

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

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN : (CHIMIE)

Spécialité : **Chimie Organique Appliquée**

Par:

M^{elle} BOUTEBOUHART Hadjer

Thème

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA COMPOSITION
CHIMIQUE DE DIFFERENTES VARIETES
DE FEUILLES D'OLIVIER (*Olea Europea L.*)**

Soutenu le 10 JUIN 2012, devant le jury composé de :

Mr. S. SEBIH	Professeur	(U.S.T.H.B.)	Président
Mme N. BENNAMANE	Maître de conférences A	(U.S.T.H.B.)	Examineur
Mr. Y. FOUJIL CHERIF	Maître de conférences A	(U.S.T.H.B.)	Examineur
Mme Linda DIDAUI	Maître de conférences A	(E.N.P.)	Directrice du mémoire

DÉDICACES

*Je dédie ce travail, à mes très chers parents qu'ils
trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien
tout au long de mes études*

***A** mon frère Zine el Abidine*

***A** mes sœurs Soumia et Khadidja*

***A** mon grand père*

***A** mes oncles Arezki et Brahim*

***A** toute ma famille*

***A** toute mes collègues et amies*

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonte pour réaliser ce travail.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie de l'Université des Sciences et de la Technologie Houas sous la direction de Madame **Linda Didaoui épouse Rabia**, Maître de conférences à l'Ecole Nationale Polytechnique d'El Harrach et Directeur de recherche à l'U.S.T.H.B. Je tiens à la remercier très vivement de m'avoir proposé ce sujet, pour ~~son~~ ses conseils éclairés et ses encouragements qu'elle m'a sans cesse prodigués tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur **A. Baaliouamer** Professeur à l'U.S.T.H.B. et Directeur du Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de m'avoir reçu dans le laboratoire.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur **B.Y. Meklati**, Directeur du Centre de Recherche d'Analyse Physico-chimique (**CRAPC**) de m'avoir permis de faire les analyses GC et GC-MS nécessaires afin de mener à bien ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur **S. Sebih**, Professeur à l'U.S.T.H.B. qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Je remercie également Madame **N. Bennamane** (Maître de conférences à l'U.S.T.H.B.) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie vivement Monsieur **Y. Foudil-Chérif** (Maître de conférences à l'U.S.T.H.B.) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Mme **L. Boudarene** (Maître de conférences à l'U.S.T.H.B.) pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Melle Boutebouhart Hadjer

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	3
------------------------------	----------

CHAPITRE I:

GENERALITES

I) Généralités sur les huiles essentielles	5
I-1) Les huiles essentielles et leur répartition dans la plante	5
I-2) Composition chimique globale	5
I-3) Techniques d'extraction des huiles essentielles	6
I-4) Analyse des huiles essentielles	10
I-4-a) La chromatographie en phase gazeuse (GC)	10
I-4-b) La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)	11
I-5) Description botanique, composition chimique, domaine d'utilisation et propriétés pharmacologiques des deux plantes aromatiques étudiées	13
I-5-1) L'olivier et ses sous-produits (<i>Olea Europaea L.</i>)	13
I-5-2) La sauge officinale (<i>Salvia officinallis L.</i>)	18

CHAPITRE II :

ANALYSE DES EXTRAITS VOLATILS

DES FEUILLES D'OLIVIER DE LA VARIETE CHEMLAL

PAR GC-FID ET GC-MS-EI

II-1) Introduction	21
II-2) Méthodes de détermination des indices de rétention	21
II-3) Extraction par Hydrodistillation des extraits des feuilles d'olivier de la variété Chemlal	23
II-4) Etude de la composition chimique des extraits volatils des feuilles d'olivier Chemlal par GC-FID et GC-MS-EI	24

II-4-a) Résultats et discussion	24
II-5) Conclusion	34

CHAPITRE III :

ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES DE SAUGE OFFICINALE PAR GC-FID ET GC-MS-EI

III-1) Introduction	35
III-2) Extraction par hydrodistillation des essences de sauge officinale	36
III-3) Analyse qualitative des essences de sauge par GC-FID et GC-MS-EI	39
III-3-a) Résultats et discussion	39
III-4) Analyse semi-quantitative des essences de sauge	50
III-4-a) Résultats et discussion	50
III-5) Conclusion	57

CHAPITRE IV:

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANT DE QUELQUES EXTRAITS POLYPHENOLIQUES DE DEUX VARIETES DE FEUILLES D'OLIVIER (*CHEMLAL* ET *LIMLI*)

IV-1) Introduction	58
IV-2) Les composés polyphénoliques	59
IV-3) Méthodes d'extraction des polyphénols	60
IV-4) Test d'activité antioxydante par la méthode du DPPH	61
IV-5) Extraction des polyphénols des feuilles d'olivier de deux variétés Chemlal et Limli	62
IV-6) Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier de deux variétés (Chemlal et Limli) par la méthode du DPPH	66
IV-6-a) Résultats et discussion	67
IV-7) Conclusion	74
CONCLUSION GENERALE	75
REFERENCES BIBLIOGRAPHIES	77
PARTIE EXPERIMENTALE	82

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE :

Les plantes ont, toujours, fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux. Les extraits des plantes étaient, déjà, connus et utilisés par les égyptiens, les romains et les grecs, pour leurs propriétés odorantes et médicinales. En effet, les plantes représentent une source riche en composés ayant des activités biologiques diverses.

Dans le cadre de la valorisation des produits naturels nationaux, nous nous sommes intéressés dans ce travail à deux plantes aromatiques et médicinales poussant en Algérie, principalement aux 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.).

L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute la production de l'huile d'olive qui est utilisée à des fins alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques. Par ailleurs, les propriétés médicinales de l'olivier sont également attribuées à ses feuilles qui font aujourd'hui l'objet de nombreux travaux. Quatre variétés dominent la production d'huile d'olive en Algérie : la variété **Chemlal** qui représente 50% des oliviers cultivés, **Limli**, **Azzaradj** et **Bouchok**. La sauge a la réputation d'être une véritable panacée. Elle est utilisée en médecine traditionnelle comme remède à beaucoup de maux, si l'on en croit le dicton provençal bien connu des herboristes « qui a de la sauge dans son jardin, n'a pas besoin de médecin ».

Notre présente étude s'est basée sur deux axes principaux à savoir :

- L'étude de la composition chimique (analyse qualitative et semi-quantitative) des extraits volatils des feuilles d'olivier (FO) de la variété **Chemlal** et des huiles essentielles de sauge officinale par GC-FID et GC-MS-EI. Les huiles essentielles de sauge ont été obtenues par deux procédés d'extraction : L'hydrodistillation classique (HD) et l'hydrodistillation assistée par des micro-ondes.
- L'évaluation de l'activité antioxydante par le test du DPPH des extraits polyphénoliques des feuilles d'olivier de deux variétés **Chemlal** et **Limli** en utilisant différents solvants d'extraction.

Ce mémoire est composé de quatre chapitres répartis de la manière suivante:

Dans le **Chapitre I**, nous donnerons quelques généralités concernant les huiles essentielles, l'olivier et ses sous produits (feuilles d'olivier), la sauge ainsi qu'une rétrospective bibliographique recensant les travaux antérieurs.

Le **Chapitre II** fera l'objet d'une étude de la composition chimique par GC-FID et GC-MS-EI (qualitative et semi-quantitative) de deux extraits volatils des feuilles d'olivier de la variété Chemlal (FO1 et FO2) de la région de Tizi ouzou. Les extraits volatils ont été récupérés par hydrodistillation classique (HD). Les analyses ont été effectuées sur une colonne apolaire HP5MS.

Le **Chapitre III** est consacré à une étude qualitative et semi-quantitative de trois huiles essentielles de sauge officinale de la région de Blida. En effet, nous avons utilisé deux procédés d'extraction : l'hydrodistillation classique (HD) et l'hydrodistillation assistée par chauffage micro-ondes (HD-MO). Une étude comparative entre les deux procédés d'extractions (sauge fraîche HD et sauge fraîche HD-MO) sera réalisée en terme de rendement d'extraction et de composition chimique des essences obtenues. Nous avons également étudié l'influence de l'humidité initiale du matériel végétal (sauge fraîche HD et sauge sèche HD) sur la variation de la composition chimique.

Les analyses chromatographiques ont été réalisées par GC-FID et GC-MS-EI et ceci sur deux colonnes de polarités différentes (une colonne apolaire HP5MS et une colonne polaire HPWAX).

Dans le **Chapitre IV**, nous avons évalué l'activité antioxydante par la réactivité avec le radical libre DPPH par spectrophotométrie UV-Visible de 7 extraits alcooliques et hydroalcooliques de deux variétés de feuilles d'olivier (**Chemlal** et **Limli**). Les extraits polyphénoliques étudiés sont :

- Cinq extraits de feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** : dichlorométhanique, méthanolique, éthanolique, hydro-méthanoliques (méthanol-H₂O (80 :20) et méthanol-H₂O (70 :30)).
- Deux extraits de feuilles d'olivier de la variété **Limli** : méthanolique et éthanolique.

CHAPITRE I

Généralités

Dans ce chapitre :

I) Généralités sur les huiles essentielles

I-1) Les huiles essentielles et leur répartition dans la plante

I-2) Composition chimique globale

I-3) Techniques d'extraction des huiles essentielles

I.4) Analyse des huiles essentielles

I-4-a) La chromatographie en phase gazeuse (GC)

I-4-b) La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

I-5) Description botanique, composition chimique, domaine d'utilisation et propriétés pharmacologiques des deux plantes aromatiques étudiées

I-5-1) L'olivier et ses sous-produits (*Olea Europaea* L.)

I-5-2) La sauge officinale (*Salvia officinallis* L.)

I) Généralités sur les huiles essentielles:

I-1) Les huiles essentielles et leur répartition dans la plante:

Une huile essentielle est une substance odorante et volatile, extraite d'un végétal sous forme liquide. Elle provient d'une sécrétion naturelle élaborée par certains végétaux et contenue dans les cellules de la plante (dans le calice, la tige, l'écorce ou tout autre partie de la plante). Selon l'huile désirée, on prendra tout ou une partie d'une plante spécifique pour en extraire l'essence aromatique.

Le nom « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe, le terme « essentielle » désigne le caractère principal typique de la fragrance [1].

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en générale dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles sont susceptibles d'être stockées dans tous les organes végétaux, comme les écorces chez le cannelier, les sommités fleuries chez la lavande ou la menthe, les racines chez le vétiver, les rhizomes chez le gingembre, les fruits chez l'anis ou le fenouil, le bois chez le camphrier. Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation [2].

I-2) Composition chimique globale :

La composition des huiles essentielles est très complexe. En effet, elles peuvent renfermer jusqu'à plusieurs centaines de molécules différentes, chacune ayant des propriétés différentes. Les huiles essentielles comprennent en particulier des terpènes: Ce sont des hydrocarbures formés par l'assemblage progressif d'unités pair ou impair d'isoprène (C_5H_8). Ils sont classés en monoterpènes (C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}) et triterpènes (C_{30}). Les mono et sesquiterpènes peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques [2].

D'un point de vue physico-chimique, les molécules des huiles essentielles peuvent être classées en familles : terpènes, aldéhydes, cétones, phénol, lactones, esters, ... sont quelques exemples des composants que l'on retrouve dans les huiles essentielles. Ces molécules agissent en synergie, ce qui explique l'efficacité et la polyvalence des huiles essentielles [3].

La composition chimique d'une huile essentielle est très variable et ceci est dû à plusieurs facteurs, nous citons entre autres : des facteurs d'ordre naturel, d'origine intrinsèque (génétique, localisation, maturité), d'ordre extrinsèque (sol, climat,...etc.) ou d'ordre technologique, c'est-à-dire liés aux modes d'exploitation de la matière végétale [3].

La composition d'une huile essentielle varie au sein d'un même genre et d'une même espèce. On parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Au cours du cycle végétal, des modifications importantes dans la composition des essences peuvent être relevées.

I-3) Techniques d'extraction des huiles essentielles :

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 [4].

En effet la localisation histologique des composés aromatiques dans le végétal ainsi que la destination final 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. On distingue :

a) L'entraînement à la vapeur d'eau :

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, l'entraînement à la vapeur d'eau ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale sujette à l'extraction. En effet, la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La plante est traversée par de la vapeur d'eau à la sortie du récipient, cette vapeur qui s'est chargée d'huile essentielle est condensée dans un serpentin refroidi par un courant froid. Un séparateur ou essencier recueille eau et huile et permet de retirer cette dernière par différence de densité [5].

b) L'hydrodistillation (classique) :

L'hydrodistillation, qui est la méthode la plus classique et la plus utilisée pour l'extraction des huiles essentielles consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un bain d'eau qui est ensuite porté à ébullition à pression atmosphérique. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. L'hydrodistillation est généralement réalisée par un montage particulier en verre de

type « Clevenger ». Ce système de distillation élaboré par J.F.Clevenger a été décrit pour la première fois en 1928 dans « American Perfumer & Essential Oil Review » [6]. C'est aujourd'hui la méthode préconisée par la Pharmacopée Européenne pour l'extraction des huiles essentielles. Son intérêt majeur réside dans l'utilisation d'un système de cohobation permettant une distillation en continue sans modifier la teneur en eau de la matrice. La durée d'une hydrodistillation est variable, et peut atteindre plusieurs heures et ceci selon le matériel végétal à hydrodistiller (**Figure I-1**).

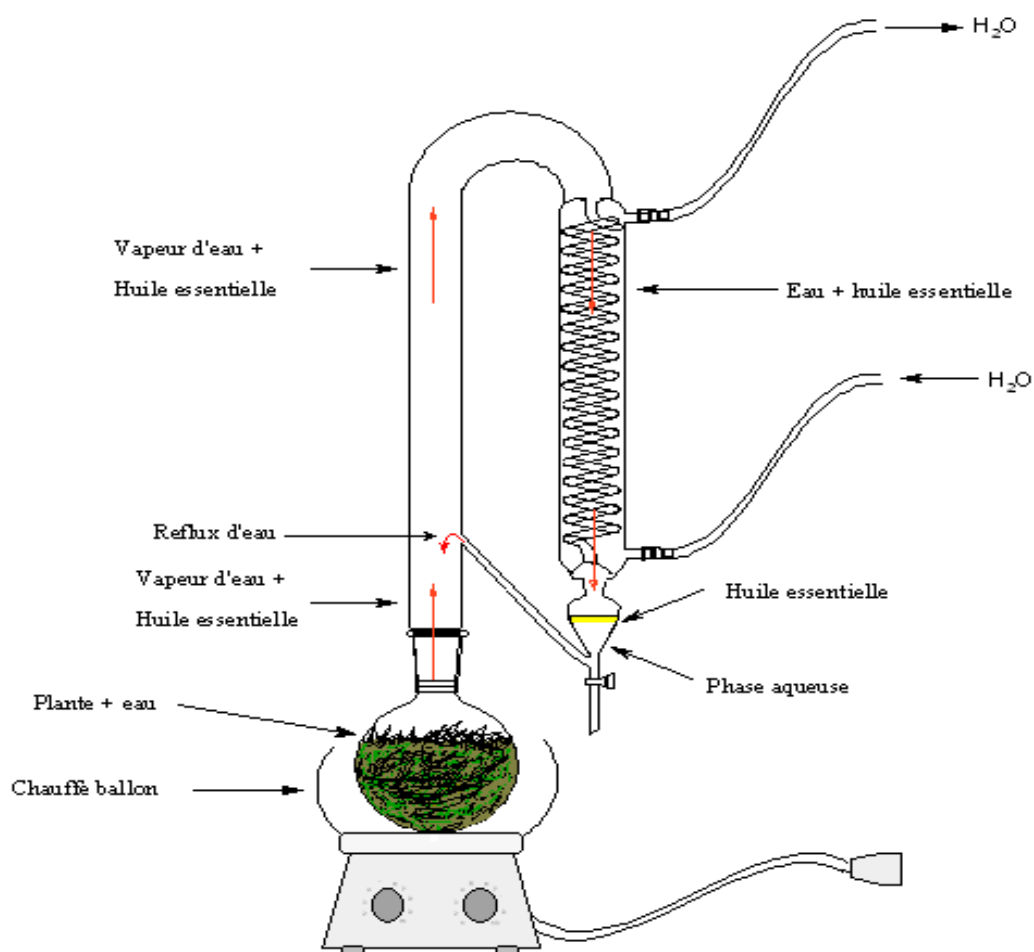


Figure I-1: Dispositif d'hydrodistillation (HD) de Clevenger [6].

c) L'hydrodistillation assistée par des micro-ondes :

Les micro-ondes sont étudiées depuis très longtemps et de nombreuses recherches ont débouché sur des applications industrielles, notamment dans le domaine agro-alimentaire : séchage, inactivation enzymatique, cuisson, désinsectisation, pasteurisation, stérilisation.

L'utilisation de l'hydrodistillation assistée par des micro-ondes est une méthode récente dans le domaine des molécules d'intérêt avec un impact environnemental, comme l'extraction des huiles essentielles [7,8].

Ce procédé basé entièrement sur le principe d'hydrodistillation classique consiste à mettre une partie du montage d'hydrodistillation (classique) dans un four à micro-ondes. En effet, la plante est placée dans un ballon contenant une quantité d'eau et l'ensemble est disposé à l'intérieur d'un four à micro-ondes. Le reste du montage d'hydrodistillation est placée à l'extérieur du four (**Figure I-2**).

Le système de chauffage micro-ondes comporte trois éléments :

- Un générateur d'onde, qui produit des ondes électromagnétiques,
- Un guide d'onde dont le rôle est d'amener les ondes électromagnétiques depuis le générateur vers l'enceinte d'application,
- Un applicateur (appelé aussi enceinte) dans lequel est placé le produit à traiter.

Le transfert de chaleur sous chauffage par des micro-ondes est inversé par rapport au chauffage traditionnel. Le transfert de chaleur avec par exemple une plaque chauffante se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient. Pour le chauffage par des micro-ondes, le transfert de chaleur se fait de l'intérieur vers l'extérieur du récipient [8].

L'extraction des huiles essentielle par hydrodistillation assistée par des micro-ondes présente des avantages certains, le plus valorisé est incontestablement le temps d'extraction. La durée d'une hydrodistillation assistée par des micro-ondes est généralement inférieure à 30 minutes contre plusieurs heures pour une hydrodistillation avec un chauffage traditionnel (calotte chauffante). La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition chimique de l'extrait [8].

Il existe d'autres méthodes d'extraction comme : l'hydrodiffusion, l'expression à froid, l'enfleurage, l'extraction par solvant organique,etc.

