différentes variétés, les expériences ont montré que l'éthanol est plus efficace pour l'extraction des antioxydants en offrant les meilleurs rendements, les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes les plus élevées et donc, une activité antioxydante remarquable.

III.1.2 Etude en fonction de la méthode d'extraction

A-Teste DPPH

Les concentrations inhibitrices IC₅₀ des différents extraits échantillons ainsi que celle de tests standard synthétique BHT sont présentées dans les **figures IV.19 et IV.20**.

Tous les extraits testés ont révélé une activité anti radicalaire mais d'importance différente. Les valeurs d'IC₅₀ varient selon la variété et la méthode d'extraction utilisée. Les extraits obtenus par MAMO ont montré une activité antioxydante relativement moyenne par rapport au témoin positif BHT avec des valeurs qui varient entre (48,30±1,53 mg/ml - 66,62±1,45 mg/ml) pour les deux variétés en utilisant le méthanol et éthanol comme solvant. Les extraits obtenus par MAF en utilisant les solvants polaires ont donné des concentrations d'inhibition faibles, pour la variété Chemlal la valeur de IC₅₀ = 75,19±0,99 mg/l de l'extrait méthanolique et IC₅₀ = 70,49±1,09 mg/l de l'extrait éthanolique. La variété Limli donne des valeurs de IC₅₀ = 68,89±0,86 mg/l et IC₅₀ = 75,31±1,43 mg/l ont utilisant les mêmes solvants. Les extraits obtenus par MAU ont donné des concentrations d'inhibition très faibles avec des IC₅₀ = 89,25±0,56 mg/l à IC₅₀ = 180,04±1,58mg/l.

Dans l'ensemble, les extraits obtenus par la MAMO montrent une capacité plus élevée de piégeage des radicaux libres DPPH comparée à celle trouvée par les extraits obtenus par la MAF, cela est dû probablement à la quantité des polyphénols qui est considérée meilleure par rapport à la quantité trouvée dans les extraits obtenus par la MAF. Cependant, Kang et al. ont suggéré que les extraits végétaux qui contiennent des molécules polaires montrent une activité anti-radicalaire élevée [22].

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. Grâce à leur faible potentiel redox, les polyphénols (Fl-OH), sont thermodynamiquement capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO•), alkoxydes (RO•) et hydroxyle par transfert d'hydrogène selon la réaction suivante : $Fl-OH + X \rightarrow Fl-O + XH$ [23].

Les valeurs des IC₅₀ des différents extraits ainsi que celle de tests standard synthétique BHT sont présentées dans les **figures IV.19 et IV.20**.

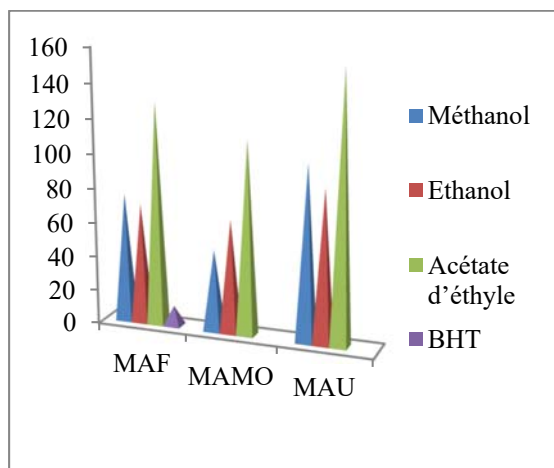


Figure IV. 19 : Les IC₅₀ des extraits de la variété Chemlal par la méthode de DPPH

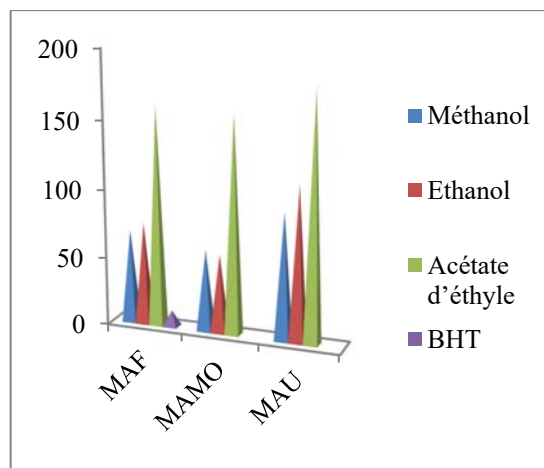


Figure IV.20: Les IC₅₀ des extraits de la variété Limli par la méthode de DPPH

B-Teste ABTS

Les concentrations inhibitrices IC₅₀ des différents extraits échantillons ainsi que celle de tests standard synthétique Trolox sont présentées dans les **figure IV.21** et **IV.22**.

L'extraction par la méthode MAMO a présenté la meilleure activité antioxydante avec une concentration inhibitrice de $46,21 \pm 0,99$ mg/ml et $57,03 \pm 1,83$ mg/ml des extraits méthanolique, pour les extraits éthanoliques $54,87 \pm 1,59$ mg/ml et $62,23 \pm 0,86$ mg/ml pour la variété Chemlal et Limli respectivement. La macération à froid MAF nous a permis d'obtenir une activité antioxydante importante pour les deux variétés des valeurs d'IC₅₀ ($50,55 \pm 1,45$ et $65,71 \pm 1,52$ mg/ml) des extraits méthanolique et ($60,87 \pm 0,89$ et $62,23 \pm 0,86$ mg/ml) des extraits éthanoliques.