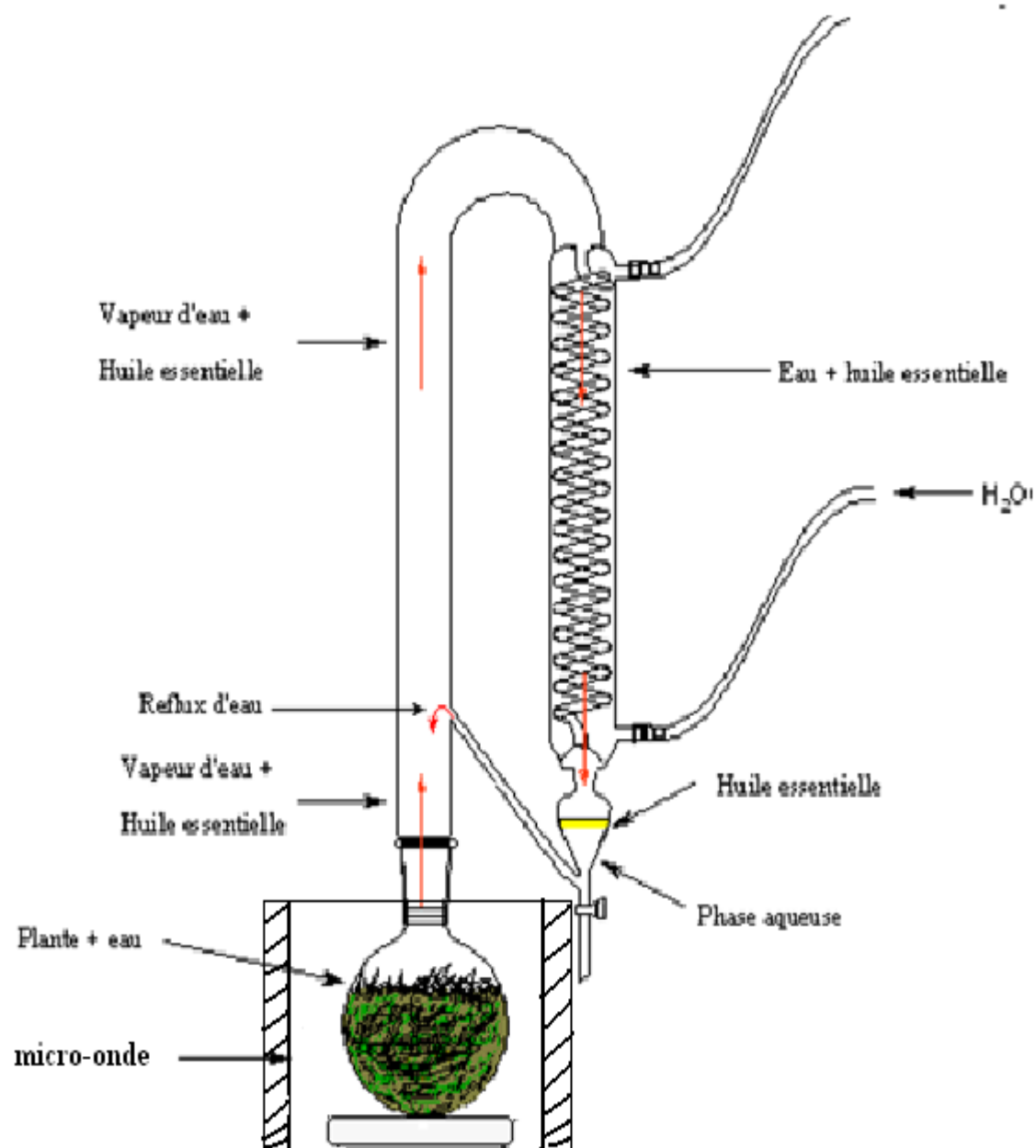


Figure I-2: Dispositif d'hydrodistillation assistée par des micro-ondes (HD-MO).

I.4) Analyse des huiles essentielles :

Vu la nature chimique très diversifiée des huiles essentielles, leurs analyses conduisent à un important travail pour séparer et identifier les nombreux constituants qu'elles renferment et nécessitent souvent un temps appréciable.

Les techniques les plus utilisées pour identifier les nombreux constituants d'une huile essentielle sont :

- La chromatographie en phase gazeuse (GC-FID).
- Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse (GC-MS).
- Le couplage GC-FTIR et la RMN ^{13}C .

I-4-a) La chromatographie en phase gazeuse (GC) :

La GC est devenue la méthode analytique la plus utilisée dans le domaine scientifique, autant en recherche que dans le domaine industriel (pharmaceutique, agriculture, environnement, etc.). Cette technique fut découverte en 1952 par James et Martin [9] et a fait des progrès vertigineux, particulièrement grâce à la découverte des détecteurs ultrasensibles. C'est également le seul type de chromatographie qui utilise un gaz comme phase mobile, ce qui nécessite un appareil spécial, appelé communément le chromatographe à gaz (CPG ou GC).

La GC est une technique de séparation qui s'applique aux constituants d'un mélange gazeux ou susceptible d'être vaporisés par chauffage sans décomposition dans l'injecteur. Les constituants à séparer sont distribués entre deux phases [9].

- La phase stationnaire constituée par un lit fixe de matériaux de grande surface spécifique. La colonne contenant la phase stationnaire est placée dans un four thermostaté.
- La phase mobile constituée par un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur, qui balaie en permanence la colonne chromatographique (la phase stationnaire).

Les composés du mélange traversent la colonne à des vitesses différentes. Lorsqu'ils arrivent à la sortie de la colonne, ils sont détectés par un détecteur qui transmet un signal électrique à un intégrateur. Les résultats apparaissent sur le chromatogramme sous forme de pics.

La séparation en chromatographie en phase gazeuse peut être réalisée en mode isotherme ou en mode de température programmée [9].

- La chromatographie est dite isotherme lorsque la température de la colonne est maintenue constante pendant toute la durée de l'analyse.
- L'analyse en programmation de température est réalisée en élevant la température de la colonne progressivement durant l'analyse. Elle est utilisée surtout dans l'analyse des mélanges contenant des constituants doués de volatilité très différente, comme c'est le cas des produits naturels et notamment les huiles essentielles.

Il existe en chromatographie plusieurs phénomènes physiques responsables de la rétention des composés sur la phase stationnaire. Les deux plus exploités sont : les phénomènes d'adsorption et de partition [9].

- Le phénomène d'adsorption est essentiellement un phénomène de surface par lequel les composés sont attirés sur les sites actifs de la phase stationnaire par des liaisons hydrogènes et électrostatiques. La phase stationnaire est un matériau solide en forme de petits granules de différentes grosseurs; les plus utilisées sont le gel de silice, l'alumine et la cellulose.
- Dans une chromatographie de partition, la phase stationnaire est non pas un solide, mais un liquide fixé physiquement ou greffé chimiquement sur un support solide. Les composés d'un mélange vont donc se solubiliser dans la phase liquide stationnaire, au lieu de s'y adsorber. C'est la solubilité différente des composés dans la phase stationnaire et dans la phase mobile qui rend la séparation chromatographique possible. Ainsi, deux solutés ayant des solubilités différentes vont parcourir la colonne chromatographique en des temps distincts, de là ils peuvent être séparés.

I-4-b) La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS):

La spectrométrie de masse (MS) est une technique de détection extrêmement sensible et puissante qui permet de déterminer des structures moléculaires solides, liquides ou gazeuses. Elle permet de déterminer la masse moléculaire, de corréler le spectre d'un composé avec sa structure, d'expliquer des mécanismes de ruptures de liaisons, de trouver les facteurs rendant plus ou moins probable la formation de l'un ou l'autre des fragments ioniques. Par spectrométrie de masse, on peut réaliser des analyses qualitatives et quantitatives [9].

Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse (GC-MS), et cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces.

En effet, le principe de la MS-EI consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée; les différents fragments obtenus, chargés positivement ont caractéristiques d'une molécule et vont constituer son spectre de masse [9]. Pour l'identification d'un composé donnée, les spectres obtenus sont ensuite comparés avec ceux des molécules de référence contenues dans des bibliothèques de spectres.

A l'heure actuelle, des banques de spectres de masse qui contiennent plusieurs milliers de composés sont commercialisées. Dans le domaine des huiles essentielles, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse avec les indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarités différentes, permet l'identification d'un grand nombre des constituants.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux plantes aromatiques et médicinales, principalement aux feuilles d'olivier et également à la sauge officinale.

Avant d'aborder, l'analyse chromatographique des deux plantes citées, nous tacherons à donner quelques généralités (description botanique, composition chimique, domaine d'utilisation et propriétés pharmacologiques des deux plantes aromatiques étudiées).

I-5) Description botanique, composition chimique, domaine d'utilisation et propriétés pharmacologiques des deux plantes aromatiques étudiées :

Dans ce qui suit, nous donnerons les caractérisations botaniques ainsi que les propriétés pharmacologiques de deux plantes aromatiques et médicinales étudiées dans ce travail : les feuilles d'olivier issues de la grande famille des *oléacées* et la sauge officinale issue de la famille des *Lamiacées*.

Une rétrospective bibliographique des travaux antérieurs concernant la composition chimique des deux plantes a été menée.

I-5-1) L'olivier et ses sous-produits (*Olea Europaea L.*):

I-5-1-a) Etude botanique :

L'olivier, arbre originaire des régions méditerranéennes, est classé dans la famille des *oléacées*. Le genre est appelé *Oléa* et comporte 30 espèces différentes réparties à la surface du globe. L'espèce cultivée dans le monde méditerranéen est *l'Olea europea L.*, dans laquelle on rencontre l'oléastre ou l'olivier sauvage et l'olivier cultivé. Dans la culture arabo-musulmane, l'olivier est un arbre particulier. Il fait parti des arbres cités dans le coran et à ce titre, il est l'objet d'un respect d'autant plus que ses vertus déjà signalées dans le coran sont approuvées par des études scientifiques [10]. L'olivier cultivé se subdivise en cultivars ou variétés.

Les cultivars (les variétés) se distinguent entre eux par des caractères morphologiques (feuilles, forme de l'olive, noyaux, ...etc.), agronomiques et chimiques différents. Une caractéristique essentielle de l'olivier est sa très grande variabilité [10].

I-5-1-b) Description morphologique:

L'olivier cultivé, dont la taille avoisine 10 mètres, se reconnaît facilement à l'aspect tortueux de son tronc gris, crevassé et de ses nombreux rameaux portant des feuilles persistantes. L'aspect général est celui d'un arbre toujours vert. Les feuilles sont en effet, persistantes et ont une durée de vie de l'ordre de 3 ans. Elles sont disposées de façon opposée sur le rameau, leur face supérieure est d'un vert foncé, la face inférieure présente un aspect argenté (**Figure I-3**). L'olivier engendre en moyenne 25 kg de feuilles /arbre/an. L'olivier (*Olea Europaea L.*) suit la classification suivante [10]:

Règne : Plantae
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Ordre : Scrophulariales
Famille : Oléacées
Genre : Oléa



Figure I-3 : L'olivier (*Olea Europaea L.*) [10]

I-5-1-c) L'olivier en Algérie et les principales variétés:

En Algérie, l'olivieraie se répartit sur trois zones oléicoles importantes [11] :

1. La région ouest, repartis entre cinq wilayates qui sont Tlemcen, Ain-Temouchent, Mascara et Relizane.
2. La région centrale qui est repartis entre les wilayas de Ain defla, Blida, Boumerdes, Tizi-ouzou, Bouira et Bejaia.
3. La région Est est repartis entre les wilayates de Jijel, Skikda, Mila et Guelma.

Quatre cultivars dominant la production d'huile d'olive en Algérie : **Chemlal**, **Limli**, **Azaradj** et Bouchok. La variété **Chemlal** qui se rencontre dans toute la Kabylie du littoral au sud de M'Chedellah, et la vallée de la Soummam. Les variétés **Limli**, **Azaradj** et **Bouchok**, se rencontrent surtout dans la vallée de la Soummam. Ces quatre variétés à elles seules représentent les trois quart de la production oléicole nationale [11].

Une autre variété mais plus de consommation que productrice d'huile est la Sigoise, de la région de Sig, donc de l'ouest du pays, elle produit d'excellentes olives de table. Les variétés introduites, pour la majorité durant l'époque coloniale sont la Cornicabra, la Sevillane la Lucque, La frontoio et la Leccino, sont pour la majorité d'origine Italienne ou Française et se sont bien adaptées aux conditions climatiques de notre pays [11].

Chemlal est une variété vigoureuse et de grande dimension, c'est la variété dominante et sans doute la plus réputée en Algérie. Elle représente environ 50% des oliviers cultivés en Algérie.

I-5-1-d) Composition chimique, domaine d'utilisation et propriétés pharmacologiques des feuilles d'olivier :

En raison de leur large domaine d'usage médicinal, les fruits de l'olivier (les olives) ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques afin d'identifier les principes actifs. Un grand nombre de publications sont présentées dans la littérature, concernant l'analyse des composés volatils récupérés des olives (fruits) par GC et GC-MS [12-26]. Par contre, nous avons trouvé très peu de travaux dans la littérature concernant le profil chimique des composés volatils récupérés des feuilles d'olivier [27-31].

Nous citons les travaux de *Flamini et al.* concernant l'étude de la composition chimique par GC-FID et GC-MS des volatils des FO de la région de la Toscane en Italie [27-29]. En effet, ils ont étudié la composition chimique en composés volatils des FO de plusieurs variétés Italiennes (Leccino, Frantoio et Cipressino). Les extraits ont été obtenus par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger [6]. Ces travaux ont révélé la présence d'aldéhydes saturés et insaturés et également des monoterpènes et des sesquiterpènes. Particulièrement, une teneur élevée en aldéhyde aliphatique insaturé le (E)-2-Hexénal (9,8% – 48,0%) (composé majoritaire principal), le (E,E)-R-farnésène (0,2% – 27,0%), le linalool (3,6%), le β -caryophyllène (8,1%), et le valencène (2,5%).

La composition chimique en composés volatils de trois variétés (cultivars) de FO (**Neb jewel**, **Chemchali** et **Chemlali**) de Tunisie a été récemment publiée par *Brahmi et al.* [30].

Les composés majoritaires recensés sont : le (E)-3-hexénol (16%), le 3-éthénylpyridine (10% - 18%), le (E)- β -damascenone (12% – 14%) et le phényléthyl alcool (15%).

Les auteurs *Haloui et al.* ont signalé parmi les 32 composés identifiés dans la variété Tunisienne Chemlali extraite par hydrodistillation, la présence de l' α -pinène (52,70 %), le 2,6-diméthyl-octane (16,57%) et le 2-méthoxy-3-isopropylpyrazine (6,01%) comme composés majoritaires [31].

D'autres part, l'étude bibliographique a montré que les feuilles d'olivier présentent une matière végétale riche en polyphénols et flavonoides [32-35]. Les principaux composés sont :

- **Les iridoïdes et les dérivés sécoiridoïdes:** oleuropéine et sa forme osidique ou oleuroside, hydroxytyrosol, élénolide, diméthyl oleuropéine, l'oléoside et son diméthylester et le ligustroside.

- **Les flavonoïdes principalement sous forme de glucosides:** choline, lutéoline, chrysoérior, apigénine, rutine, hespéridine, olivine, quercétine, kaempférol.
- **Les triterpènes:** dérivés de l'acide oléanique, oléanolique, et de l'acide crataegolide, certains cultivars contiennent aussi des dérivés de l'acide ursolique.
- **Les acides phénols:** acide chlorogénique, verbacoside et principalement l'acide caféique.
- **Les tanins:** acide gallique et catéchique.

Nous donnons dans ce qui suit la structure chimique de l'oleuropéine, du tyrosol et de l'hydroxytyrosol [33]:

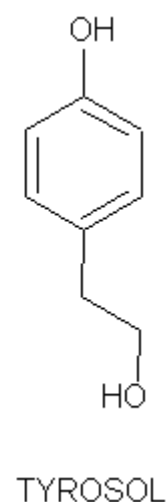
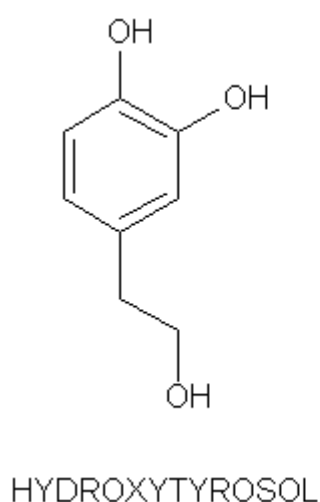
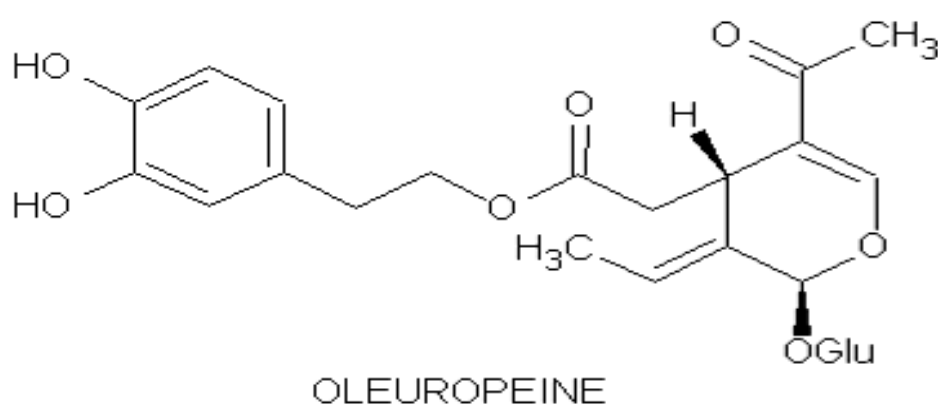


Figure I-4 : Structure chimique de l'Oleuropéine, le Thyrosol et l'Hydroxytyrosol.

L'utilisation la plus connue de l'olivier est sans nul doute son huile qui est utilisée en consommation directe et également en médecine populaire pour ses vertus sédatives et anti-inflammatoires. Toutefois, les propriétés médicinales de l'olivier sont surtout attribuées à ses feuilles qui font actuellement l'objet de recherches dans le vaste domaine de la pharmacologie. L'étude bibliographique montre que les feuilles d'olivier présentent une matière végétale riche en composants actifs pouvant avoir plusieurs applications pharmaceutiques et thérapeutiques [36].

L'innocuité et l'efficacité de ces feuilles, font de l'olivier un traitement préventif et curatif de l'hypertension artérielle et du diabète non insulino-dépendant, le Sida, l'hypothyroïdie, tout en ayant un effet bénéfique et hautement renforçateur sur le système immunitaire [37-40]. Les feuilles constituent la partie active grâce à la présence de plusieurs sécoiridoïdes dont le constituant majeur est l'oleuropéine (60 à 90 mg/g matière sèche). L'oleuropéine est un antioxydant puissant doué de propriétés antiseptiques contre les bactéries néfastes, les virus, les champignons et divers types de parasites [37].

La prescription des feuilles d'olivier en phytothérapie peut revêtir deux formes principales, soit des feuilles à l'état naturel (infusion, décoction de feuilles séchées) soit des préparations tendant toutes à l'extraction et à la conservation des principes actifs des feuilles [38].

Brahmi et ses collaborateurs ainsi que Haloui et ses collaborateurs ont montré dans leurs travaux que les extraits volatils des feuilles d'olivier de trois variétés Tunisienne présentent des activités biologiques intéressantes (feuilles fraîches ou séchées), entre autres, des propriétés antioxydantes, antibactériennes, et des propriétés antifongiques [30,31]. Les extraits lourds (polyphénols et flavonoides), en l'occurrence, les extraits alcooliques et hydro alcooliques présentent également des propriétés biologiques diverses [41-45].

D'après la recherche bibliographique que nous avons effectuée, à notre connaissance, il n'y a aucune information sur les profils chimiques des volatils des feuilles d'olivier poussant en Algérie (aucun dossier n'est disponible). Par conséquent, la présente étude a été réalisée dans le but de caractériser la composition chimique et d'étudier l'activité biologique des feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** et **Limli** poussant en Kabylie.

Dans ce travail, nous nous sommes également intéressés à une deuxième plante aromatique et médicinale qui est la sauge officinale.

I-5-2) La sauge officinale (*Salvia officinallis L.*) :

I-5-2-a) Etude botanique:

La sauge est une plante aromatique est médicinale de la famille des *Lamiacées*. D'après la première histoire, une variété de sauge appelait « Chia » était cultivée par les mexicains. Les grecs, les romains et les arabes ont utilisé la sauge comme tonique, et en compresse contre les morsures de serpent. Au 18^{ème} siècle, les feuilles de la sauge ont été roulées comme des cigarettes pour les fumer contre l'asthme et surtout au printemps.

Salvia est une plante annuelle et biannuelle d'origine méditerranéenne de la famille des *Lamiacées*. Il existe environ 900 espèces identifiées autour du monde. En Algérie les espèces qui ont été déterminées sont dans l'ordre d'une trentaine, la plus répandue est la sauge officinale (*Salvia officinalis L.*). Plusieurs appellations ont été données à la sauge. Selon Ibn El Beytar, les andalous la nomment "essalma" qui ajoute qu'elle est appelée "salbia" par les botanistes en Espagne. En Algérie, la sauge est appelée "souek ennebi" comme synonyme de Saleme [46].

I-5-2-b) Description morphologique:

Cette plante vivace à tige ligneuse à la base, formant un buisson dépassant parfois 80 cm, rameaux vert-blanchâtre. Feuilles assez grandes, épaisses, vert-blanchâtres, et opposées; fleurs bleu-violacé clair en épis terminaux lâches, disposées par 3 à 6 en verticilles espacés (**Figure I-5**). La sauge suit la classification suivante [46]:

Règne : Plantae
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Ordre : Lamiales
Famille : *Lamiacées (ou Labiées)*
Genre : *Salvia*
Espèce : *Salvia officinalis L.*



Figure I-5 : La sauge (*Salvia officinalis L.*) [46]

I-5-2-c) Composition chimique, domaine d'utilisation et propriétés pharmacologiques de la sauge :

Le profil chimique de l'huile essentielle de sauge officinale originaire de plusieurs pays du monde a fait l'objet de plusieurs travaux dans la littérature [47-69]. La plupart des huiles essentielles de sauge officinale ont une teneur élevée en α -thujone, β -thujone, camphre et 1,8-cinéole. La sauge contient 0,5 à 2,5% d'huile essentielle, généralement située dans les feuilles. Le rendement et la composition chimique de la sauge varient en fonction du site et de la période de la récolte. Plusieurs études ont révélé que pour une même espèce de sauge, il y a plusieurs chémotypes, selon la teneur des constituants majoritaires.

A titre d'exemple, dans le **Tableau I-1**, sont présentés les teneurs des constituants majoritaires des huiles essentielles de sauge provenant de différents pays étrangers [61-69].

Tableau I-1: Teneurs des composés majoritaires (%) des essences de sauge officinale de certains pays relevés dans la littérature.

(Partie étudiée : feuille ; méthode d'extraction: HD; Analyse: GC et GC-MS).

Pays	Composés Majoritaires (%)	Pays	Composés Majoritaires (%)
Algérie [61]	Camphre (20,4) α -Thujone (19,6) 1,8-Cinéole (12,3) β -Thujone (8,0)	Lituanie [66]	1,8-Cinéole (8,2) β -thujone (19,0) Bornéol (8,0) α -Humulène (8,7)
Tunisie [60]	α -Thujone (25,0) β -Thujone (13,0) 1,8-Cinéole (8,5) Camphre (2,1)	Serbie-Monténégro [67]	α -Thujone (37,5) 1,8-Cinéole (14,4) Camphre (13,7) α -Pinène (5,0)
France [63]	α -Thujone (20,9) 1,8-Cinéole (3,4) Camphre (22,0) Umbellol (7,2)	Brésil [68]	α -Thujone (24,8) 1,8-Cinéole (14,8) Camphre (10,9) Bornéol (11,1)
Espagne [62]	Camphre (24,4) 1,8-Cinéole (24,7) Camphène (7,6) α -Pinène (6,7)	Cuba [69]	α -Thujone (12,9) Viridiflorol (13,4) α -Humulène (14,7) β -Thujone (10,9)
Iran [64]	α -Thujone (20,9) 1,8-Cinéole (3,4) p-Cymen (11,0) Bornéol (12,0)		

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont étudié l'effet du séchage sur la variation de la composition chimique en constituants volatils de la sauge officinale. Les résultats ont montré que les teneurs de ces composés changent avec le séchage et ceci est dû à la volatilité et l'instabilité thermique des constituants [70].

Pour les propriétés pharmacologiques de la sauge, elle est considérée comme un stimulant pour les gens anémiques, aussi pour les personnes stressées et déprimées, et conseillée pour les étudiants en période d'examen. Pour usage externe, elle est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies [67]. Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux [68].

Par ailleurs, les huiles essentielles de sauge son à craindre en cas de surdosage ou lors d'un usage prolongé. Le constituant toxique de l'huile essentielle de sauge officinale est le composé β -Thujone, qui engendre des effets secondaires, tels que, la tachycardie, des bouffées de chaleur, des convulsions et des vertiges [46].

La sauge est une des plantes les plus utilisées en phytothérapie, vu ses propriétés médicinales importantes (antimicrobiennes, antioxydantes, ...etc.). La sauge est riche en métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes,...etc.) [46]. Les principaux composés sont :

- **Les acides phénols :** 4-Hydroxybenzoïque acide, 3-Méthoxy-4-hydroxybenzoïque, acide (acide vanillique), acide férulique, acide rosmarinique, acide salvianolique, cis-p-Coumarique acide 4-(2-apiosyl) glucoside, trans-p-Coumarique acide 4-(2-apiosyl) glucoside, 6-Feruloyl-a-glucose, 6-Feruloyl-b-glucose,...etc.
- **Les flavonoïdes :** 5,7,40-Trihydroxyflavone (apigénine), -7-Méthyl éther (genkwanine), -7,40-Diméthyl éther (acacétine), 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavone (luteoline), Quercétine, 5,7,30-Trihydroxy-40-méthoxyflavanone (hespérétine), Apigénine-7-glucoside (cosmosiine), Luteoline-7-glucoside (cinaroside), ...etc.

CHAPITRE II

ANALYSE DES EXTRAITS VOLATILS DES FEUILLES D'OLIVIER DE LA VARIETE *CHEMLAL* PAR GC-FID ET GC-MS-EI

Dans ce chapitre :

II-1) Introduction

II-2) Méthodes de détermination des indices de rétention

II-3) Extraction par Hydrodistillation (HD) des feuilles d'olivier de la variété Chemlal

II-4) Etude de la composition chimique des extraits volatils des feuilles d'olivier Chemlal par GC-FID et GC-MS-EI

II-4-a) Résultats et discussion

II-5) Conclusion

II-1) Introduction :

Comme nous l'avons déjà signalé auparavant, à notre connaissance, il n'y a aucune information sur les profils chimiques des volatils des feuilles d'olivier poussant en Algérie dans la littérature.

Dans le chapitre I, nous avons présenté les caractéristiques botaniques ainsi que les propriétés médicinales des feuilles d'olivier. Dans ce présent chapitre, et après une description du protocole opératoire utilisée pour extraire les volatils des feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** poussant en Kabylie, nous présenterons une étude concernant l'analyse qualitative et semi-quantitative de deux extraits volatils de feuilles d'olivier FO1 (GC-FID) et FO2 (GC-MS) récupérés par hydrodistillation en utilisant un Clevenger [6].

Dans l'analyse qualitative des huiles essentielles qui sont des mélange complexes par chromatographie en phase gazeuse (GC) avec un détecteur à ionisation de flamme (FID), l'utilisation des indices de rétention de Kovàts [71,72] est considérée comme un artifice analytique incontournable et important dans l'identification des substances, et ceci pour pallier l'insuffisance d'étalons très onéreux. Alors, avant d'entreprendre l'analyse des FO par GC et GC-MS, nous détaillerons les différentes méthodes de calcul des indices de rétention.

II-2) Méthodes de détermination des indices de rétention :

a) La méthode de Kovàts :

En mode isotherme, Kovàts [71,73] a utilisé la série des n-alcanes pour définir un système général constituant une échelle de référence, dans lequel tout soluté peut être repéré par rapport à deux alcanes l'encadrant sur le chromatogramme. Ainsi, pour un soluté quelconque X, la connaissance de son temps de rétention corrigé (t'_{Ri}), permet de déterminer par interpolation sur cette droite, un nombre d'atomes de carbone hypothétique appelé indice de rétention égal à 100 fois le nombre d'atomes de carbone réel.

Chaque soluté « x » peut donc être classé par rapport à une série d'homologues par son indice de rétention (I_x).

Les points fixes dans l'échelle des indices de rétention de Kovàts est la série des n-alcanes (**équation II-1**).

$$I_x = 100.Z_i + 100 \frac{\ln t'_{R(x)} - \ln t'_{R(z)}}{\ln t'_{R(z+1)} - \ln t'_{R(z)}} \quad (\text{II-1})$$

$t'_{R(x)}$: temps de rétention corrigé du soluté (x) étudié ;

$t'_{R(z)}$: temps de rétention corrigé de l'alcane à (Z) atomes de carbone qui précède le soluté (x);

$t'_{R(z+1)}$: temps de rétention corrigé de l'alcane à (Z+1) atomes de carbone qui suit le soluté (x).

b) La méthode de Van Den Dool :

En mode de programmation de température, la formule pour calculer les indices de rétention est différente de celle de Kovàts dont la théorie est basée sur des considérations isothermes. En effet, Van Den Dool et Kratz [74] ont proposé de calculer les indices par une formule semblable de celle de Kovàts mais en remplaçant le logarithme du temps de rétention corrigé par la température (ou le temps) de rétention par l'équation II-2.

$$I_x = 100.Z_i + 100 \frac{t_{R(x)} - t_{R(z)}}{t_{R(z+1)} - t_{R(z)}} \quad (\text{équation II-2})$$

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

$t_{R(z)}$: temps de rétention brut de l'alcane à (Z) atomes de carbone qui précède le soluté (x);

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

Depuis l'avènement des colonnes capillaires, la CPG est devenue une méthode d'analyse incontournable pour les mélanges complexes tels que les huiles essentielles.

La programmation de température est toujours recommandée dans ce cas, car les essences naturelles sont caractérisées par la diversité des fonctions chimiques des substances qui les composent.

II-3) Extraction par Hydrodistillation (HD) des feuilles d'olivier de la variété Chemlal :

- Matériel végétal :

L'étude a été menée sur des feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** collectées de deux sites de la région de Tizi Ouzou: les Ouadias et Draâ El Mizan. 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.

L'extraction des composés volatils à partir des feuilles d'olivier par hydrodistillation (HD) a été réalisée au moyen d'un montage en verre de type Clevenger modifié (**Figure I-1** donnée dans le **Chapitre I**) à pression atmosphérique.

En effet, nous avons introduit 250 grammes de FO à l'état frais dans un ballon, accompagnés de 1 litre d'eau distillée, puis chauffés pendant 3 heures après obtention de la première goutte d'hydrolat. Grâce au système de cohobation du Clevenger, la quantité d'eau au sein du ballon est quasiment la même tout au long de la distillation. Pour la récupération des volatils, nous avons ajouté 2 mL d'hexane dans l'essencier du Clevenger (pour piéger les volatils). Pour chaque extraction, nous avons récupéré 1 mL d'extrait par simple décantation que nous avons conservé au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à basse température.

Nous notons que, il a fallu analyser durant le jour même les extraits obtenus par les méthodes chromatographiques afin d'avoir des résultats exploitables.

Nous avons pu avoir des résultats exploitables seulement pour deux extraits, mais nous signalons que nous avons fait plusieurs hydrodistillations des FO. La majeure difficulté que nous avons rencontrée est au niveau de la conservation de ces derniers (les extraits sont très volatils).

Les extraits de FO récupérés par hydrodistillation sont donnés dans le **Tableau II-1**.

Tableau II-1 : Extraits volatils des feuilles d'olivier Chemlal (*Olea europea L.*) étudiés.

Matière Végétale	Lieu de la récolte	Masse Végétale Fraiche (g)	Type d'extraction
✓ Feuilles d'olivier Chemlal (FO1)	Site 1 : Les Ouadias (Tizi Ouzou)	250	HD (3 heures)
✓ Feuilles d'olivier Chemlal (FO2)	Site 2: Draâ el Mizane (Tizi Ouzou)	250	HD (3 heures)

II-4) Etude de la composition chimique des extraits volatils des feuilles d'olivier par GC-FID et GC-MS-EI :

Nous avons analysé deux extraits volatils de feuilles d'olivier de deux sites différents au niveau de la région de Tizi Ouzou: l'extrait FO1 et l'extrait FO2.

Les extraits FO1 et FO2 ont été analysés par GC-FID et GC-MS-EI et ceci sur une colonne apolaire de type HP5 MS. Nous avons à chaque fois injecté la série des n-alcanes (de C₆ à C₂₈) dans les mêmes conditions chromatographiques que les extraits FO1 et FO2 afin de calculer les indices de rétention [71,74]. Les conditions de séparation sont données dans la partie expérimentale de ce mémoire.

L'identification des constituants des deux extraits a été effectuée de la manière suivante :

1. Pour l'identification des constituants de l'extrait FO1 analysé par GC-FID, nous avons calculé les indices de rétention et par la suite nous les avons comparés à ceux trouvés dans la littérature pour les mêmes conditions chromatographiques [74].
2. Pour l'identification des constituants de l'extrait FO2 analysé par GC-MS-EI, nous avons procédé par comparaison des spectres de masse obtenus à ceux des produits purs donnés en littérature [75-79]. Nous avons utilisé une recherche informatisée « library search » et nous avons consulté plusieurs banques de données « Wiley, NIST 98,.....etc. ». Nous avons également utilisé les indices de rétention de la littérature obtenus dans les mêmes conditions chromatographiques de séparation, ce qui nous a permis de vérifier l'ordre d'élution des différents composés.

II-4-a) Résultats et discussion :

L'analyse chromatographique des deux extraits volatils des feuilles d'olivier **Chemlal** FO1 (GC-FID) et FO2 (GC-MS-EI) sur une colonne apolaire HP5MS, nous a permis d'avoir les profils chromatographiques représentés sur les **Figures II-1 et II-2** respectivement.

L'examen des chromatogrammes montrent que, les extraits FO1 et FO2 ne sont pas riches en constituants où seulement une vingtaine de pics sont présents dans chaque chromatogramme et dont la plupart correspondent à des composés en très faibles concentrations. Pour ces derniers, nous signalons que, l'identification en GC-MS a été difficile.

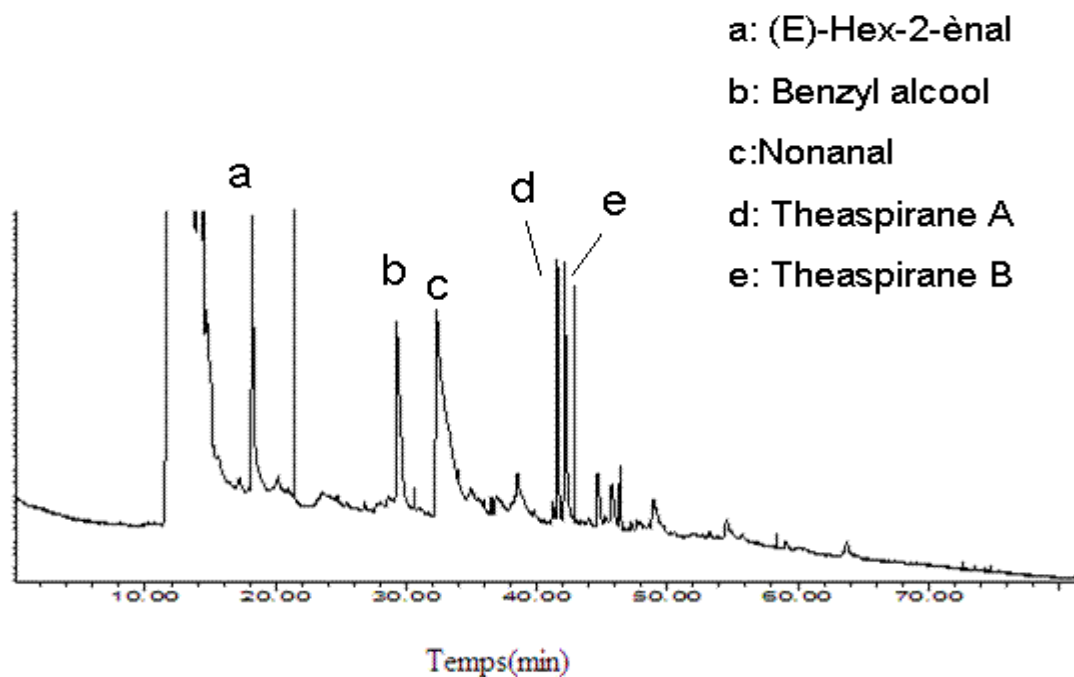


Figure II-1: Chromatogrammes (GC-FID) d'un extrait de feuilles d'olivier (FO1) de la variété **Chemlal** sur une colonne apolaire HP5 MS.

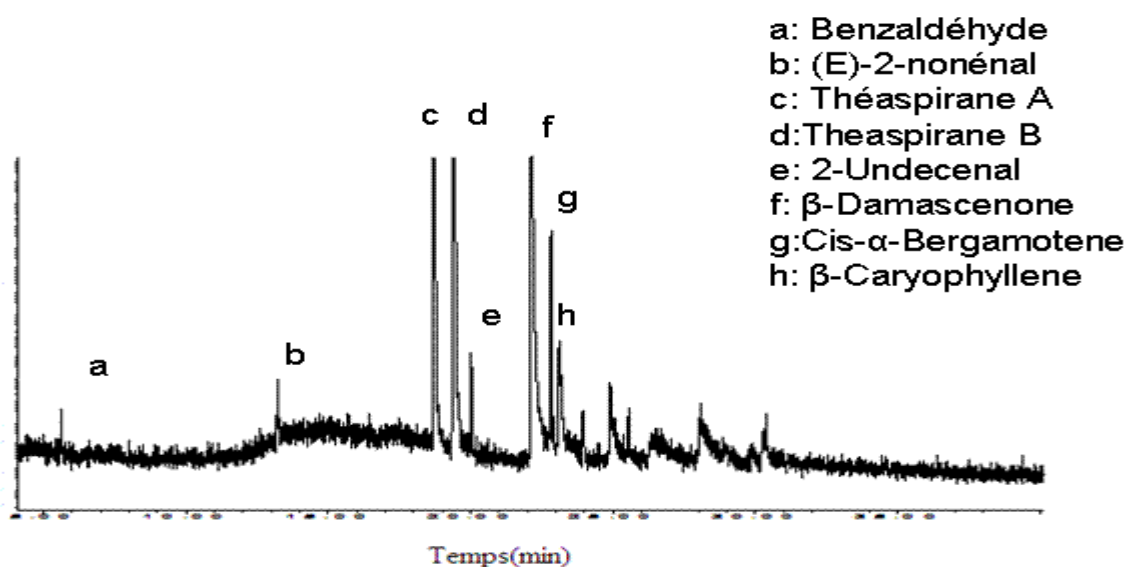


Figure II-2: Chromatogramme en courant ionique total (GC-MS-EI) d'un extrait de feuilles d'olivier (FO2) de la variété **Chemlal** sur une colonne apolaire HP5 MS.

Une tentative d'identification des composés contenus dans les deux extraits est donnée dans le **Tableau II-2**. Les indices de rétention ainsi que les teneurs des constituants dans chaque extrait FO1 et FO2 ont été également donnés.

Les résultats montrent que :

- Au total, 33 composés ont été identifiés en considérant les deux extraits. En effet, 21 composés représentant 99,77% de l'extrait FO1 et 19 composés représentant 99,02% pour l'extrait FO2 avec seulement 7 composés en communs dont le composé majoritaire qui est le Theaspirane B (**Tableau II-2**).

- L'extrait FO1 est caractérisé par les composés majoritaires suivants : le Theaspirane B (23,13%), le (E)-hex-2-éнал (20,35%), le Theaspirane A (19,34%), le Benzyl alcool (13,93%) et le Nonanal (9,64%). L'extrait FO2 est caractérisé par les composés majoritaires suivants : le Theaspirane B (29,46%), le Theaspirane A (23,74%), le β -Damascenone (21,43%) et le Cis- α -Bergamotène (6,57%) (**Tableau II-4** et **Figure II-6**).

- Plusieurs composés ont été identifiés dans l'extrait FO1 avec une teneur importante et ils sont absents dans l'extrait FO2, comme le (E)-hex-2-éнал (20,35%), le Benzyl alcool (13,93%) et le Nonanal (9,64%).

Dans le **Tableau II-3**, sont regroupés les composés identifiés par GC-MS dans l'extrait FO2 accompagnés des premiers ions-fragments (m/z) les plus intenses issus de chaque spectre de masse. La structure de quelques composés identifiés dans les deux extraits volatils de feuilles d'olivier FO1 et FO2 est donnée sur la **Figure II-3**. Sur les **Figures II-4 et II-5**, nous avons donné les spectres de masse des deux composés le Theaspirane et le β -Damascenone.

Le **Tableau II-5** et la **Figure II-7** où sont représentées les différentes familles chimiques recensés dans les extraits FO1 et FO2 fait ressortir la prédominance nette des composés oxygénés (aldéhydes, alcools, cétones et oxydes) et que la plus part des composés identifiés contiennent dans leurs structures chimiques au minimum une liaison insaturée (double liaison).

Globalement nous aboutissons aux résultats suivants :

- L'extrait FO1 est riche en oxydes (42,47%), en aldéhydes (31,46%), en alcools (16,65%) et en composés cétoniques (8,45%). Les esters (0,43%) ainsi que les composés hydrocarbonés (sesquiterpènes 0,32 %) sont en faibles concentration.
- Pour l'extrait FO2, le taux d'aldéhydes (4,72%) et d'alcools (3,06%) est faible comparativement à celui relevé pour l'extrait FO1. La teneur des oxydes (54,53 %), des cétones (23,64 %) et des sesquiterpènes est importante dans l'extrait FO2.
- Les sesquiterpènes Cis- α -Bergamotène (6,57%) et l' α -Humulène (1,80%) ont été identifiés seulement dans l'extrait FO2. Les monoterpènes sont quasiment absents dans les 2 extraits volatils FO1 et FO2.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons avancer que les isomères le Theaspirane A et le Theaspirane B caractérisent les feuilles d'olivier de la variété **Chemlal**. Les composés oxygénés (oxydes, aldéhydes, alcools et cétones) constituent les familles chimiques prédominantes dans les feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** de la région de Tizi ouzou.