L'extraction par macération assistée par ultrason (MAU) nous a permis d'obtenir une activité antioxydante relativement faible comparée à les méthodes MAMO et MAF avec des valeurs de IC₅₀ qui varié entre $89,25 \pm 1,85$ - $154,29 \pm 1,03$ mg/ml ont utilisant les différents solvants. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits testés présentent une activité antioxydante moyenne à celle de standard utilisé le Trolox qui présent une valeur de IC₅₀ $15,68 \pm 0,86$ mg/ml

La différence du potentiel antioxydant entre les extraits testés peut être expliquée par la dépendance de ce dernier de la nature physico-chimique des composés présents dans les extraits et par la différence de sélectivité du solvant pour extraire certains groupes d'antioxydants [24]

L'étude portant sur la fraction non volatile, correspondant aux composés phénoliques, nous a permis de démontrer clairement l'influence des solvants et de la méthode d'extraction

sur le rendement, la teneur en composés phénoliques totaux et flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante pour chaque variété.

De façon générale, nous avons constaté, que les valeurs obtenues par la méthode DPPH sont légèrement plus élevées, ce qui indique une capacité d'inhibition inférieure à celle de l'ABTS. Nos observations sont conformes à celles indiquées par divers auteurs, qui signalent que l'inhibition de l'ABTS pour des échantillons de légumes, de fruits et de boissons est supérieure à l'inhibition de DPPH [25,26]. Cela s'explique par le fait que la méthode DPPH est caractérisée par une sensibilité plus faible. La réaction des radicaux DPPH avec la plupart des molécules actives est plus lente que les radicaux ABTS [27].

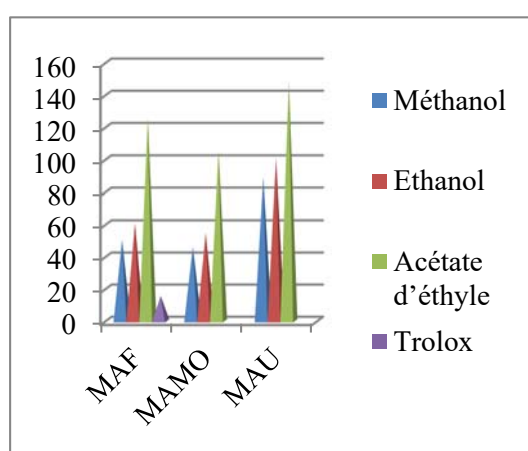


Figure IV. 21 : Les IC₅₀ des extraits de la variété Chemlal par la méthode de ABTS

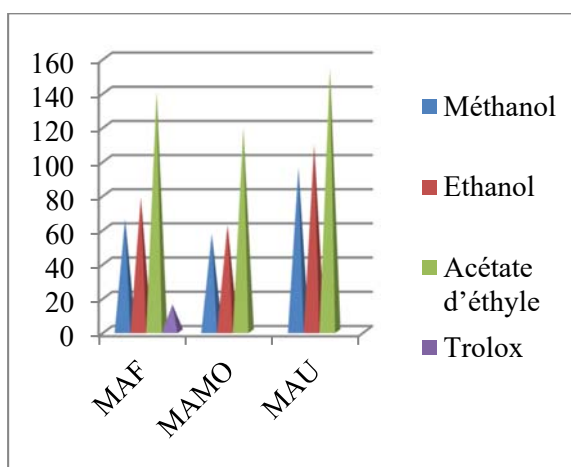


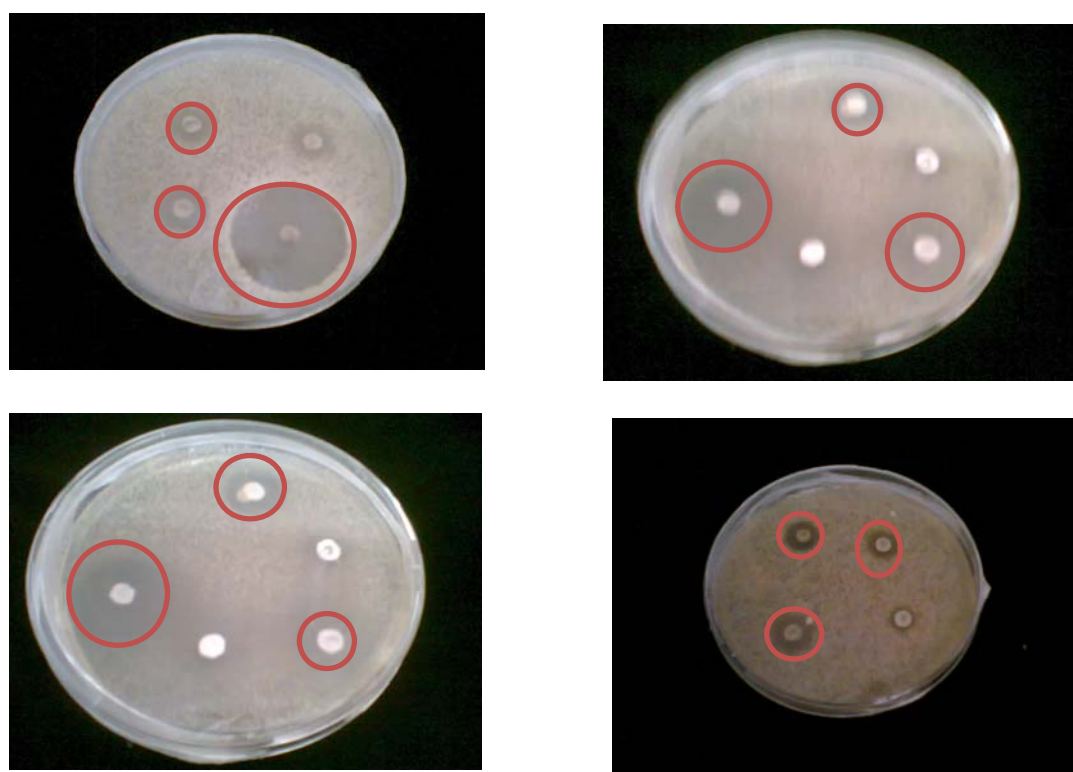
Figure IV.22: Les IC₅₀ des extraits de la variété Limli par la méthode de ABTS