Tableau II-2: Indices de rétention sur une colonne apolaire HP5 MS et composition chimique de deux extraits volatils des feuilles d'olivier **Chemlal FO1** (GC-FID) et **FO2** (GC-MS).

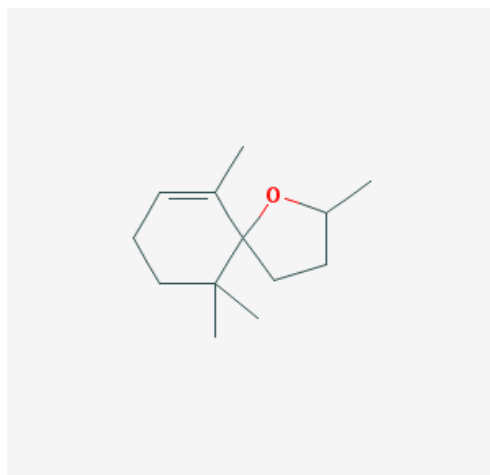
Feuilles d'olivier Chemlal						
N°	Composé	FO1		FO2		IK (ref)
		I	%	I	%	
1	(E)-2-Hexénal	825	20,35	--	--	848
2	(E,E)-2,4-Hexadienal	923	0,43	--	--	912
3	Benzaldéhyde	--	--	967	0,78	960
4	Benzyl alcool	1037	13,93	--	--	1036
5	(E)-2-Octénal	1065	0,02	--	--	1064
6	(E)-2-Nonénal	--	--	1162	1,70	1165
7	Nonanal	1104	9,64	--	--	1109
8	Methyl nicotinate	1142	0,01	--	--	1140
9	1-Nonanol	--	--	1181	0,73	1170
10	Methyl salicylate	1198	0,02	--	--	1190
11	Decanal	1206	0,12	--	--	1204
12	2-Ethylbenzaldéhyde	1211	0,29	--	--	1221
13	(E,Z)-2,4-Decadienal	1311	0,60	--	--	1298
14	Theaspirane A	1321	19,34	1293	23,74	1298
15	(E,E)-2,4-Decadienal	--	--	1297	0,26	1318
16	Theaspirane B	1337	23,13	1312	29,46	1315
17	2-undecenal	--	--	1360	1,98	1368
18	β -Damascenone	1357	1,40	1390	21,43	1391
19	β -Damascone	1403	5,96	1397	1,33	1411
20	Cis- α -Bergamotène	--	--	1411	6,57	1413
21	β -Caryophyllène	1435	0,15	1420	4,56	1420
22	(E)-isoeugenol	1452	2,63	1446	1,72	1452
23	(E)-Geranylacetone	1455	1,09	--	--	1449
24	α -Humulène	--	--	1476	1,80	1470
25	1-Dodecanol	--	--	1478	0,23	1478
26	Germacrène D	1490	0,17	1480	0,15	1481
27	(E)- β -Ionone	--	--	1497	0,88	1493
28	Eugenol acétate	1530	0,38	--	--	1531
29	Caryophyllène oxyde	--	--	1583	1,33	1581
30	Humulan-1,6-dien-3-ol	--	--	1658	0,15	1655
31	Selin-11-en-4- α -ol (Kongol)	--	--	1662	0,23	1652
32	Curcuphenol	1711	0,09	--	--	1713
33	Isoamyl dodecanoate	1840	0,02	--	--	1842
Total identifié		99,77		99,02		

IK (ref) : indices de rétention de Kovàts de référence obtenus sur une colonne apolaire relevés de la littérature [75-79].

Tableau II-3 : Les fragments les plus intenses des composés identifiés dans l'extrait volatil FO2 des feuilles d'olivier **Chemlal** par GC-MS sur la colonne apolaire HP5MS.

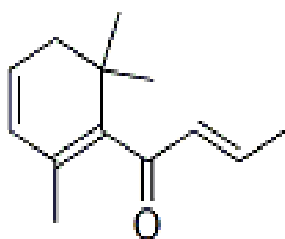
Composés	Fragments	M ⁺
Benzaldéhyde	106.105.77.51.50	106
(E)-2-Nonenal	41.43.55.70.29.39.83	140
1-Nonanol	56.55.43.70.41.69.42.29	144
Theaspirane A	138.32.82.96.109.41.123.55	194
(E,E)-2,4-Decadienal	81.41.67.55.95.79.121.83	152
Theaspirane B	138.32.82.96.109.41.123.55	194
2-Undecenal	41.70.43.55.70.29.83.29	168
β-Damascenone	32.69.121.105.91.41.190.77	190
Cis-α-Bergamotène	83.119.41.79.76	204
β-Caryophyllène	133.93.105.79.69.120.161.41	204
(E)-Isoeugenol	164.77.43.103.149.131.91.55	164
α-Humulène	93.121.80.147.107.77.67.41	204
1-Dodecanol	32.161.91.105.119.79.41.133	204
Germacrène D	161.105.91.119.81.79.77.41	204
(E)-β-Ionone	177.43.109.41.69.91.55.95	192
Caryophyllène oxyde	79.41.91.69.32.95.107.121	220
Humulan-1,6-dien-3-ol	109.43.204.95.81.55.69.161	222
Selin-11-en-4-α-ol	43.81.189.55.161.204.135.67	222

M⁺ : ions-moléculaire.

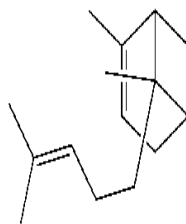


Theaspirane (C₁₃H₂₂O)

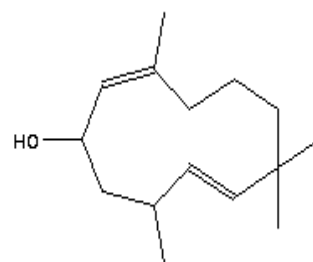
(2R,5R)-2,6,10,10-tetraméthyl-1-oxaspiro(4.5)dec-6-ène



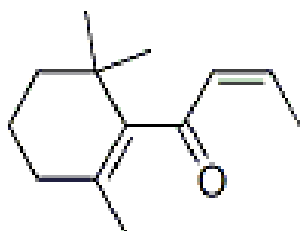
β-Damascenone



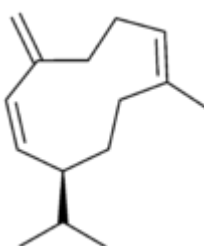
Bargamotène



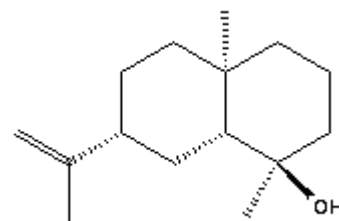
Humulan-1,6-dien-3-ol



β-Damascone



Germacrène D



Selin-11-en-4-α-ol (Kongol)

Figure II-3: Structure chimique de quelques composés identifiés dans les extraits volatils des feuilles d'olivier Chemlal **FO1** ou **FO2**.

Abundance

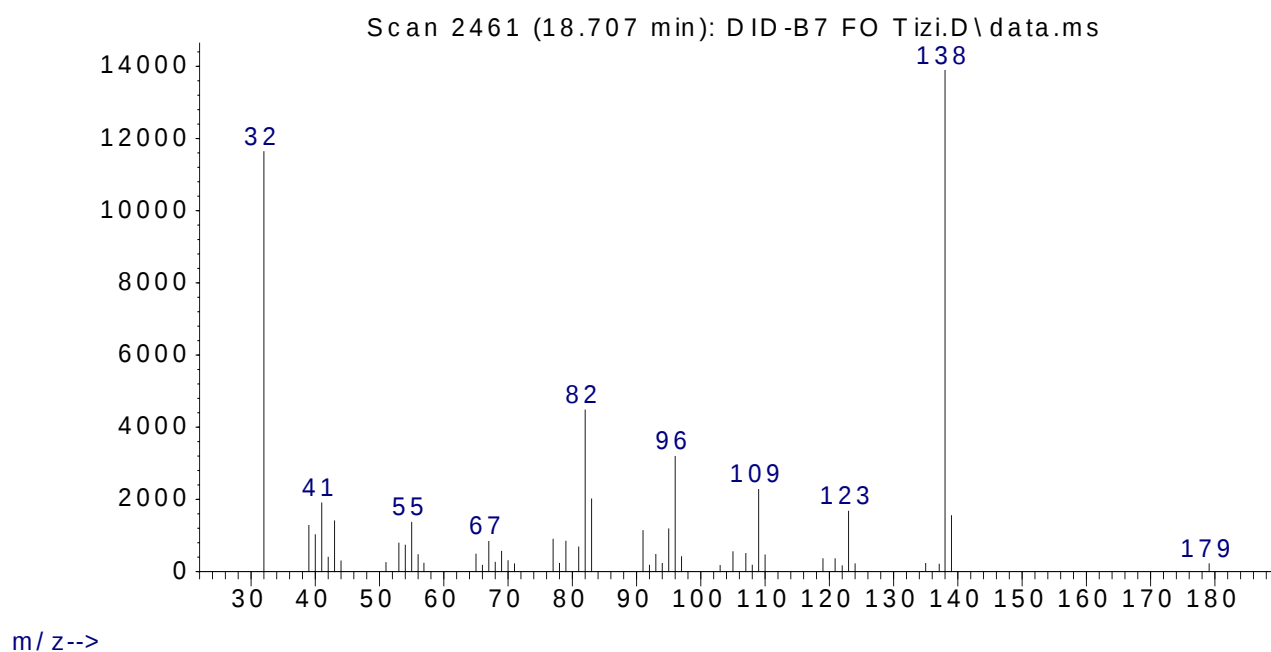


Figure II-4: Spectre de masse du **Theaspirane** identifié dans les extraits volatils des feuilles d'olivier Chemlal FO1 et FO2.

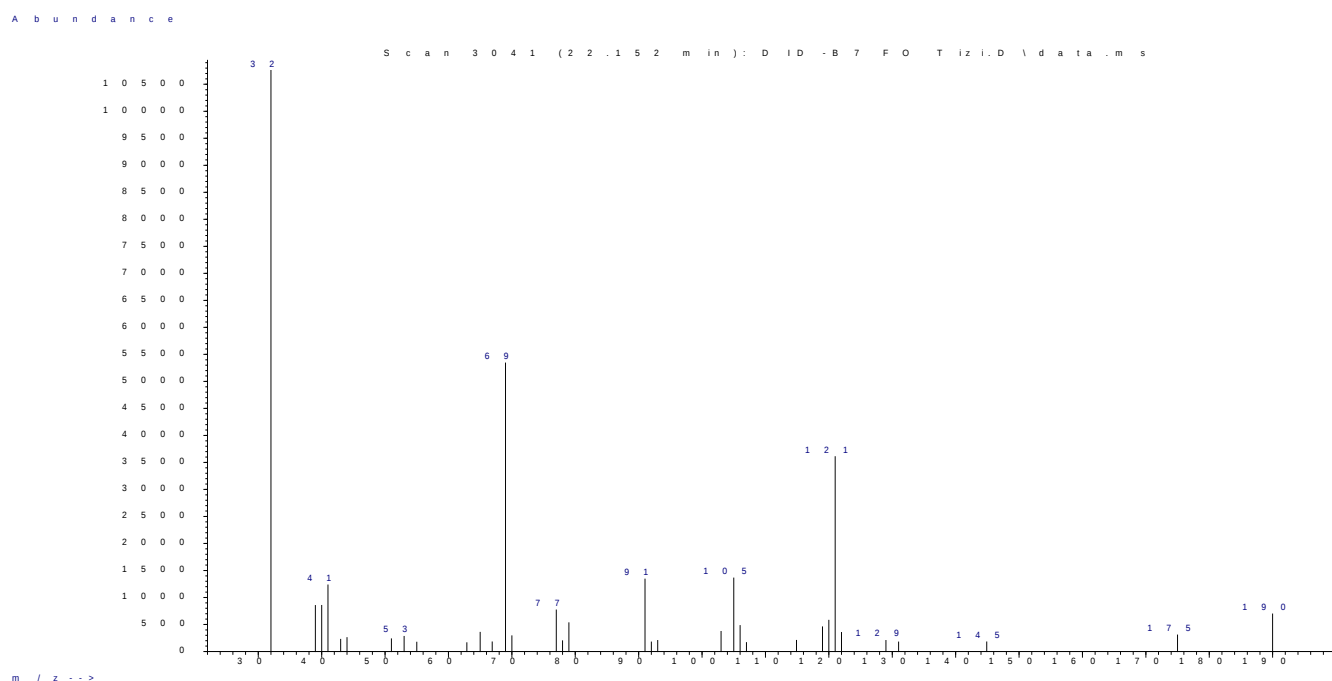


Figure II-5: Spectre de masse du **β -Damascenone** identifié dans les extraits volatils des feuilles d'olivier Chemlal FO1 et FO2.

Tableau II-4 : Pourcentage (%) des composés majoritaires relevés dans les extraits volatils des feuilles d'olivier.

Composés majoritaires	Feuilles d'olivier Chemlal	
	FO1	FO2
- Theaspirane B	23,13	29,46
- (E)-hex-2-éнал	20,35	--
- Theaspirane A	19,34	23,74
- Benzyl alcool	13,93	--
- Nonanal	9,64	--
- β -Damascenone	1,40	21,43
- Cis- α -Bergamotène	--	6,57
- β -Caryophyllène	0,15	4,56

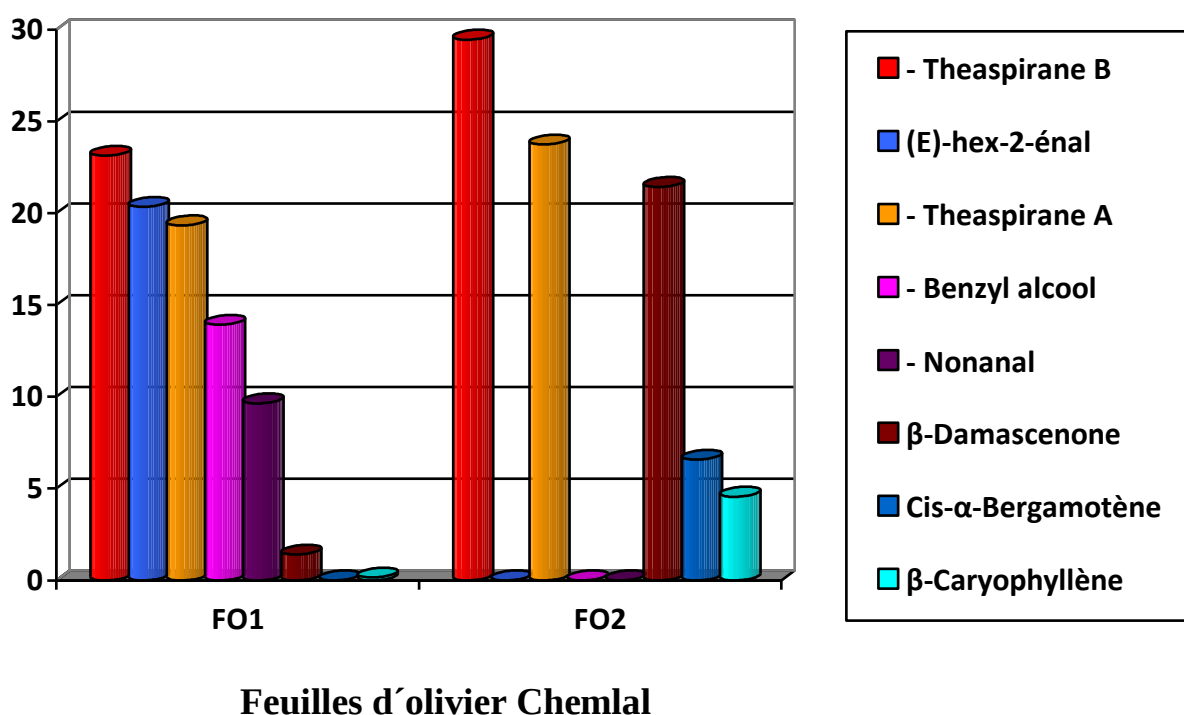
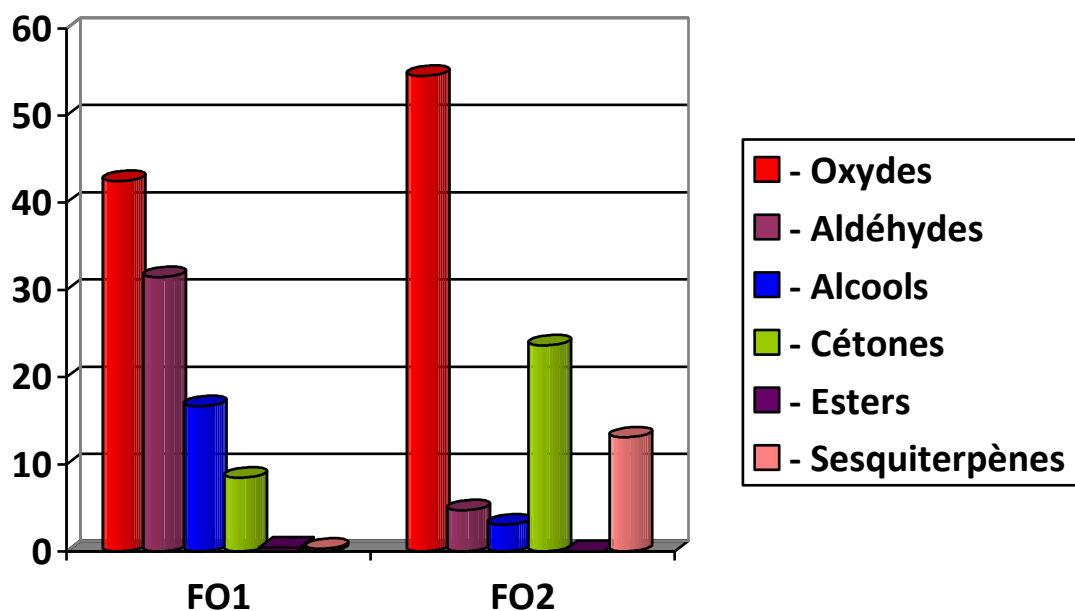


Figure II-6: Pourcentages (%) des composés majoritaires identifiés dans les extraits volatils des feuilles d'olivier de la variété Chemlal FO1 et FO2.

Tableau II-5: Les familles chimiques ainsi que leurs pourcentages (%) relevés dans les extraits volatils des feuilles d'olivier.

Familles de composés	Feuilles d'olivier Chemlal	
	FO1	FO2
- Oxydes	42,47	54,53
- Aldéhydes	31,46	4,72
- Alcools	16,65	3,06
- Cétones	8,45	23,64
- Esters	0,43	--
- Sesquiterpènes	0,32	13,08



Feuilles d'olivier Chemlal

Figure II-7: Les familles chimiques en (%) identifiées dans les extraits volatils des feuilles d'olivier.

Une très grande variabilité dans la composition chimique (qualitative et quantitative) a été relevée par les différents auteurs entre les différentes variétés des feuilles d'olivier d'Italie et de Tunisie. Pour cette raison, nous pensons que la comparaison de nos résultats avec ceux publiés est difficile.

II-5) Conclusion :

L'analyse chromatographique GC-FID et GC-MS des deux extraits volatils des feuilles d'olivier **Chemlal** FO1 et FO2 sur une colonne apolaire HP5 MS, nous a permis d'identifier 33 composés au total avec seulement 7 constituants en communs dont le composé majoritaire qui est le Theaspirane B.

L'extrait FO1 a été caractérisé par les composés majoritaires suivants : le Theaspirane B (23,13%), le (E)-hex-2-éнал (20,35%), le Theaspirane A (19,34%), le Benzyl alcool (13,93%) et le Nonanal (9,64%). L'extrait FO2 a été caractérisé par les composés majoritaires suivants : le Theaspirane B (29,46%), le Theaspirane A (23,74%), le β -Damascenone (21,43%) et le Cis- α -Bergamotène (6,57%).

L'extrait FO1 est riche en oxydes (42,47%), en aldéhydes (31,46 %), en alcools (16,65%) et en composés cétoniques (8,45%). Pour l'extrait FO2, la teneur en aldéhydes (4,72%) et en alcools (3,06%) est faible comparativement à celle relevé pour l'extrait FO1. Le pourcentage des oxydes (54,53%), des cétones (23,64%) et des sesquiterpènes est importante dans l'extrait FO1. Les monoterpènes sont quasiment absents dans les 2 extraits étudiés.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons avancer que les deux isomères Theaspirane A et Theaspirane B caractérisent les feuilles d'olivier de la variété Chemlal de la région de Tizi Ouzou. D'autres part, les composés oxygénés comme les aldéhydes, les cétones et les alcools constituent les familles chimiques prédominantes dans les 2 extraits de feuilles d'olivier étudiés.

Comme nous l'avons déjà signalé auparavant, il n'existe aucune référence bibliographique concernant le profil chimique des extraits volatils des feuilles d'olivier poussant en Algérie. De ce fait, dans le cadre de ce travail, et pour la première fois (à notre connaissance), une tentative d'extraction et d'identification des volatils des feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** a été proposée.

CHAPITRE III

ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES DE SAUGE OFFICINALE PAR GC-FID ET GC-MS-EI

Dans ce chapitre :

III-1) Introduction

III-2) Extraction par hydrodistillation des essences de sauge officinale

III-3) Analyse qualitative des essences de sauge par GC-FID et GC-MS-EI

III-3-a) Résultats et discussion

III-4) Analyse semi-quantitative des essences de sauge

III-4-a) Résultats et discussion

III-5) Conclusion

III-1) Introduction :

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à réaliser une étude qualitative et semi-quantitative de trois huiles essentielles de sauge officinale de la région de Blida. En effet, nous avons utilisé deux procédés d'extraction : l'hydrodistillation classique (HD) et l'hydrodistillation assistée par chauffage micro-ondes (HD-MO). Une étude comparative entre les deux procédés d'extractions (sauge fraîche HD et sauge fraîche HD-MO) sera réalisée en terme de rendement d'extraction et de composition chimique des essences obtenues. Nous avons également étudié l'influence de l'humidité initiale du matériel végétal (sauge fraîche HD et sauge sèche HD) sur la variation de la composition chimique.

Les analyses chromatographiques ont été réalisées par GC-FID et GC-MS-EI et ceci sur deux colonnes de polarités différentes (une colonne apolaire HP5MS et une colonne polaire HPWAX).

Les essences ont été injectées dans les mêmes conditions chromatographiques que la série des n-alcanes (C_6 - C_{28}) afin de calculer les indices de rétention de Kovàts selon Van Den Dool et Kratz [71-74] de tous les constituants des huiles essentielles détectés au cours de ce travail à partir d'un programme de calcul. Les conditions chromatographiques de séparation de la GC-FID ainsi que la GC-MS-EI sont détaillées dans la partie expérimentale de ce mémoire.

L'identification des constituants des trois essences de sauge a été effectuée de la manière suivante :

- Pour l'identification des constituants analysés par GC-FID, nous avons calculé les indices de rétention et par la suite nous les avons comparés à ceux cités dans la littérature pour les mêmes conditions chromatographiques de séparation [74].
- Pour l'identification des constituants analysés par GC-MS-EI, nous avons procédé par comparaison des spectres de masse ions-fragments caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux des produits purs cités dans la littérature [75-79]. Nous avons utilisé une recherche informatisée « library search » et nous avons consulté plusieurs banques de bibliothèques spectrales « Wiley7, NIST 2000, essentiel oil,etc. ». Nous avons également utilisé les indices de rétention de la littérature obtenus dans les mêmes conditions chromatographiques de séparation, ce qui nous a permis de vérifier l'ordre d'élution des différents composés.

III-2) Extraction des essences de sauge officinale :

a) Matériel végétal :

L'étude a été menée sur la partie aérienne de la sauge officinale (feuilles) collectés d'une manière aléatoire et à partir de plusieurs sous-arbustes à quelques mètres de l'oued de Sidi El Kebir (Blida) et ceci durant les mois Mai-Juin.

Nous avons utilisé pour l'extraction des essences de sauge deux techniques d'extractions : une hydrodistillation classique (HD) en utilisant un montage en verre de type Clevenger modifié (**Figure I-1** donnée dans le chapitre I) et une hydrodistillation assistée par chauffage micro-ondes (HD-MO) en utilisant le même montage en verre de type Clevenger modifié mais le chauffage se fait à l'intérieure d'un four à micro-ondes (**Figure I-1** donnée dans le chapitre I). Le matériel végétal fraîchement cueilli a été partagé en trois lots distincts :

- Le premier lot est hydrodistillé le deuxième jour de la cueillette (sauge fraîche HD).
- Le second lot a subi une hydrodistillation assistée par micro-ondes également le deuxième jour de la cueillette (sauge fraîche HD-MO).
- Le troisième a été séché pendant 15 jours (le poids est devenu stable) à l'air libre et à l'abri du soleil et par la suite hydrodistillé (sauge sèche HD).

b) Extraction :

Avant chaque distillation le matériel végétal est pesé puis rincé à l'eau et mis dans un ballon contenant de l'eau portée à ébullition.

Les masses du végétal utilisées sont données dans le **Tableau III-1**. Pour l'hydrodistillation HD, nous avons suivi le même protocole expérimental que celui décrit pour les feuilles d'olivier, sauf que les huiles essentielles ont été récupérées par une simple décantation. La durée de l'hydrodistillation est de trois heures concernant la sauge fraîche HD et la sauge sèche HD.

Concernant l'hydrodistillation assistée par des micro-ondes, nous avons utilisé un « Clevenger », sauf que dans ce cas, une partie du montage a été placé dans un four à micro-ondes. En effet, la plante est placée dans un ballon contenant 1 litre d'eau et l'ensemble est disposé à l'intérieur d'un four à micro-ondes. Le reste du montage est placée à l'extérieur du four.

La durée de l'extraction est de 30 minutes avec une puissance du chauffage de 300 W. Les huiles essentielles de sauge obtenues sont des liquides mobiles limpides de couleur jaune pâle, dégagent une odeur agréable camphrée. Les huiles essentielles sont conservées au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à basse température.

c) Rendements :

Le rendement a été calculé par la relation suivante : $R (\%) = (m_1/m_2) \cdot 100$

Avec m_1 : Masse de l'huile essentielle extraite.

m_2 : Masse de la matière végétale hydrodistillée.

Les rendements d'extraction des trois essences de sauge sont donnés dans le **Tableau III-1**.

Tableau III-1: Rendements en essences de sauge officinale étudiées dans notre travail avec ceux obtenus dans d'autres pays.

Matière Végétale	Type Extraction	Masse Végétale (g)	Rendement (%)
✓ Sauge Fraîche HD (ce travail)	HD	144,00	0,25
✓ Sauge Sèche HD (ce travail)	HD	115,00	1,24
✓ Sauge Fraîche HD-MO (ce travail)	HD-MO	78,00	0,79
Algérie [61] : Sauge Sèche	HD	--	0,90
Tunisie [60] : Sauge Sèche	HD	--	1,02-1,63
Lituanie [66] : Sauge Sèche	HD	--	0,70-1,40

III-2-a) Résultats et discussion :

D'après le **Tableau III-1** et les **Figures III-1** et **III-2**, si on compare le rendement des 3 essences de sauge (notre travail), nous remarquons que la sauge sèche HD donne un rendement d'huile le plus élevé (1,25%). Ce résultat était prévisible car le séchage augmente le rendement en huile essentielle et ceci peut être expliqué par la perte en eau du matériel végétal. Pour la sauge fraîche HD, le rendement obtenu est faible (0,25%). Le rendement obtenu pour la sauge extraite par hydrodistillation assistée par micro-ondes HD-MO (0,79%) est trois fois plus élevé que celui obtenu par hydrodistillation classique HD et ceci avec des conditions expérimentales en faveur de la HD-MO avec un temps d'extraction réduit qui est de 30 minutes au lieu de 3 heures pour l'HD (**Figure III-1**). En effet, la capacité de chauffage des micro-ondes est nettement supérieure par rapport à un chauffage traditionnel, alors la durée de l'extraction sous micro-ondes est considérablement réduite par rapport à une hydrodistillation classique (HD).

Dans la plus part des travaux publiés dans la littérature, la sauge a été utilisée après séchage. En effet, les rendements concernant la sauge sèche obtenus par HD relevés dans la littérature varient entre 0,45% et 1,4% [54-70]. Comme le montre la **Figure III-2**, nos valeurs correspondent bien aux rendements trouvés dans les différentes régions de la méditerranée comme la Tunisie (concernant la sauge sèche) [60].

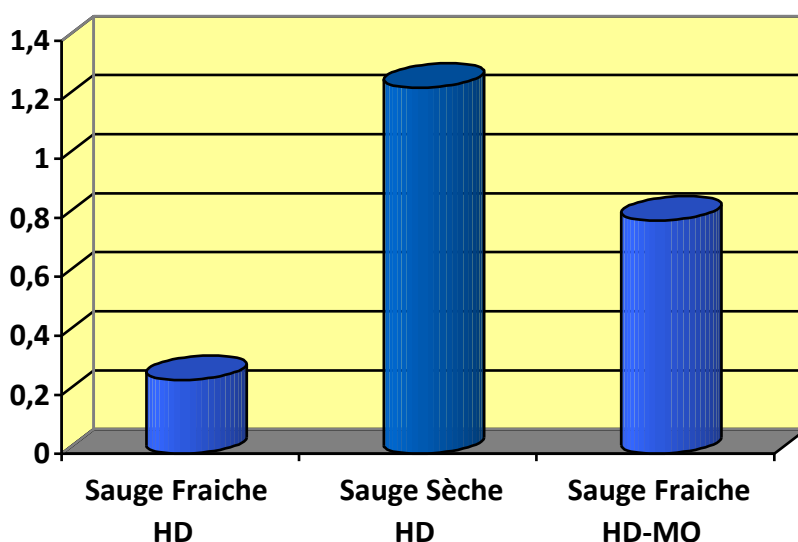


Figure III-1 : Rendements (%) en huiles des 3 essences de sauge officinale étudiées.

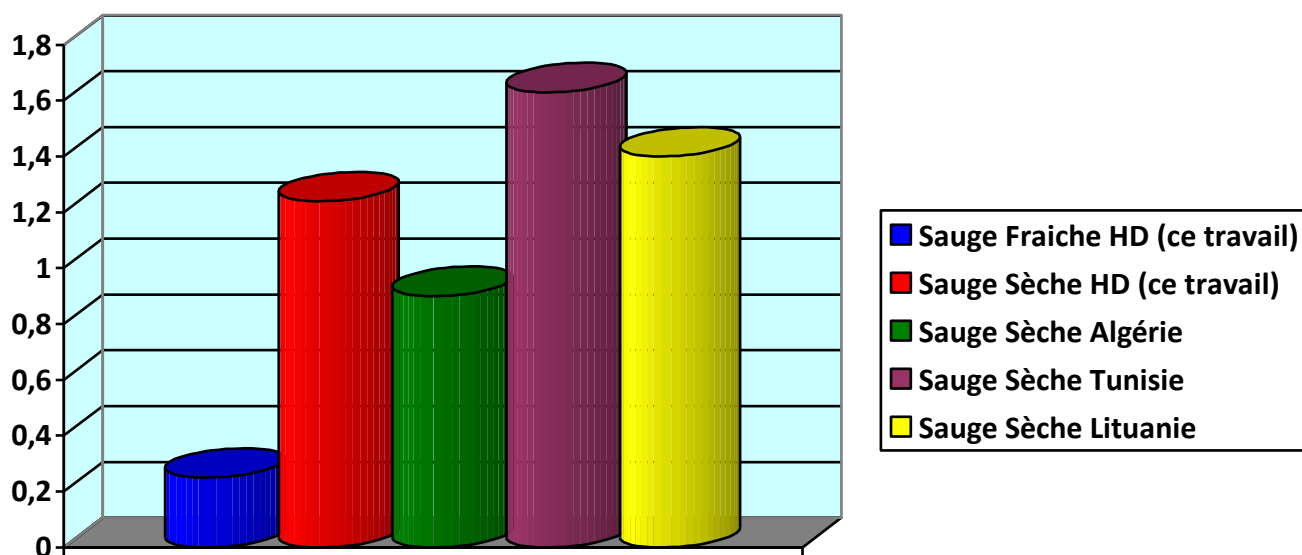


Figure III-2 : Comparaison des rendements (%) des essences de sauge officinale étudiées dans ce travail avec ceux obtenus en Algérie et dans d'autres pays étrangers.

III-3) Analyse qualitative des essences de sauge par GC-FID et GC-MS-EI:

III-3-a) Résultats et discussion:

Pour les 3 essences étudiées (sauge fraîche HD, sauge sèche HD et sauge fraîche HD-MO), les chromatogrammes obtenus par GC-FID (colonne apolaire HP5MS) et GC-MS (colonne apolaire HP5MS et colonne polaire HPWAX) sont portés sur les **Figures III-3, III-4 et III-5**. A partir de ces chromatogrammes, l'huile essentielle de sauge fraîche HD apparaît comme étant la plus riche en constituant et ceci quelque soit la méthode d'analyse utilisée. Pour la sauge la sauge fraîche HD-MO et la sauge sèche HD, on distingue un nombre plus faible de composés.

Les indices de rétention calculés par la méthode de Van Den Dool et Kratz [74] des différents constituants identifiés ainsi que leurs teneurs relatives sont donnés dans le **Tableau III-2** (GC-FID), le **Tableau III-3** (GC-MS colonne apolaire HP5MS) et le **Tableau III-4** (GC-MS colonne polaire HPWAX) .

Nous signalons que, dans certains cas, des écarts significatifs entre la valeur d'indice calculée et celle de la littérature ont été relevés surtout pour les composés monoterpéniques hydrocarbonés qui sont élués en premier dans chaque chromatogramme. Ceci peut s'expliquer par le fait que les indices de rétention sont dépendants des conditions opératoires.

A partir de ces résultats, nous remarquons que:

Concernant les résultats obtenus par GC-FID, l'hydrodistillation classique fournit une huile essentielle constituée de 47 composés aromatiques et l'huile extraite par l'hydrodistillation assistée par des micro-ondes HD-MO est composée de 38 composés. Par contre, la sauge sèche HD est constituée de seulement 14 composés (absence de 32 composés par rapport à la sauge fraîche HD). En effet, par exemple, le β -Pinène (5,40%), le Bornyl acétate (1,15%), le Manool (2,63%) ont une teneur non négligeable dans la sauge fraîche HD, mais ils sont inexistantes dans la sauge sèche HD (**Tableau III-2**). Ces composés semblent avoir plus d'affinité avec l'eau, et de ce fait, ils ont été probablement perdus avec l'eau pendant le processus de séchage [70].

D'autres part, l'utilisation de la méthode d'extraction HD-MO a entraînée l'absence de 9 composés qui sont : Cis-Ocimène, β -Gurjunène, Aromadendréne, Sesquiphellandrène, γ -Eudesmol, Sesquilavandulol, α -Cadinol, α -Bisabolol et Abietadiène. Ces composés ont été identifiés uniquement dans la sauge fraîche HD.

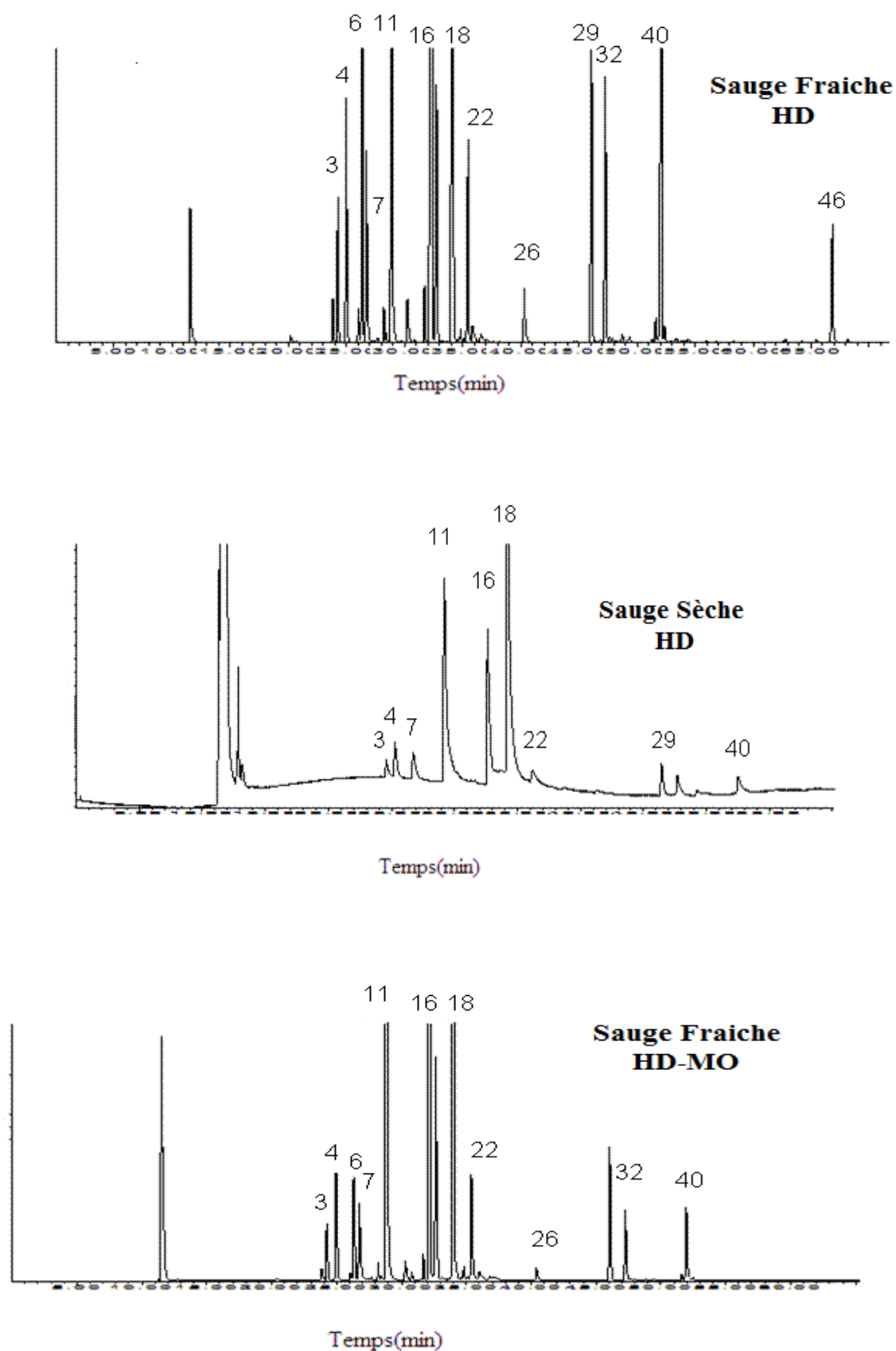


Figure III-3: Chromatogrammes (CG-FID) des huiles essentielles de sauge sur une colonne apolaire HP5 MS.

Tableau III-2: Indices de rétention des composés identifiés dans 3 essences de sauge officinale ainsi que leurs teneurs obtenus sur une colonne **apolaire HP5 MS** par **GC-FID**.