IV. Activité antimicrobienne de quelque extrait d'*Olea europaea* exprimée en diamètre de la zone d'inhibition (mm)

Pour mettre en évidence l'activité antibactérienne, des extraits végétaux des feuilles d'olivier de deux variétés (Chemlal et Limli) ont été testés vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli*) et deux champignons pathogènes: *Aspergillus carbonarius* et *Umbulopsis ramanniana* de référence en utilisant la technique de diffusion sur gélose. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré afin de déterminer l'importance de cette activité. Les résultats sont présentés dans le **Tableau IV.6**

Tableau IV.6 : Activité antibactérienne des extraits des feuilles d'olivier exprimée en diamètre de la zone d'inhibition (mm)

	Variété						
	Chemlal			Limli			
Méthode d'extraction	Macération à froid (MAF)						
Solvant Bactéries	Méthanol	Ethanol	Acétate d'éthyle	Méthanol	Ethanol	Acétate d'éthyle	
<i>B. subtilis</i> (Bs)	11	10	8	14	12	10	45
<i>S. aureus</i> (Sa)	14	26	9	28	32	8	27
<i>P. aeruginosa</i> (Pa)	10	12	9	13	15	10	21
<i>E. coli</i> (Ec)	-	-	-	-	-	-	-
Champignon							
<i>U. ramanniana</i> (Ur)	12	15	9	10	14	11	37
<i>A. carbonarius</i> (Ac)	-	-	-	-	-	-	-

**Figure IV.23 :** Activité antibactérienne des extraits méthanolique, éthabnolique et acétate d'éthyle d'*Olea europaea* L. des deux variétés Chemlal et Limli vis- à-vis *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *U. ramanniana*.

Selon les résultats représentés sur le **Tableau IV.6**, les extraits méthanolique et éthanolique de feuilles d'olivier des deux variétés Chemlal et Limli ont présenté une forte activité antibactérienne. L'extrait d'acétate d'éthyle présente une activité antibactérienne moyenne, un antibiotique (Amoxicilline) utilisé comme témoin positif.

Les diamètres d'inhibition enregistrés vis-à-vis de *S. aureus* étaient de 26 mm et 14 mm respectivement pour les extraits éthanolique, méthanolique de la variété Chemlal. La variété Limli présente une zone d'inhibition des diamètres de 32 mm et 28 mm ont utilisant les mêmes solvants respectivement, nos résultats sont supérieurs à celle des travaux effectués par Erdohan et al [28].

Tandis que les diamètres d'inhibition enregistrés pour *B. subtilis* étaient de 11 mm et 10 mm pour les extraits méthanolique, éthanolique respectivement de la variété Chemlal. Une zone d'inhibition des diamètres de 14 mm, 12 mm ont utilisant méthanol, éthanol comme solvant obtenu pour la variété Limli.

Enfin, Les diamètres d'inhibition enregistrés vis-à-vis de *P. aeruginosa* étaient de 12 mm et 15 mm pour l'extrait éthanolique obtenu pour la variété Chemlal et Limli respectivement. Les deux variétés présentes des diamètres d'inhibition de 10 mm et 13 mm pour l'extrait méthanolique nos résultats sont relativement en accord avec les études précédemment citées [29].

Les zones d'inhibitions de l'extrait d'acétate d'éthyle étaient de 8 mm, 9 mm et 9 mm, respectivement vis-à-vis de *S. aureus* *B. subtili* et *P. aeruginosa* de la variété Chemlal et 10 mm, 8 mm et 10 mm pour la variété Limli pour les mêmes souches bactériennes.

La souche bactérienne *E. coli* n'a pas présenté aucune activité antibactérienne pour tous les extraits testés pour les deux variétés.

Les résultats obtenus ont développé une bonne activité antifongique des extraits des feuilles d'olivier vis-à-vis *U. Ramanniana* présenté dans la variété Chemlal et Limli ont utilisant les différents solvants, Les zones d'inhibitions varié entre (10 mm -15 mm) pour les extraits méthanolique, éthanolique et 9 mm et 11 mm pour l'extrait d'acétate d'éthyle respectivement.

Comparativement aux extraits végétaux, l'amoxicilline a exercé un effet inhibiteur plus élevé contre les micro-organismes testés (les bactéries *B. subtilis* et *P. aeruginosa* et le champignon *U. Ramanniana*). Concernant Les extraits éthanolique et méthanolique de la variété Limli, nous avons observé des zones d'inhibition de 32 mm et 28 mm lorsque l'extrait a été testé contre les bactéries *S. aureus* une activité plus importante que celle de l'amoxicilline.

Néanmoins, la bactérie Gram⁻ *E. coli* et le champignon *A. carbonarius* n'ont pas été sensibles à l'amoxicilline à une concentration de 25 µg par disque.

V. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de quelque extrait

V.1. Extrait méthanolique de la variété Chemlal et Limli

Les résultats obtenus de l'extrait méthanolique d'*Olea europaea* L. des deux variétés Chemlal et Limli à différentes doses sont présentés dans le **Tableau IV.7**.

Tableau IV.7 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) extrait méthanolique d'*Olea europaea* L. des deux variétés Chemlal et Limli

		Concentration (mg/ml)		
Variété	Souches	0,75	0,50	0,25
Chemlal	<i>S. aureus</i> (Sa)	+	+	-
	<i>P.aeruginosa</i> (Pa)	+	+	+
	<i>U. ramanniana</i> (Ur)	+	+	+
Limli	<i>S.aureus</i> (Sa)	+	+	+
	<i>P. aeruginosa</i> (Pa)	+	-	+
	<i>U. ramanniana</i> (Ur)	-	-	-

- : inhibition ; + : croissance

Dans le **Tableau IV.7** représente les croissances des différentes souches dans le milieu de culture. La croissance indique qu'il n'y pas d'inhibition et donc pas d'activité antimicrobienne. Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait de la variété Chemlal n'a pas d'effet sur la souche bactérienne *Pa* et le champignon *Ur*. Cependant, la croissance de la souche *Sa* a été ralentie par cet extrait et la concentration minimale inhibitrice (CMI) est 0,25(mg/ml). L'extrait de la variété Limli n'a pas d'effet sur la souche bactérienne *Sa* mais la souche *Pa* et le champignon *Ur* a été ralentie par cet extrait et la concentration minimale inhibitrice (CMI) est 0,50(mg/ml) est en dessous de 0,25(mg/ml) respectivement.

V.2. Extrait éthanolique de la variété Chemlal et Limli

Les résultats obtenus de l'extrait éthanolique d'*Olea europaea* L. des deux variétés Chemlal et Limli à différentes doses sont présentés dans le **Tableau IV.8**.

Tableau IV.8 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) extrait éthanolique d'*Olea europaea* L. des deux variétés Chemlal et Limli

		Concentration (mg/ml)		
Variété	Souches	0,75	0,50	0,25
Chemlal	<i>S. aureus</i>	+	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+
	<i>U. ramanniana</i>	+	+	+
Limli	<i>S. aureus</i>	+	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+
	<i>U. ramanniana</i>	+	+	+

- : inhibition ; + : croissance

Les résultats obtenus ont révélé que les extraits deux variétés Chemlal et Limli n'a pas d'effet sur la souche bactérienne *Pa* et le champignon *Ur* mais la souche *Sa* a été ralentie par ces extraits et la concentration minimale inhibitrice (CMI) et 0,25(mg/ml).

V.3. Extrait d'acétate d'éthyle la variété Chemlal et Limli

Les résultats obtenus de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Olea europaea* L. des deux variétés Chemlal et Limli à différentes doses sont présentés dans le **Tableau IV.9**.

Tableau IV.9 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) extrait d'acétate d'éthyle d'*Olea europaea* L. des deux variétés Chemlal et Limli

		Concentration (mg/ml)		
Variété	Souches	0,75	0,5	0,25
Chemlal	<i>S. aureus</i>	+	+	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	-
	<i>U. ramanniana</i>	+	+	+
Limli	<i>S. aureus</i>	+	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-
	<i>U. ramanniana</i>	+	+	+

- : inhibition ; + : croissance

Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait d'acétate d'éthyle deux variétés Chemlal et Limli n'a pas d'effet sur le champignon *Ur*. Cependant, la croissance de la souche *Sa* et *Pa* a été ralentie par cet extrait pour les deux variétés et la concentration minimale inhibitrice (CMI) est 0,25(mg/ml).

VI. Activité anti-inflammatoire

Nous avons testé la capacité des extraits des variétés étudiées à inhiber l'œdème provoqué par l'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche de la souris. Après coupure des pattes, les moyennes arithmétiques des poids des pattes gauche et droite de la souris, les pourcentages d'œdème et les pourcentages de réduction de l'œdème ont été calculées. L'ensemble des résultats sont résumés dans les **tableaux IV.10 et IV.11**.

Tableau IV.10 : Moyennes arithmétiques des poids des pattes gauches et droites de la souris, pourcentages d'œdème et pourcentages de réduction de l'œdème pour l'extrait éthanolique d'*Olea europaea* L. de la variété Chemlal.

	Poids moyen de la patte gauche (g)	Poids moyen de la patte droite (g)	% d'œdème	% de réduction de l'œdème
Témoin (eau distillée)	0,169	0,138	18,34	-
Témoin positif (ACEPRAL: 40mg.kg ⁻¹)	0,127	0,1133	10,79	41,18
Doses testés (mg.kg ⁻¹)	500	0,1589	0,1336	15,92
	1000	0,1383	0,1197	13,45
	2000	0,1198	0,1065	11,10

Tableau IV.11 : Moyennes arithmétiques des poids des pattes gauches et droites de la souris, pourcentages d'œdème et pourcentages de réduction de l'œdème pour l'extrait éthanolique d'*Olea europaea* L. de la variété Limli.

	Poids moyen de la patte gauche (g)	Poids moyen de la patte droite (g)	% d'œdème	% de réduction de l'œdème
Témoin (eau distillée)	0,1891	0,1382	26,92	
Témoin positif (ACEPRAL: 40 mg.kg ⁻¹)	0,1415	0,1203	14,98	44,34
Doses testés (mg.kg ⁻¹)	500	0,1379	0,1028	25,45
	1000	0,1283	0,1027	19,95
	2000	0,1398	0,1165	16,67

L'analyse des **Tableau IV.10 et IV.11** montre l'existence d'un anti-inflammatoire important des deux extraits testés. Cet effet est proportionnel à la dose administrée.