Essences de sauge								
N°	Composé	Fraiche HD		Sèche HD		Fraiche HD-MO		IK (ref)
		I	%	I	%	I	%	
1	Cis-Salvène	820	0,06	--	--	824	0,10	856
2	Tricyclène	908	0,61	--	--	909	0,33	926
3	α -Thujène	919	2,18	927	1,48	919	1,40	930
4	α -Pinène	937	4,21	944	3,28	936	3,05	939
5	Camphène	966	0,55	--	--	965	0,20	954
6	β -Pinène	972	5,40	--	--	971	2,75	979
7	Myrcène	981	3,48	980	3,24	982	2,34	991
8	α -Phéllandrène	1004	0,10	--	--	1005	0,13	1003
9	δ -3-carène	1016	0,47	--	--	1016	0,30	1011
10	α -Terpinène	1020	0,12	--	--	1020	0,16	1016
11	1,8-Cinéole	1031	12,44	1037	25,98	1029	21,09	1033
12	Cis-Ocimène	1045	0,02	--	--	--	--	1040
13	γ -Terpinène	1060	0,92	--	--	1061	0,59	1060
14	Cis-Sabinène hydrate	1073	0,05	--	--	1071	0,25	1068
15	α -Terpinolène	1091	0,73	--	--	1091	0,45	1088
16	α -Thujone	1105	18,42	1111	15,08	1102	22,23	1102
17	β -Thujone	1114	4,60	1119	0,56	1112	5,81	1114
18	Camphre	1146	16,23	1146	39,58	1143	25,71	1143
19	Isobornéol	1157	0,06	--	--	1156	0,06	1156
20	Bornéol	1160	0,26	--	--	1160	0,35	1165
21	Pinocamphone	1167	0,05	--	--	1166	0,08	1173
22	Terpinèn-4-ol	1175	3,41	1170	2,26	1173	2,83	1177
23	α -Terpinéol	1184	0,50	1191	0,01	1186	0,52	1189
24	Verbenone	1200	0,29	--	--	1205	0,23	1205
25	E-Carvéol	1213	0,06	--	--	1214	0,20	1217
26	Bornyl acétate	1290	1,15	--	--	1293	0,41	1289
27	β -élémane	1401	0,02	--	--	1402	0,02	1391
28	Longifolène	1411	0,02	--	--	1412	0,01	1402
29	β -Caryophyllène	1429	5,90	1423	3,01	1425	3,23	1420
30	β -Gurjunène	1436	0,02	--	--	--	--	1434
31	Aromadendrène	1443	0,07	--	--	--	--	1441
32	α -Humulène	1451	4,63	1456	2,36	1445	1,80	1455
33	β -Farnesène	1458	0,01	--	--	1450	0,01	1458
34	Germacrene D	1509	0,02	1494	0,01	1492	0,08	1480
35	Sesquiphellandrène	1525	0,17	--	--	--	--	1524
36	α -Cadinène	1540	0,03	1541	0,34	1543	0,01	1539
37	Elémol	1545	0,10	--	--	1547	0,05	1549
38	Oxyde de caryophyllène	1585	0,07	--	--	1586	0,02	1581
39	Globulol	1590	0,40	--	--	1591	0,14	1583
40	viridiflorol	1598	8,44	1599	2,80	1590	2,00	1593
41	Oxyde d'humulène	1600	0,34	--	--	1600	0,13	1600
42	γ -Eudesmol	1602	0,07	--	--	--	--	1605
43	Sesquilavandulol	1608	0,04	--	--	--	--	1606
44	α -Cadinol	1655	0,08	--	--	--	--	1653
45	α -Bisabolol	1683	0,07	--	--	--	--	1683
46	Manool	2050	2,63	--	--	2051	0,26	2056
47	Abietadiène	2088	0,16	--	--	--	--	2080
Total identifié		99,66		99,99		99,33		

IK (ref) : indices de rétention de Kovats de référence [75-79].

Concernant les résultats obtenus par GC-MS-EI, les mêmes constatations ont été relevées. Pour les résultats obtenus sur la colonne apolaire HP5MS, l'huile essentielle de sauge fraîche HD présente le plus grand nombre de composés identifiés avec 42 composés, la sauge fraîche HD-MO est constituée par 32 composés et seulement 10 composés ont été identifiés dans la sauge sèche HD (**Tableau III-3**).

Sur la colonne polaire HPWAX, 37 composés dans la sauge fraîche HD ont été recensés contre 28 composés seulement dans la sauge fraîche HD-MO (**Tableau III-4**). La sauge utilisée à l'état frais et extraite par l'hydrodistillation classique HD est incontestablement la plus riche en composés aromatiques.

La différence dans le nombre de molécules aromatiques constituant les 2 essences de sauge (sauge fraîche HD et sauge sèche HD-MO) provient essentiellement de la disparition de certains composés entre l'HD-MO et l'HD, mais il est important à noter que ces composés ont une concentration faible (inférieure à 1%). Par ailleurs, le séchage de la sauge pendant 15 jours pendant 15 jours à l'air libre et à l'abri du soleil a donné une essence avec un nombre très faible de composés aromatiques. Ceci est peut-être dû à la volatilité des constituants.

Dans le **Tableau III-5**, sont regroupés les composés aromatiques identifiés dans les trois essences de sauge accompagnés des huit premiers ions-fragments (m/z) les plus intenses issus de leurs spectres de masse. La structure de quelques composés identifiés dans les 3 essences de sauge est donnée sur la **Figure III-6**.

Sur les **Figures III-7, III-8 et III-9**, nous avons donné les spectres de masse des trois composés majoritaires des le Camphre, le 1,8-Cinéole et l' α -Thujone.

Dans ce qui suit, nous effectuerons une analyse semi-quantitative des 3 essences de sauges étudiées.

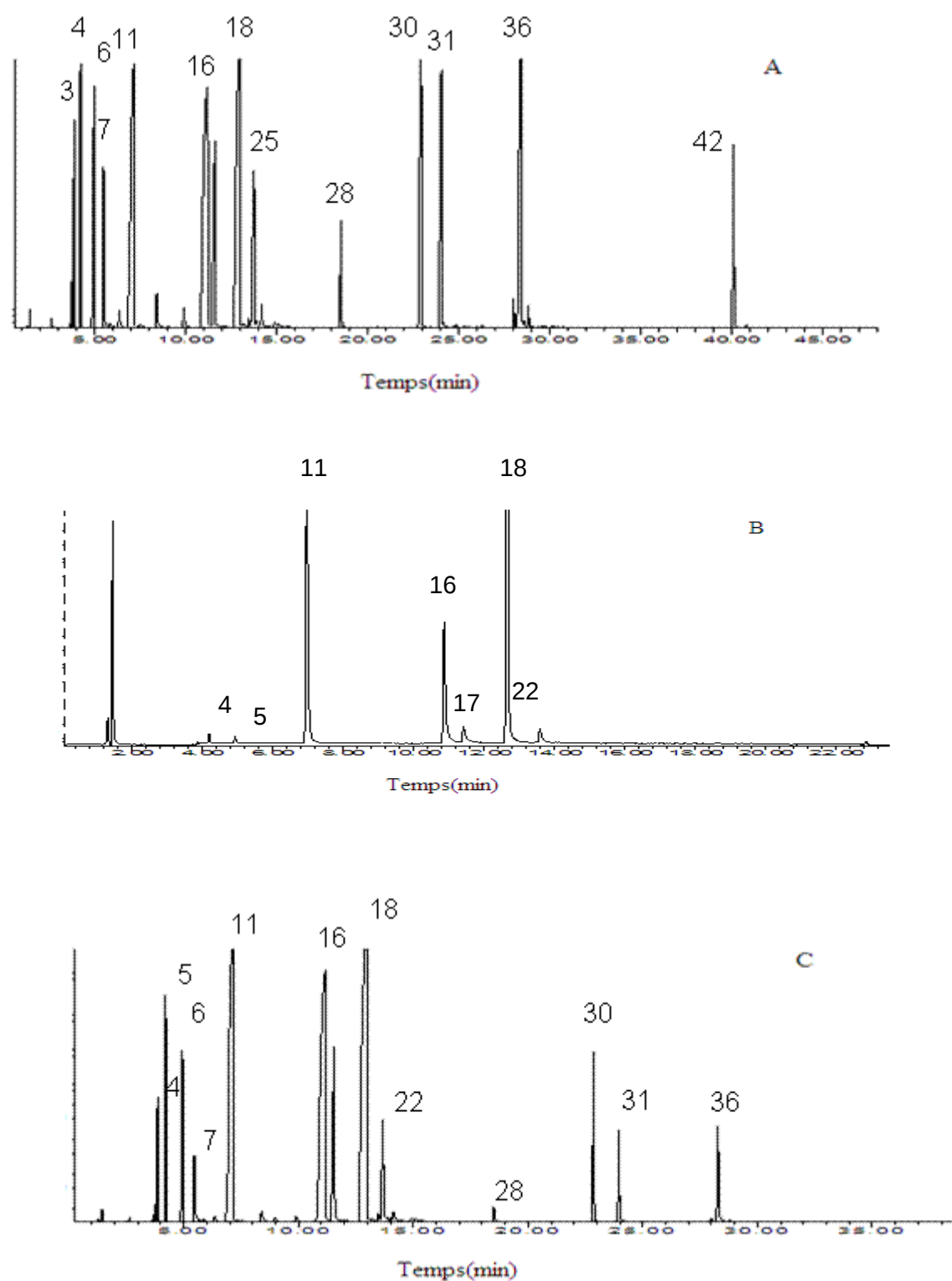


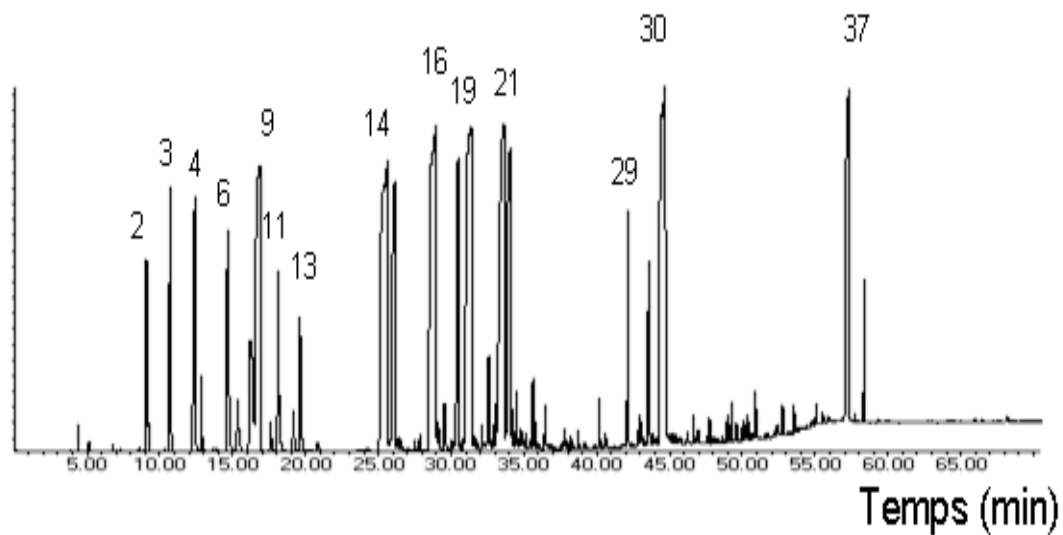
Figure III-4: Chromatogrammes en courant ionique total (GC-MS-EI) des essences de sauge sur une colonne apolaire HP5 MS. **A** : Sauge fraîche HD; **B** : Sauge Sèche HD ; **C** : Sauge fraîche HD-MO.

Tableau III-3: Indices de rétention des composés identifiés dans 3 essences de sauge sur une colonne apolaire HP5 MS par GC-MS-EI.

N°	Composé	Essences de sauge			IK (ref)
		Fraiche HD	Sèche HD	Fraiche HD-MO	
1	Cis-Salvène	847	--	848	856
2	Tricyclène	912	--	912	926
3	α -Thujène	915	--	915	930
4	α -Pinène	919	918	919	939
5	Camphène	929	928	929	954
6	β -Pinène	950	949	949	976
7	Myrcène	964	--	963	991
8	α -Phéllandrène	975	--	975	1003
9	δ -3-carène	979	--	--	1011
10	α -Terpinène	988	--	988	1016
11	1,8-cinéole	1010	1005	1010	1033
12	Cis-Ocimène	1019	--	--	1040
13	γ -Terpinène	1045	--	1045	1060
14	Hydrate cis-Sabinène	--	--	1062	1068
15	α -Terpinolène	1087	--	1087	1088
16	α -Thujone	1117	1111	1116	1102
17	β -Thujone	1127	1123	1126	1114
18	Camphre	1156	1150	1155	1143
19	Lavandulol	1159	--	--	1159
20	Isopinocampnone	1161	--	1167	1151
21	Isobornéol	1167	--	1161	1156
22	Bornéol	1173	1169	1172	1165
23	Pinocampnone	1176	--	1175	1173
24	Pinocampheol	1181	--	1180	1178
25	Terpinén-4-ol	1182	--	1182	1177
26	α -Terpinéol	1198	--	1198	1189
27	Verbénone	1203	--	1203	1205
28	Bornyle acétate	1289	--	1288	1289
29	α -Bourbonène	1378	--	--	1384
30	β -caryophyllène	1414	1401	1424	1420
31	α -humulène	1449	1445	1446	1455
32	β -Farnesène	1454	--	1453	1458
33	Germacrene D	1489	--	--	1480
34	Sesquiphellandrène	1522	--	--	1524
35	Oxyde de Caryophyllène	1581	--	1581	1581
36	Viridiflorol	1595	--	1590	1593
37	Oxyde d'humulène	1600	--	--	1600
38	γ -Eudesmol	1602	--	--	1605
39	Sesquilavandulol	1609	--	1609	1606
40	α -Cadinol	1644	-	--	1653
41	α -Bisabolol	1682	--	--	1683
42	Manool	2057	--	2056	2056
43	Abietadiène	2087	--	--	2080

IK (ref) : indice de rétention de Kovats de référence [75-79].

**Sauge Fraiche
HD**



**Sauge Fraiche
HD-MO**

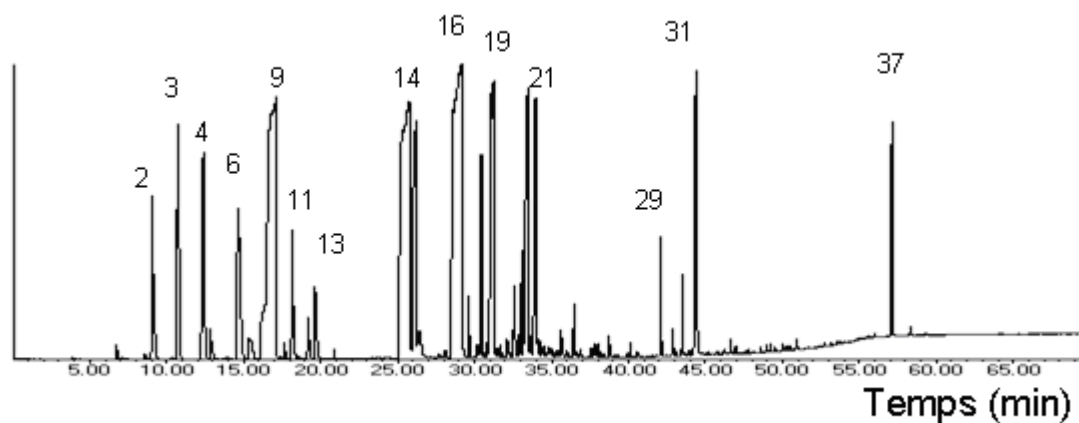


Figure III-5 : Chromatogrammes en courant ionique total (GC-MS-EI) des huiles essentielles de sauge sur une colonne polaire HPWAX.

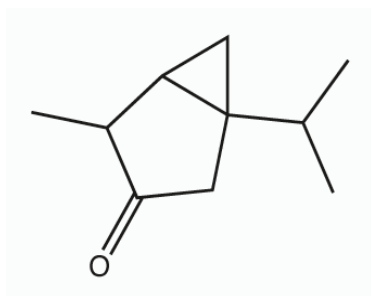
Tableau III-4 : Indices de rétention des composés identifiés de 2 essences de sauge sur colonne **polaire HPWAX** par **GC-MS-EI**.

Essences de Sauge				Essences de Sauge			
N°	Composé	Fraiche HD	Fraiche HD-MO	N°	Composé	Fraiche HD	Fraiche HD-MO
1	Cis-Salvéne	934	933	20	α -Humulène	1696	1691
2	α -Pinène	1021	1022	21	Bornéol	1710	1710
3	Camphène	1065	1065	22	Germacrène D	1728	1718
4	β -Pinène	1108	1107	23	Aromadendrane	1738	--
5	Sabinène	1118	1118	24	δ -Cadinène	1766	1765
6	β -Myrcène	1162	1161	25	Myrténol	1795	1795
7	α -Terpinène	1178	1178	26	Trans-Calamène	1845	1844
8	Limonène	1199	--	27	Anisole	1935	1933
9	1,8-Cinéole	1215	1220	28	α -Ionone	1953	--
10	Cis-Ocimène	1232	1233	29	Caryophyllène Oxyde	2016	2014
11	γ -Terpinène	1244	1245	30	Non-identifié	2043	2043
12	P-Cymène	1268	1269	31	Viridiflorol	2112	2103
13	α -Terpinolène	1279	1280	32	Oxyde d'humulène	2247	--
14	α -Thujone	1448	1451	33	γ -Eudesmol	2313	--
15	β -Thujone	1462	1466	34	α -Cadinol	2361	--
16	Camphre	1547	1553	35	α -Bisabolol	2390	--
17	Iso-pinocamphone	1566	1568	36	Non-identifié	2517	--
18	Bornyl acétate	1593	1593	37	Manool	2696	2688
19	β - Caryophyllène	1621	1619	38	Abietadiène	2740	--

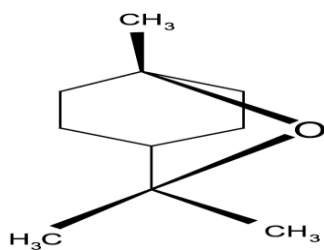
Tableau III-5 : Les huit premiers fragments des composés identifiés dans les essences de sauge par **GC-MS-EI** sur une colonne apolaire **HP5MS**.

Composés	Echantillon	Fragments	M ⁺
Cis-Salvène	A-C	81.67.41.32.69.109.79.39	124
Tricyclène	A-C	93.32.91.121.77.136.41	136
α -Thujène	A-C	93.91.77.79.136.39.41.32	136
α -Pinène	A-B-C	93.91.77.79.121.105.136.39	136
Camphène	A-B-C	93.121.91.107.79.77.136.67	136
β -Pinène	A-B-C	93.91.69.79.77.121.136.41	136
Myrcène	A-C	93.69.41.91.79.77.39.67	136
α -Phéllandréne	A-C	93.32.91.77.41.69.136.79	136
δ -3-carène	A	32.93.41.69.91.77.39.136	136
α -Terpinène	A-C	121.93.91.136.77.32.79.105	136
1,8-cinéole	A-B-C	108.154.81.139.111.43.93.84	152
Cis-Ocimène	A	32.93.91.79.77.41.39.105	136
γ -Terpinène	A-C	93.91.77.136.121.79.32.105	136
Hydrate cis-Sabinène	C	32.93.41.71.91.121.77.41	154
α -Terpinolène	A-C	93.121.136.91.79.77.32.105	136
α -Thujone	A-B-C	110.81.95.67.69.41.55.39	152
β -Thujone	A-C	110.81.95.67.69.41.55.39	152
Camphre	A-B-C	95.81.108.152.83.69.41.55	152
Isopinocampnone	A-C	83.69.55.32.41.39.95.81	152
Isobornéol	A-C	32.95.93.41.81.110.121.67	154
Bornéol	A-C	95.110.99.139.121.41.136.67	154
Pinocampnone	A-C	32.59.81.95.93.43.41.136	152
Pinocampeol	A-C	32.69.55.83.41.95.39.81	154
Terpinén-4-ol	A-C	71.93.111.43.32.86.67.55	154
α -Terpinéol	A-C	32.59.93.121.136.81.43.67	154
Verbénone	A-C	32.79.91.93.107.77.41.121	150
Acétate de Bornyle	A-C	95.121.136.43.108.154.80.92	196
α -Bourbonène	A	32.81.123.161.40.77.91.105	204
β -caryophyllène	A-C	133.93.105.79.69.120.161.41	204
α -humulène	A-C	93.121.80.147.107.77.67.41	204
β -Farnesène	A.C	32.93.79.105.41.121.67.161	204
Germacrene D	A	32.161.91.105.119.79.41.133	204
Oxyde de Caryophyllène	A-C	79.41.91.69.32.95.107.121	220
Viridiflorol	A-B-C	161.109.105.93.122.189.119.69	222
Oxyde d'humulène	A	93.32.43.121.80.107.69	
γ -Eudesmol	A	59.95.43.121.149.109.79.81	222
α -Cadinol	A	95.121.43.59.41.79.109.81	222
α -Bisabolol	A	69.109.43.119.93.41.204.95	222
Manool	A-C	137.95.81.107.69.123.107.257	290
Abietadiène	A	32.109.204.93.81.41.105.119	272

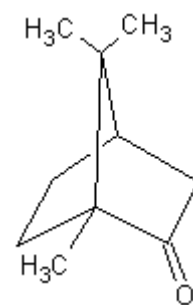
A : Sauge Fraiche HD ; **B :** Sauge Sèche HD, **C :** Sauge Fraiche HD-MO.