Les expérimentations réalisées permettent de mettre en valeur la capacité anti-inflammatoire des extraits végétaux. Les meilleurs pourcentages d'inhibition ont été observés

pour une dose de 200 mg.kg^{-1} avec des valeurs de 49,21 % pour la variété Chemlal et 57,42 % pour la variété Limli d'*Olea europaea* L. Comparativement, l'activité anti inflammatoire de la référence (ACEPRAL) est plus importante avec un pourcentage de réduction de l'œdème 41,18% et 44,34% respectivement.

Conclusion

Les résultats de cette étude ont montré que les feuilles d'*Olea europaea* L. possèdent un effet anti inflammatoire ce qui confirme l'usage traditionnel de cette plante comme agent anti inflammatoire, et il sera très intéressant de montrer son usage externe en proposant des formes galéniques nouvelles, notamment des formulations sous forme de crèmes et de gels.

1. C. Boutekedjret, R. Belabbes, F. Bentahar, J.M. Bessière, S.A. Rezzoug. (2004). Isolation of Rosemary Oils by different processes. J. Essent. Oil Res. 16: 195-199.
2. A. Chalchat, B. Michet, Pasquier, (1998). Flavour Fragr J. 13, 68.
3. S. Rgueza, K. Msaadaa, M. Daami-Remadib, I. Chayebc, I. Bettaieb Rebeya, M. Hammamia, A. Laarific. I. Hamrouni-Sellamia. (2019). Chemical composition and biological activities of essential oils of *Salvia officinalis* aerial parts as affected by diurnal variations. Plant Bios - An In J Dealing with all Asp of Pl Biology. 153:2, 264-27
4. A. Russo, C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Delfine, V. Cardile, S. Rosselli, M. Bruno. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. Food Chem Toxicol. 55:42-47
5. M. P. ARRAIZA, C. Arrabal, J. V. LÓPEZ. (2012). Seasonal Variation of Essential Oil Yield and Composition of Sage (*Salvia officinalis* L.) Grown in Castilla - La Mancha (Central Spain). notulae botanicae.ro Not Bot Horti Agrobo, 40(2): 1842-4309
6. R. Sabbobeh, H. Hejaz, A. Jahajha. (2016). Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Leaf Extract of *Salvia palaestina*. J of App Pharma Sci. 6: 076-082.
7. Recueil des normes françaises ; Huiles essentielles ; AFNOR, Paris, 1992.
8. S. Fellah, M. Romdhane, M. Abderraba. (2006). Extraction Et Etude Des Huiles Essentielles De La *Salvia officinalis*. L Cueillie Dans Deux Regions Differentes De La Tunisie. J de la Soci Alg de Chim 16(2), 193-202
9. Fellah, S. (2001). Valorisation de l'huile essentielle de la *salvia officinalis* de Tunis, extraction et étude physico-chimique et théorique. DEA en chimie organique Fac des Sciences de Tunis
10. M. Viuda-Martos, Y. Ru  z-Navajas, J. Fernández-López, J.A. Pérez- lvarez. (2007). Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. Acta Chim. Slov. 54: 921-926.
11. T. Dob, T. Berramdane, D. Dahmane, T. Benabdelkader, C. Chelghoum. (2007). Chemical composition of the essential oil of *Salvia officinalis* from Algeria. Chem. Nat. Compd. 43(4): 491-494.
12. S. Fellah, M. Romdhane, M. Abderraba. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* L. cueillie dans deux régions differentes de la Tunisie. J. Soc. Alg. Chim. 16(2): 193-202.
13. M.C. D  az-Maroto, M.S. Perez-Coello, M.A. González  Villas, M.D. Cabezudo. (2003). Influence of drying on the flavor quality of spearmint (*Mentha spicata* L.). J. Agr. Food Chem. 51: 265-1269.
14. A.L. Yousif, C.H. Scaman, T.D. Durance, B. Girard. (1999). Flavour volatiles and physical properties of vacuum microwave and air dried sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). J. Agr. Food Chem. 47: 4777-4781.
15. I. Hamrouni-Sellami, I. Bettaieb Rebey, J. Sriti, F.Z. Rahali, F. Limam, B. Marzouk, (2012). Drying sage (*Salvia officinalis* L.) plants and its Effects on content, chemical

- composition, and radical scavenging activity of the essential oil. Food Bioprocess Technol. 5: 2978-2989.
16. O.T. Asekun, D.S. Grierson, A.J. Afolayan. (2007). Effets des méthodes de séchage sur la qualité et la quantité de l'huile essentielle de *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. Food Chem. 101(3): 995-998.
 17. Romeilah, R.M., Ghada, I.M., Sayed, F. (2010). Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. J. Appl. Sci. Res. 6(1): 50-62.
 18. Codex alimentarius commission, a. (1999). Additifs alimentaires. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, FAO, Rome. Section 5.6. 1A: 187-202.
 19. A. Tomaino, F. Cimino, V. Zimbalatti, V. Venuti, V. Sulfaro, A. De Pasquale. (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. Food Chem. 89: 549-554.
 20. A. Annane, M. Boualili. (2013). Evaluation in vitro de l'Action Antibactérienne d'Huile Essentielle de Sauge Officinale.L. (*Salvia officinalis*) de la région Nord-ouest de Tizi-Ouzou. Thèse.
 21. M. Bouaziz, T. Yangui, S. Saya, A. Dhouib. (2009). Disinfectant activities of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. Food Chem. Toxicol. 47: 2755-2760.
 22. M. Mahboubi, N. Kazempour. (2009). The antimicrobial activity of essential oil from *Perovskia abrotanoides* Karel and its main components. Indian J. Pharm. Sci. 71(3): 343-347.
 23. S. Lakehal, A. Meliani, S. Benmimoune, S.N. Bensouna, F.Z. Benrebiha, C. Chaouia. (2016). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. Med. Chem. 6(6): 435-439.

Conclusion

Conclusion Générale

Conclusion

D'autre part, les huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. obtenues par HD, HDMO et EV ont montré une activité antioxydante relativement faible par rapport au BHT, alors qu'elles ont montré un effet antibactérien important contre les souches bactériennes *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, et un effet antifongique plus important que l'antibiotique standard Lamidaz, contre les deux champignons pathogènes: *Umbulopsis ramanniana*, *Aspergillus carbonarius*.

Pour ce qui concerne l'étude des extraits de l'*Olea europaea* L., l'étude de l'effet de la polarité du solvant, et l'effet de la méthode d'extraction des molécules bioactives. L'utilisation d'une méthode innovante (MAMO) à savoir l'extraction assistée par microondes pour l'extraction des polyphénols à côté aux autres techniques, macération à froid (MAF) et macération assistée par ultrasons (MAU) a permis une étude comparative intéressante.

Cette étude a montré que la polarité du solvant, le mode d'extraction et la durée ont eu une influence importante sur les extraits obtenus, ce qui a conduit donc à une différence aussi bien qualitative que quantitative. Parmi les trois solvants employés, l'éthanol est le solvant le plus approprié pour l'extraction. De plus le procédé MAMO est considéré comme étant le plus efficace parmi les différentes techniques d'extraction utilisées.

L'analyse des différents extraits par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-DAD-ESI-MS/MS) a permis de mettre en évidence dix composés phénoliques dans l'extrait méthanolique et douze de composés dans l'extrait éthanolique.

L'évaluation de l'activité antioxydante par les deux méthodes DPPH et ABTS des extraits obtenus par les trois méthodes en utilisant des solvants de polarité différente (méthanolique, éthanolique et acétate d'éthyle), a été concluante pour les extraits testés.

L'étude in vitro de l'activité antimicrobienne et antifongique des extraits des feuilles d'*Olea europaea* L., a montré un effet d'inhibition positif sur les bactéries, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et sur le Champignon *U. ramanniana*. Mais aucun effet n'a été observé sur la bactérie *Escherichia coli*, et le champignon *A. carbonarius*.

L'étude in vivo de l'activité anti inflammatoire des différents extraits administrés par voie intra-gastrique, a montré une activité importante comparée à un médicament anti inflammatoire (ACEPRAL). Les meilleurs pourcentages d'inhibition ont été observés pour une dose de 200 mg.kg⁻¹ avec des valeurs de 49,21 % pour la variété Chemlal et 57,42 % pour la variété Limli. Cette étude a confirmé l'usage traditionnel de cette plante comme agent anti inflammatoire.

Conclusion Générale

Les résultats obtenus dans le cas des feuilles d'*Olea europaea* L. sont originaux et prometteurs. En effet, l'investigation de deux plantes étudiées pourrait révéler de nouveaux composés très actifs qui nous incitent à l'avenir à :

- L'analyse des huiles essentielles des feuilles de *Salvia officinalis* L. en faisant des études sur la matrice végétale en faisant varier plusieurs paramètres (extraction, saison, lieu... etc).
- isoler, purifier et identifier les composés qui sont susceptibles d'être responsables des activités biologiques