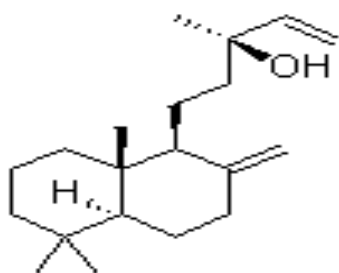
α -Thujone



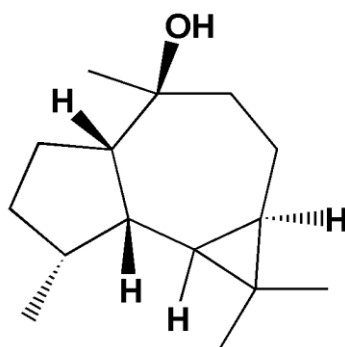
1,8-cinéole



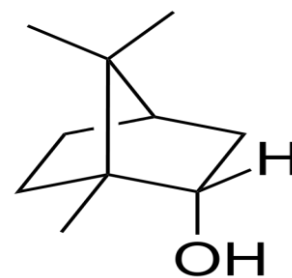
Camphre



Manool



Viridiflorol



Bornéol

Figure III-6: Structure de quelques composés identifiés dans les essences de sauge étudiées.

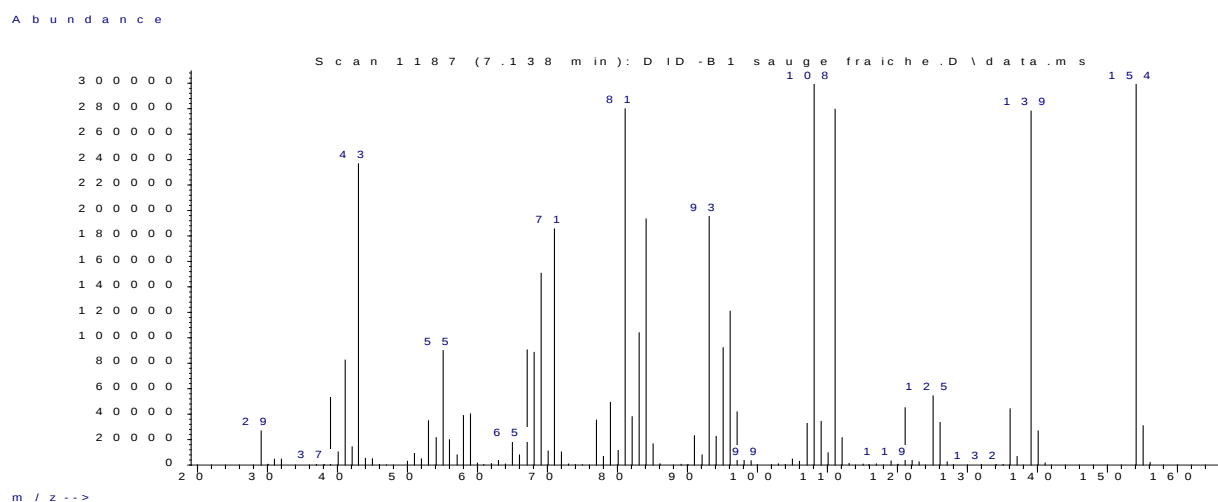


Figure III-7: Spectre de masse du **1,8-Cinéole** identifié dans les 3 essences de sauge.

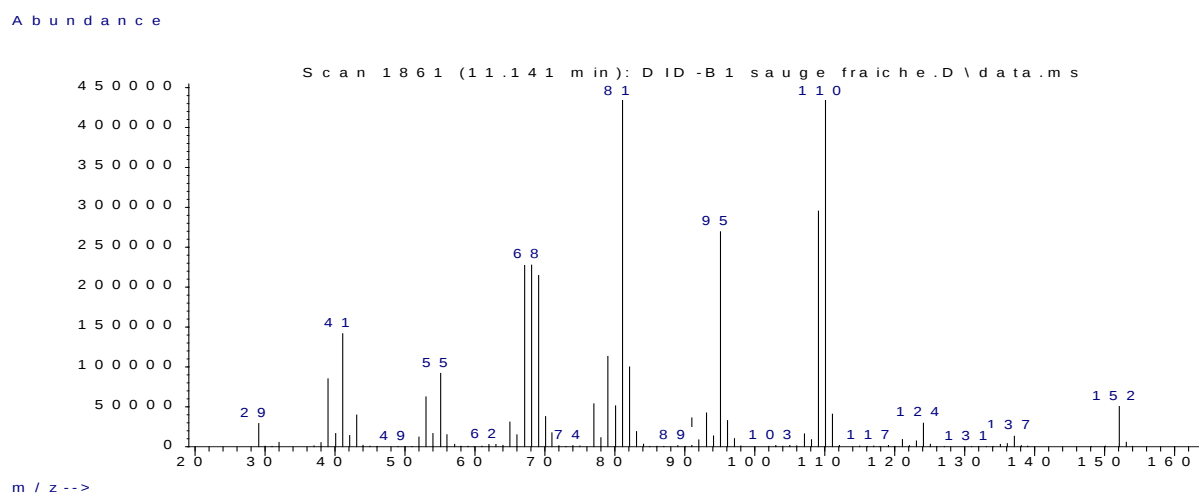


Figure III-8: Spectre de masse de l' **α -Thujone** identifié dans les 3 essences de sauge.

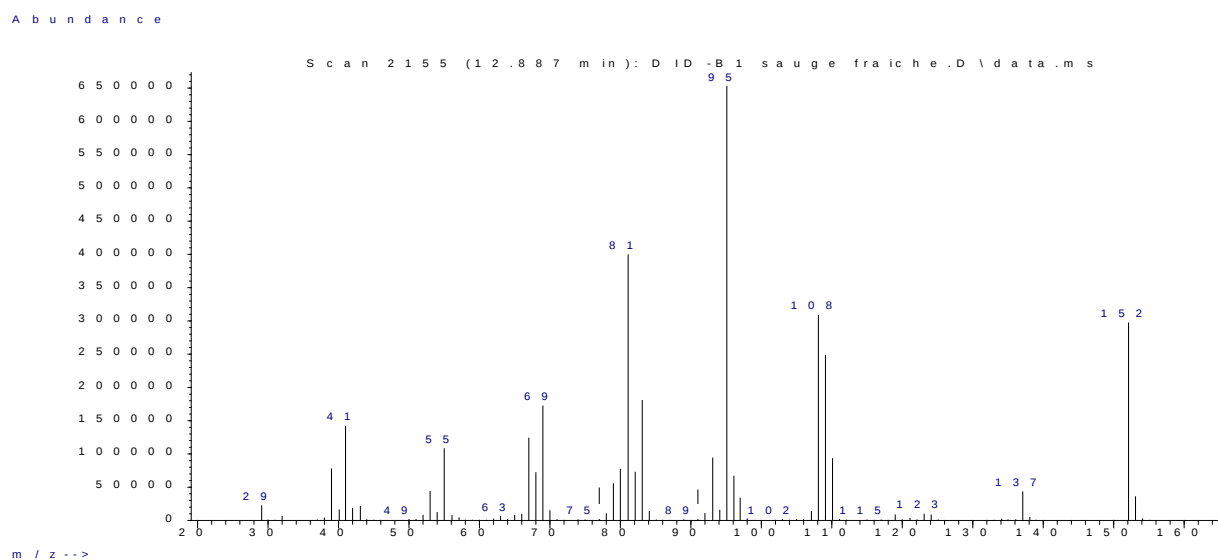


Figure III-9: Spectre de masse du **Camphre** identifié dans les 3 essences de sauge.

III-4) Analyse semi-quantitative des essences de sauge:

L'analyse d'un échantillon par chromatographie permet l'obtention, sous forme de chromatogramme, d'un reflet de la composition chimique d'une huile essentielle ainsi que l'évaluation de la concentration des différents constituants.

Suite à l'analyse qualitative des 3 essences de sauge par les deux techniques chromatographiques GC-FID sur une colonne apolaire HP5MS et GC-MS-EI sur deux colonnes de polarités différentes (une apolaire HP5MS et une polaire HPWAX), nous nous sommes intéressés de faire une étude semi-quantitative des trois essences de sauge étudiées. L'analyse semi-quantitative a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne apolaire HP5MS.

Nous avons admis que le détecteur à ionisation de flamme réagissait de la même façon par rapport à tous les composés présents dans l'essence et que leurs coefficients de réponse sont égaux à l'unité. La teneur relative de chaque constituant a été calculée à partir des aires fournies par un intégrateur calculeur.

III-4-a) Résultats et discussion :

A partir des résultats reportés dans le **Tableau III-6**, nous constatons que, les essences de sauge ont été caractérisées par la prédominance des 3 composés majoritaires l' α -Thujone, le Camphre et le 1,8-Cinéole.

En effet, le composé majoritaire recensé dans la sauge fraîche HD est l' α -Thujone avec une teneur de 18,42%, puis le Camphre (16,23%), le 1,8-Cinéole (12,44%) et le Viridiflorol (8,44%). Par contre, dans l'essence de sauge HD-MO et la sauge sèche le composé majoritaire est le Camphre avec une teneur de 25,71% et 39,58% respectivement.

Le 1,8-Cinéole (25,98% sauge sèche et 21,09% sauge HD-MO) et l' α -Thujone (15,08% sauge sèche et 22,23% sauge HD-MO) ont une teneur notable dans la sauge sèche et la sauge fraîche HD-MO.

Le pourcentage dans la sauge sèche HD du 1,8-Cinéole (25,98%) et dans la sauge fraîche HD-MO (21,094%) est 2 fois plus élevé que celui retrouvé dans la sauge fraîche HD (12,44%). Le pourcentage du Viridiflorol est 4 fois plus important dans la sauge fraîche HD (8,44%), comparativement à celui relevé pour la sauge sèche HD (2,8%) et la sauge fraîche HD-MO (2,0%).

Tableau III-6: Pourcentages (%) par familles de composés identifiés dans les essences de sauge étudiées.

Essences de Sauge	Fraiche HD	Sèche HD	Fraiche HD-MO
<u>Les Monoterpènes</u>			
Tricyclène	0,61	--	0,33
α -Thujène	2,18	1,48	1,40
α -Pinène	4,21	3,28	3,05
Camphène	0,55	--	0,20
β -Pinène	5,40	--	2,75
Myrcène	3,48	3,24	2,34
α -Phéllandrène	0,10	--	0,13
δ -3-carène	0,47	--	0,30
α -Terpinène	0,12	--	0,16
Cis-Ocimène	0,02	--	--
γ -Terpinène	0,92	--	0,59
α -Terpinolène	0,73	--	0,45
<u>Les Sesquiterpènes</u>			
β -élémente	0,02	--	0,02
Longifolène	0,02	--	0,01
β -Caryophyllène	5,90	3,01	3,23
β -Gurjunène	0,02	--	--
Aromadendrène	0,07	--	--
α -Humulène	4,63	2,36	1,80
β -Farnesène	0,01	--	0,01
Germacrène D	0,02	0,01	0,08
Sesquiphellandrène	0,17	--	--
α -Cadinène	0,03	0,34	0,01
<u>Les Alcools</u>			
Isobornéol	0,06	--	0,06
Bornéol	0,26	--	0,35
Terpinène-4-ol	3,41	2,26	2,83
α -Terpinéol	0,50	0,01	0,52
E-Carvéol	0,06	--	0,20
Elémol	0,10	--	0,05
Globulol	0,40	--	0,14
γ -Eudesmol	0,07	--	--
Sesquilavandulol	0,04	--	--
α -Cadinol	0,08	--	--
α -Bisabolol	0,07	--	--
Viridiflorol	8,44	2,80	2,00
Manool	2,63	--	0,26

<u>Les Cétones</u>			
α -Thujone	18,42	15,08	22,23
β - Thujone	4,60	0,56	5,81
Pinocamphone	0,05	--	0,08
Verbenone	0,29	--	0,23
Camphre	16,23	39,58	25,71
<u>Les Oxydes</u>			
1,8-Cinéole	12,44	25,98	21,09
Oxyde de caryophyllène	0,07	--	0,02
Oxyde d'humulène	0,34	--	0,13
<u>Les Esters</u>			
Cis-Sabinène hydrate	0,05	--	0,25
Bornyl acétate	1,15	--	0,41
<u>Autres</u>			
Cis-Salvène	0,06		0,10
Abietadiène	0,16	--	--

Tableau III-6 (Suite) : Pourcentages (%) par familles de composés identifiés dans les essences de sauge étudiées.

Familles de composés	Essences de sauge		
	Fraiche HD	Sèche HD	Fraiche HD-MO
- Composés Hydrocarbonés	29,68	13,72	16,86
- Composés Oxygénés	69,76	86,27	82,37
- Monoterpènes	18,79	8,00	11,70
- Sesquiterpènes	10,89	5,72	5,15
- Alcools	16,12	5,07	6,41
- Cétones	39,59	55,22	54,06
- Oxydes	12,85	25,98	21,24
- Esters	1,20	--	0,66
- Autres	0,22	--	0,10
Total identifié	99,66	99,99	99,32

La composition chimique par familles de composés des 3 essences de sauge (**Tableau III-6**) montre que la classe des composés oxygénés est prédominante et représente plus de 80 % de l'essence pour la sauge sèche HD et la sauge fraîche HD-MO (**Figure III-10**). Pour la sauge fraîche HD, elle représente presque 70% de la composition totale de l'essence. Le pourcentage des monoterpènes est plus élevé que celui des sesquiterpènes et il est le plus élevé pour la sauge fraîche HD (18,79%) (**Figure III-11**).

La composition chimique des 3 essences de sauge est surtout riche en cétones terpéniques (principalement l' α -Thujone, β -Thujone et le camphre). Les pourcentages les plus élevés ont été relevés pour la sauge sèche HD (55,22%) et la sauge fraîche HD-MO (54,06%). Pour la sauge fraîche HD, le pourcentage des cétones est de 39,59%.

Le pourcentage des oxydes obtenu pour la sauge sèche HD (25,98%) et la sauge fraîche HD-MO (21,24%) est presque le double par rapport à celui relevé dans la sauge fraîche HD (12,85%). En revanche, la teneur des alcools pour la sauge fraîche HD (16,12%) est plus élevée que celle enregistrée pour la sauge sèche HD et la sauge fraîche HD-MO (5,07-6,41%). Les esters sont absents dans la sauge sèche HD et présents dans la sauge fraîche HD et HD-MO mais avec un pourcentage très faible (0,10-1,22%).

Les différences majeures qui existent entre les essences de sauge HD et HD-MO ainsi que les essences de sauge fraîche et sèche résident dans les teneurs des composés aromatiques majoritaires. La proportion de ces composés augmente conjointement avec la disparition des constituants minoritaires dans le cas de la sauge fraîche HD-MO et la sauge sèche HD comme nous l'avons montré dans l'analyse qualitative des 3 essences par GC et GC-MS.

En effet, l'utilisation d'un matériel végétal séché et les radiations électromagnétiques des micro-ondes pour extraire les essences de sauge donnent des teneurs les plus élevées en cétones et en oxydes (composés oxygénés). Les composés hydrocarbonés (monoterpènes et sesquiterpènes) ainsi que les alcools sont plus importants en utilisant comme méthode d'extraction l'hydrodistillation classique (HD) et un matériel végétal frais.

Ainsi, ce travail a permis de montrer que la composition chimique des essences de sauge dépend de la technique d'extraction utilisée (hydrodistillation classique ou hydrodistillation assistée par les micro-ondes) et également de l'humidité initiale de la matière végétale utilisée (sèche ou fraîche).

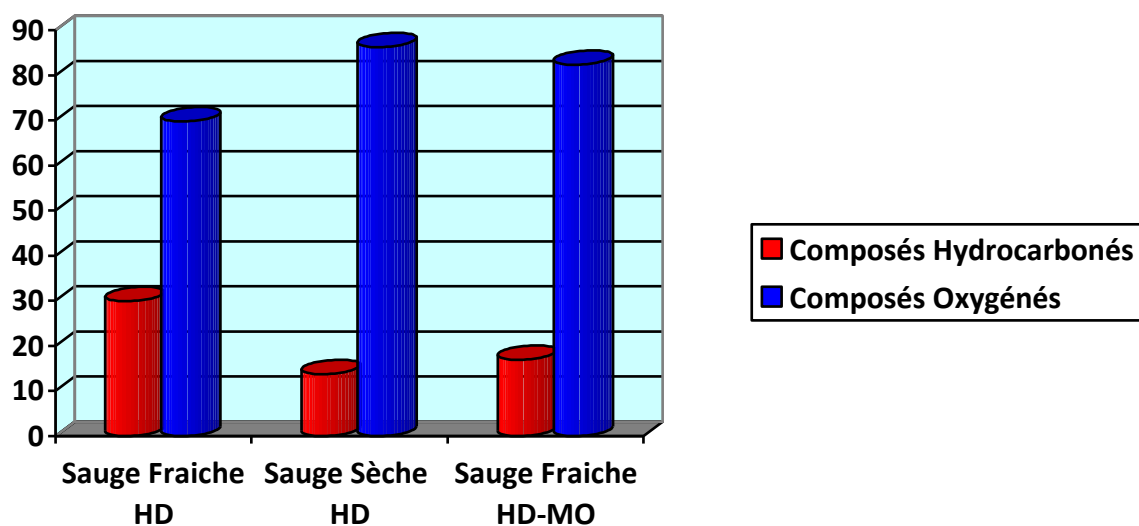


Figure III-10: Pourcentages des composés hydrocarbonés et oxygénés dans les 3 essences de sauge.

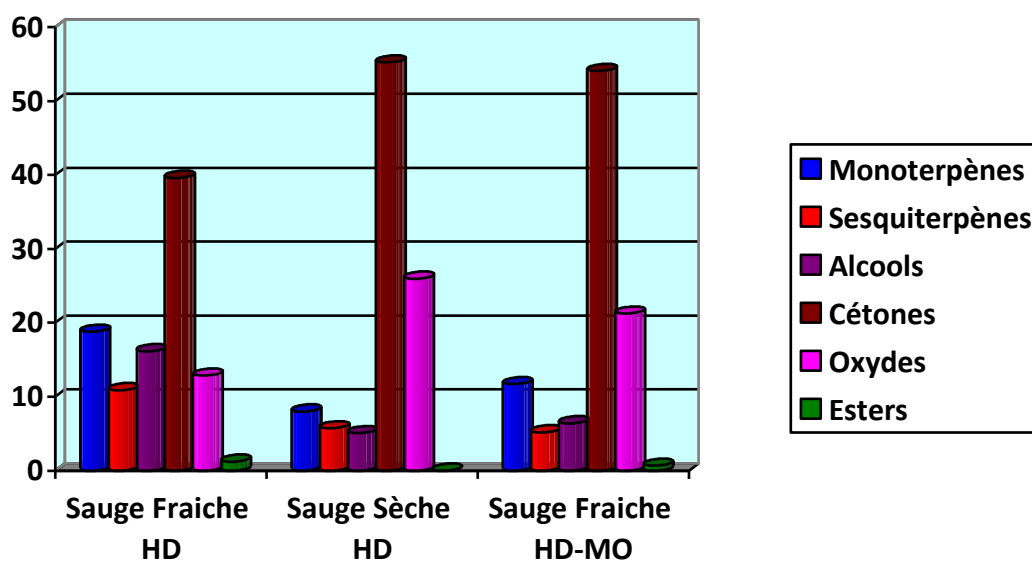


Figure III-11: Pourcentages par familles de composés identifiés dans les essences de sauge étudiées.

- Comparaison des résultats avec la littérature :

Dans le but de comparer nos résultats avec ceux des essences de sauge officinale étrangères, le profil chimique de l'huile essentielle de sauge officinale originaire de plusieurs pays a été étudié [60-68]. Nous avons reporté dans le **Tableau III-7**, les pourcentages de quelques composés identifiés dans l'essence de sauge fraîche HD, l'essence de sauge sèche HD et ceux relevés dans la littérature pour quelques pays étrangers.

L'examen des résultats montre que la plupart des huiles ont une teneur élevée en α -Thujone, en Camphre et en 1,8-Cinéole.