ANNEXE

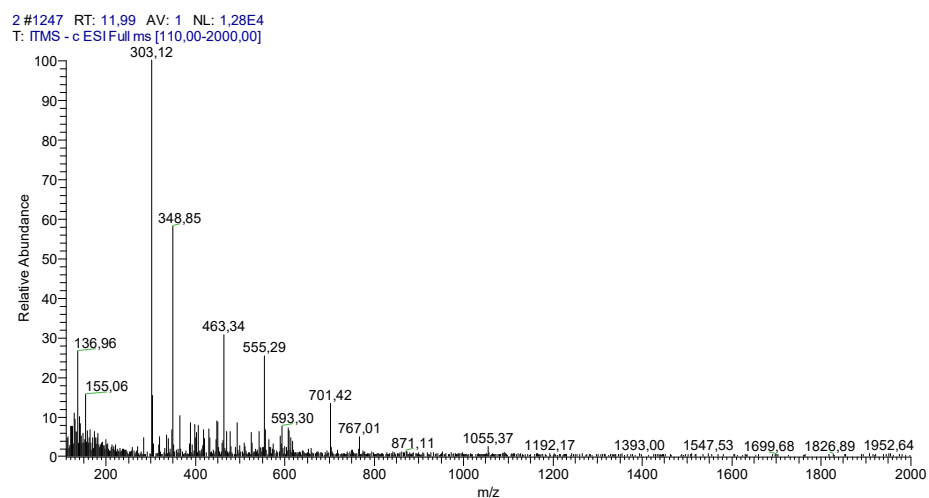


Figure 1: Spectre de masse de la Apigénine di-C-hexoside par LC-MS

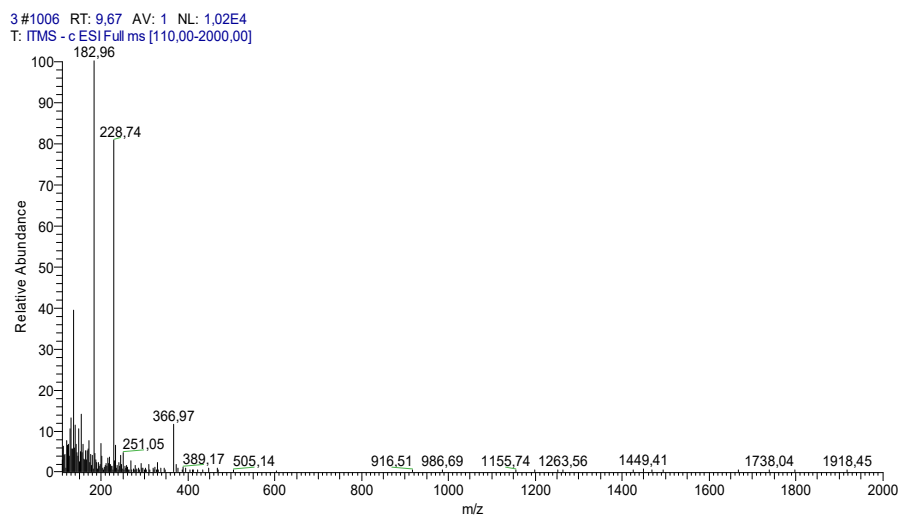


Figure 2: Spectre de masse de la Taxifolin par LC-MS

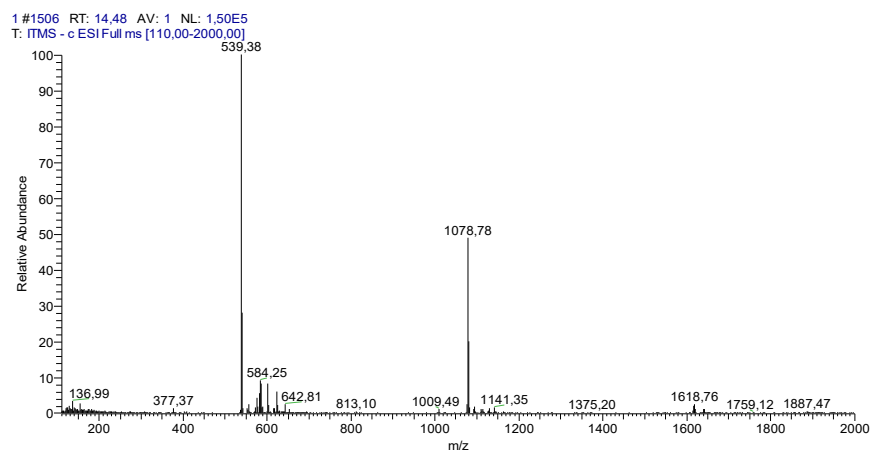


Figure 3: Spectre de masse de l'Oleuropein par LC-MS

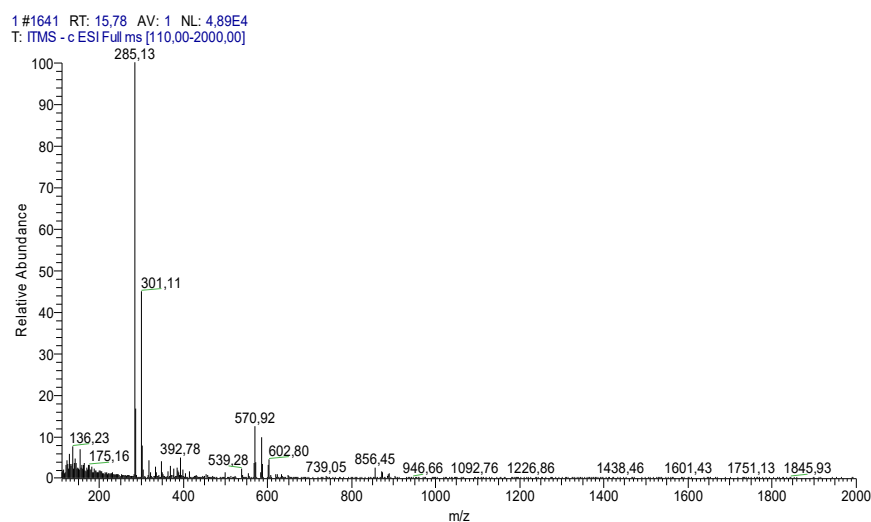


Figure 4: Spectre de masse de laLutéoline LC-MS

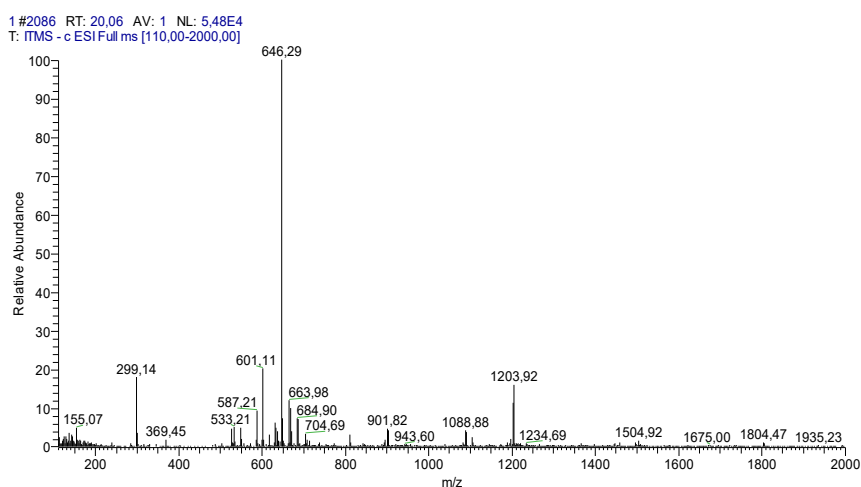


Figure 5: Spectre de masse du dérivé de dihydrokaempférol Adduit d'acide formique LC-MS

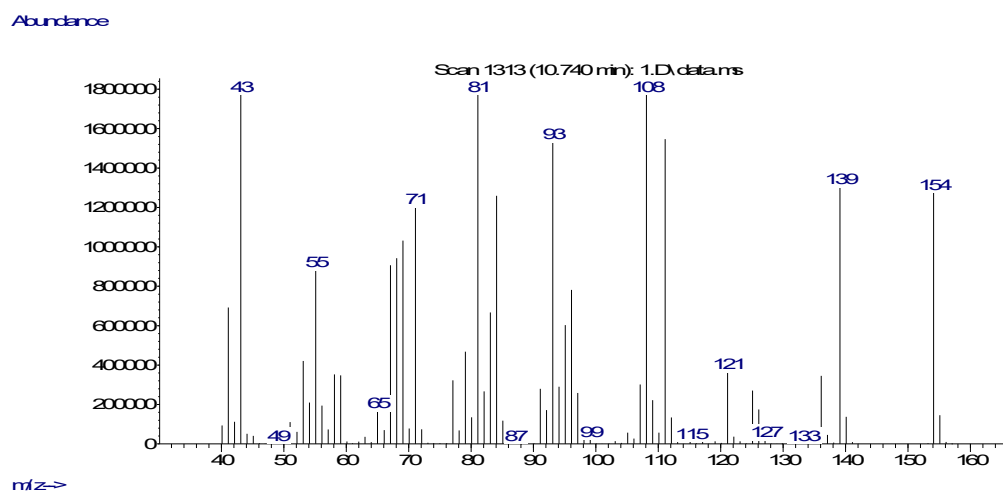


Figure.6 : Spectre de masse de la **1,8-Cinéole** identifiée par la CG-MS

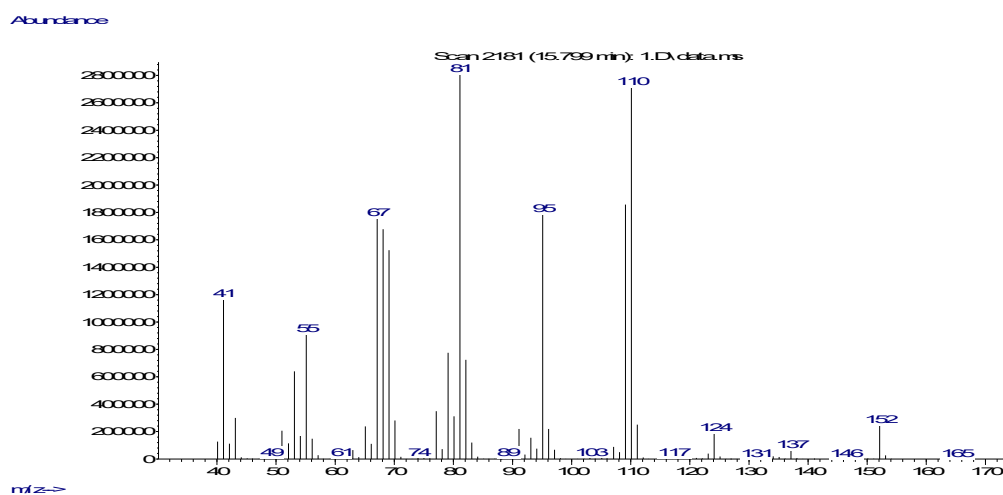


Figure.7 : Spectre de masse de la **α -Thujone** identifiée par la GC-MS

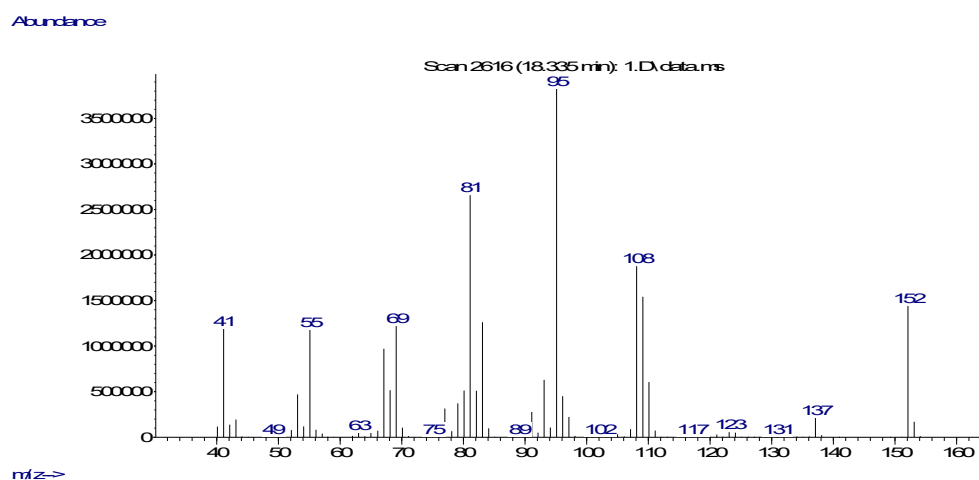


Figure.8 : Spectre de masse de la **Camphre** identifiée par la CG-MS