- L' α -Thujone est le composé majoritaire recensé dans l'essence de sauge fraîche HD, en Tunisie (25,02%), en Iran (25,20) et en Serbie- Monténégro (37,51%). Par ailleurs, le camphre est le composé majoritaire obtenu pour notre essence de sauge sèche HD (39,58%) et en Algérie (20,40%) par d'autres auteurs [61], en France (22,00) et en Espagne (24,95%).
- Le composé β -Thujone qui est un composé toxique a une teneur notable dans les différentes régions reportées, sauf dans le cas de la sauge sèche HD où sa teneur est de 0,56% (notre travail).
- La composition chimique de notre huile essentielle sauge fraîche HD extraite des parties aériennes (feuilles) de la sauge officinale collectées au niveau de la région de Blida est différente de celle des autres essences de sauge originaires des autres pays étrangers (**Tableau III-7**). Par exemple, le manool a été recensé avec un pourcentage non négligeable dans la sauge fraîche HD (2,63%), mais avec un pourcentage faible dans la sauge de Serbie-Monténégro (0,27%), alors qu'il est inexistant dans les essences de sauge des différents pays étudiés. La teneur de l' α -Thujone dans l'essence de Serbie-Monténégro est 2 fois plus élevée que celle recensé pour l'essence de sauge fraîche HD de Blida et également pour la sauge officinale extraite par hydrodistillation collectées à Alger [61].

La différence observée entre la composition chimique entre les huiles essentielles de sauge officinale de la région de Blida et celles des autres origines pourrait s'expliquer par une adaptation de la plante aux facteurs abiotiques tels que le climat, aux facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol qui orientent la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis [60-68].

Tableau III-7: Comparaison des pourcentages des constituants identifiés dans l'essence de Sauge Fraiche HD (ce travail) avec ceux identifiés dans des essences de sauge officinale étrangères

	Ce travail Sauge Fraiche HD	Ce travail Sauge Sèche HD	Algérie [61]	Tunisie [60]	France [63]	Espagne [62]	Iran [64]	Brésil [68]	Serbie- Monténégro [67]
α -Thujone	18,42	25,98	19,60	25,02	20,90	20,6	25,20	24,8	37,51
Camphre	16,23	39,58	20,40	2,10	22,00	24,95	--	10,9	13,77
1,8-Cinéole	12,44	25,98	12,30	8,58	13,43	24,74	22,30	14,8	14,42
Viridiflorol	8,44	2,80	8,00	18,96	--	--	--	--	1,31
β -Thujone	4,60	0,56	8,00	13,09	--	--	--	--	4,66
Camphène	0,55	--	1,40	0,68	--	7,60	--	--	--
α -Pinène	4,21	3,28	0,60	0,83	--	6,75	--	--	5,05
β -Caryophyllène	5,90	3,01	4,50	5,20	--	1,80	--	--	1,82
α -Humulène	4,63	2,36	3,10	--	--	--	--	--	4,99
Manool	2,63	--	--	--	--	--	--	--	0,27

III-5) Conclusion :

L'extraction de la sauge fraîche par une hydrodistillation assistée par les micro-ondes HD-MO est 6 fois plus rapide que l'extraction de la sauge fraîche par hydrodistillation classique HD (30 minutes contre 3 heures) avec un rendement 3 fois plus élevé (0,79% contre 0,25%).

L'analyse des 3 essences de sauge par GC-FID et GC-MS-EI a fait ressortir que l'essence de sauge fraîche extraite par HD présente le plus grand nombre de composés aromatiques (37-47) comparativement à la sauge fraîche extraite par HD-MO (28-37 composés) et seulement (10-14) pour la sauge sèche HD.

Les essences de sauge étudiées ont été caractérisées par la prédominance des 3 composés majoritaires l' α -Thujone (15,08-22,23%), le Camphre (16,23-39,58%) et le 1,8-Cinéole (12,44-25,98%).

L'utilisation d'un matériel végétal séché et les radiations électromagnétiques des micro-ondes pour extraire les essences de sauge donnent des teneurs les plus élevées en cétones et en oxydes (composés oxygénés). Les composés hydrocarbonés (monoterpènes et sesquiterpènes) ainsi que les alcools sont plus importants en utilisant comme méthode d'extraction l'hydrodistillation classique (HD) et un matériel végétal frais.

CHAPITRE IV

EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANT DE QUELQUES EXTRAITS POLYPHÉNOLIQUES DE DEUX VARIETES DE FEUILLES D'OLIVIER (CHEMLAL ET LIMLI)

Dans ce chapitre :

IV-1) Introduction

IV-2) Les composés phénoliques

IV-3) Méthodes d'extraction des polyphénols

IV-4) Test d'activité antioxydante par la méthode du DPPH

**IV-5) Extraction des polyphénols des feuilles d'olivier de deux variétés
(Chemlal et Limli)**

**IV-6) Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier de
deux variétés (Chemlal et Limli) par la méthode du DPPH**

IV-6-a) Résultats et discussion

IV-7) Conclusion

IV-1) Introduction :

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en l'occurrence, les polyphénols et les flavonoïdes, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agro-alimentaires [80].

Les antioxydants sont des composés qui protègent les cellules du corps contre les dommages causés par les radicaux libres. Ce sont des molécules qui fixent les radicaux libres et protègent les protéines essentielles et qui diminuent ou empêchent l'oxydation des substances chimiques. Les antioxydants sont des molécules très réactives qui seraient impliquées dans le développement des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement.

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés polyphénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxy phénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$) [81].

Dans la littérature, plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes $\text{ROO}\cdot$ par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) [82]; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) [83]; ou les radicaux $\text{ABTS}\cdot$ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) [84], ainsi que la méthode utilisant le radical libre $\text{DPPH}\cdot$ (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl) [85].

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressées à l'évaluation de l'activité antioxydante de plusieurs extraits polyphénoliques des feuilles d'olivier de deux variétés **Chemlal** et **Limli**. Les polyphénols ont été extraits par des macérations assistées par des ultrasons dans différents solvants alcooliques et hydro-alcooliques.

IV-2) Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois). Ces composés peuvent être groupés dans plusieurs classes. Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins [86].

a) Les acides phénoliques :

- **Les hydroxybenzoïques** : le composé le plus fréquent est l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et le p-hydroxybenzoïque.
- **Les hydroxycinnamiques** : par exemple l'acide caféique, l'acide férulique, p-coumarique, et l'acide sinapique.

b) Les flavonoïdes :

Ils constituent le plus large groupe des phénols dans la plante. Les flavonoïdes identifiés jusqu'à maintenant sont de 4000 composés; ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles aussi sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV [86].

Ces molécules ont un poids moléculaire faible, consiste à 15 atomes de carbones arrangés comme suit : C6-C3-C6 sont composés de deux noyaux aromatiques A et B, liés par un pont de 3 carbones souvent sous forme d'un hétérocycle. Les substitutions variées au sein de l'hétérocycle C donnent les différentes sous classes des flavonoïdes :

- Flavonols: quercétine, myricétine, rutine, kaempférol,...etc.
- Flavones : apigénine, lutéoline,...etc.
- Flavanones : eriodictyol, naringine, naringénine,...etc
- Isoflavones : génistéine, daidzéine, ...etc.
- Anthocyanidines : alpha tocophérol, malvidine,...etc.

Les flavones, et les flavonols sont les plus connus grâce à leur pouvoir antioxydant élevé, et les plus divers sur le plan structural.

C) Les tannins :

Ce sont des molécules à poids moléculaire relativement élevé, ils constituent le 3ème groupe important des composés phénoliques. Les tannins possèdent 2 sous groupes; tannins hydrolysables et tannins condensés [86].

IV-3) Méthodes d'extraction des polyphénols :

Plusieurs méthodes existent dans la littérature pour l'extraction des composés polyphénoliques des plantes naturelles [87-90]. Parmi ces méthodes, nous citons :

a) **Extraction par solvant :** elle consiste à faire passer, par solubilisation, l'espèce chimique à extraire dans un solvant. Le solvant peut être de l'eau, mais généralement il s'agira d'un solvant organique. La solubilisation peut être effectuée par différentes méthodes en l'occurrence, l'infusion, la décoction et la macération.

Le procédé d'extraction qui est la macération, est un procédé d'extraction solide-liquide qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante pour en extraire les constituants solubles.

Les ultrasons de puissance sont maintenant bien connus pour avoir des effets significatifs sur la cinétique de certaines réactions chimiques ou encore sur la réduction du temps de procédés d'extraction industriels. En effet la cavitation induite par les ultrasons de faibles fréquences dans les milieux liquides se traduit entre autres par des accélérations de cinétique et/ou des améliorations de rendement, notamment en ce qui concerne l'extraction solide-liquide [91,92].

b) **Extraction par chromatographie sur colonne :** elle consiste à absorber sur une résine du type C₁₈ pour les polyphénols et flavonoïdes des extraits végétaux puis à éluer sélectivement les substances polyphénoliques au moyen d'éthanol ou méthanol aqueux.

c) **Extraction supercritiques (SFE) :** le CO₂ supercritique, utilisé comme solvant d'extraction, du fait de sa faible viscosité lui confère une grande capacité de diffusion lui permettant d'avoir accès à des composées phénoliques liés à la paroi cellulaire et sa densité relativement élevée lui confère un pouvoir de solvation ce qui permet un meilleur rendement d'extraction [90].

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité d'une extraction. Parmi d'autres, nous citons, la nature du solvant d'extraction, le nombre d'extractions ainsi que le volume du solvant

utilisé, le pH du milieu d'extraction, la température, la taille et la forme des particules de la matière végétale.

IV-4) Test d'activité antioxydante par la méthode du DPPH:

L'activité antiradicalaire des extraits a été évaluée en mesurant leurs capacités de piéger le radical libre DPPH• (1,1-diphényl-2-pyrril-hydrazyl). Sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (capté par les produits testés) [85], cette décoloration est mesurée par spectrophotométrie UV à 517 nm (**Figure IV-1**).

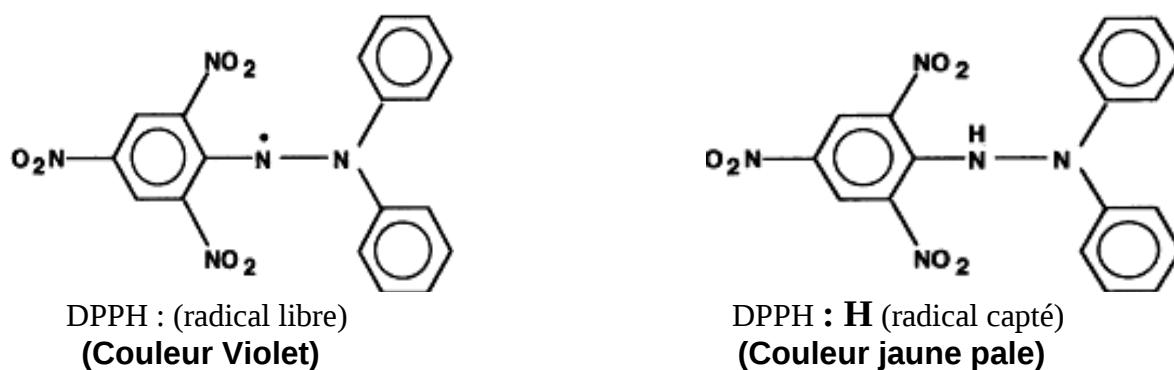


Figure IV-1: Structure du DPPH

Ainsi le DPPH représente un radical libre dont l'activité doit être supprimée par la substance antioxydante (polyphénol). L'activité antioxydante est calculée comme suit :

$$\% A = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100 \quad (\text{équation IV-1})$$

,A₀ : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A_t : absorbance en présence d'extrait.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butylhydroxytoluène), le BHA (butylhydroxyanisole) ou le Trolox (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E [85].

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective CI50 (ou l'inverse $1/CI50$) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH• dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa CI50 est petite.

IV-5) Extraction des polyphénols des feuilles d'olivier de deux variétés (Chemlal et Limli):

Les polyphénols sont extraits des feuilles d'olivier par macération d'une certaine quantité de poudre dans un solvant. Les solvants testés sont des solvants alcooliques (éthanol et méthanol) et hydro-alcooliques, méthanol-H₂O avec différentes compositions 70 :30 et 80 :20 (v/v). Le dichlorométhane a été également utilisé.

Les feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** proviennent de **M'Chedallah** (Bouira). Les échantillons séchés depuis 2 mois à l'abri de la lumière et à température ambiante (25°C) sont finement broyés dans un broyeur de cuisine (Seb), puis mis dans des bocaux hermétiques et conservés à sec (température ambiante) à l'abri de l'humidité jusqu'à leur utilisation pour l'extraction. Le broyage de la matière végétale permet d'augmenter la surface de contact solvant-échantillon, une meilleure filtration du solvant au sein du matériel végétal, ce qui à pour conséquence une augmentation du rendement de l'extraction.

Une masse de 20 grammes d'un échantillon donnée, a été mise en contact avec le solvant organique en respectant un rapport 1 :10, soit 200 ml pour 20 g de poids sec de matériel végétal, sous agitation magnétique et ceci à température ambiante pendant une durée de 5 heures. Par la suite, la macération a été poursuivie pendant 4 heures dans un bain à ultrasons (Prolabo, Sonde US, 40 à 60 kHz à température ambiante).

Tous les extraits ont été filtrés et par la suite évaporés à sec sous pression réduite en utilisant un rotavapor (Heidolph, Laborata 4001). La température d'évaporation est de 45°C pour les différents solvants utilisés, afin d'éviter la dégradation des polyphénols. Les extraits sont pesés pour calculer les rendements et puis conservés dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'analyse par spectrophotométrie UV-visible.

Les rendements des différents extraits des feuilles d'olivier reportés dans le **Tableau IV-1**.

Tableau IV-1 : Rendements (%) des extraits de feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** et de la variété **Limli**.

Solvant utilisé	Masse Initiale (g)	Masse de l'extrait (g)	Aspect de l'extrait	Rendement (%)
<u>Variété de feuille d'olivier</u>				
<u>Chemlal</u>				
✓ Dichlorométhane	20,00	0,52	Vert pâteux	2,60
✓ Ethanol	48,40	3,20	Vert pâteux	6,61
✓ Méthanol	20,00	5,00	Vert pâteux	25,00
✓ Méthanol : H ₂ O (80 :20)	20,00	0,79	Marron Pâteux	3,95
✓ Méthanol :H ₂ O (70 :30)	20,00	0,87	Marron Pâteux	4,35
<u>Variété de feuilles d'olivier</u>				
<u>Limli</u>				
✓ Ethanol	20,00	2,90	Vert pâteux	14,50
✓ Méthanol	20,00	4,33	Vert pâteux	21,65

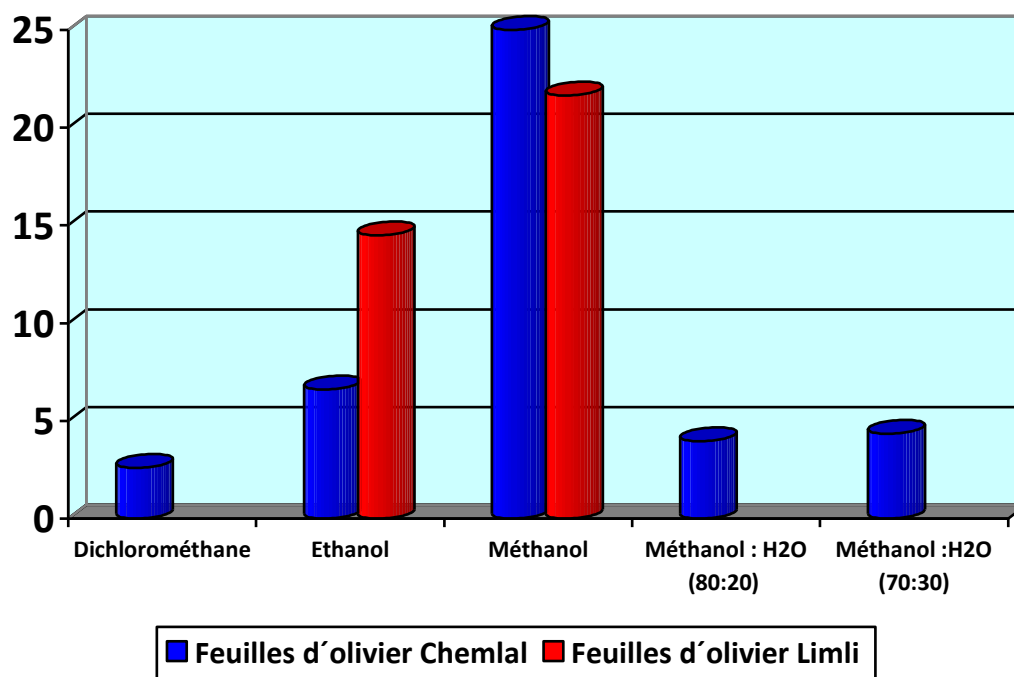


Figure IV-2: Rendements (%) des extraits de feuilles d'olivier de la variété **Chemlal** et de la variété **Limli**.

Les résultats représentés sur la **Figure IV-2** montrent que :

Les rendements des extraits méthanoliques sont incontestablement plus élevés que les rendements obtenus pour les extraits éthanoliques et ceci pour les deux variétés de feuilles d'olivier **Chemlal** et **Limli**. Le rendement le plus élevé est celui de l'extrait méthanolique **Chemlal** (25,00%).

En ce qui concerne les feuilles d'olivier **Chemlal**, le rendement de l'extrait méthanolique (25,00%) est 4 fois plus élevé que celui de l'extrait éthanolique (6,61%). Le rendement le plus faible a été obtenu pour l'extrait dichlorométhanique (2,60%).

Cependant, les extraits hydro-alcooliques méthanol : H₂O (80 :20) et méthanol : H₂O (70 :30) ont donnés des rendements faibles, 3,95% et 4,35% respectivement.

Dans ce qui suit, nous évaluerons l'activité antioxydante de ces différents extraits.

IV-6) Evaluation de l'activité antioxydante des feuilles d'olivier de deux variétés (Chemlal et Limli) par la méthode du DPPH :

a) Préparation des solutions mères d'échantillons :

Les échantillons des extraits polyphénoliques des feuilles d'olivier ont été préparés par dissolution dans le méthanol à raison de 10 mg ou 40 mg dans 100 mL de méthanol absolu (400 mg.L⁻¹ ou 100 mg.L⁻¹). Ces solutions, dites solutions mères, ont subis ensuite des dilutions pour avoir des solutions avec des concentrations inférieures à celle de la concentration de la solution mère.

b) Préparation de la solution de témoin positif :

Les résultats de l'activité antioxydante sont toujours comparés par rapport à un ou plusieurs témoins positifs. Ces témoins positifs sont souvent des antioxydants de synthèse. Parmi les antioxydants les plus couramment utilisés est le BHT (Buthylhydroxytoluène).

Nous avons utilisé la même méthode pour préparer la solution de témoin positif. En effet, nous avons pris une masse de 40 mg dans 100 ml de méthanol absolu pour la solution mère. A partir de cette solution, nous avons préparé des solutions diluées.

c) Préparation de la solution de DPPH :

La solution de DPPH est obtenue en dissolvant 0,0024 g de la poudre dans 100 mL de méthanol absolu (une solution de 60 µM de DPPH). Pour un échantillon donné et une concentration donnée, nous avons procédé pour étudier l'activité antioxydante comme suit :

Nous avons prélevé 975 µL de la solution préparée de DPPH et nous avons mesuré son absorbance (A_o). Puis, nous lui avons ajouté 25 µL de la solution d'un échantillon donné. Nous avons laissé le mélange incuber pendant 30 minutes à l'obscurité, après nous avons mesuré son absorbance (A_t). L'absorbance a été mesurée à 517 nm contre le blanc et ceci en utilisant un spectrophotomètre (UV-visible) (OPTIZEM 3220 UV), piloté par un système informatique. Les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentages d'inhibition en

utilisant l'équation **IV-1**. Nous notons que, nous avons effectué trois essais pour chaque extrait.

IV-6-a) Résultats et discussion :

A partir des absorbances obtenues par spectrophotométrie UV, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition de la réduction du DPPH par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé antioxydant en utilisant la formule donnée auparavant (équation **IV-1**).

Les résultats sont regroupés dans le **Tableau IV-2** pour les 5 extraits de feuilles d'olivier de la variété Chemlal et le BHT, et dans le **Tableau IV-3** pour les 2 extraits de feuilles d'olivier de la variété Limli. Les résultats sont donnés avec leurs écart-types.

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait, nous a permis de déterminer la CI50 pour chaque extrait (autrement appelée EC50, concentration correspondant à 50% d'inhibition et qui constitue l'activité antioxydante de l'extrait). Les graphiques correspondant aux 7 extraits polyphénoliques des feuilles d'olivier Chemlal et Limli ainsi que celui de l'antioxydant de synthèse de référence (BHT) sont reportés sur les **Figures IV-3** et **IV-4**. Nous notons que, le BHT (E321) est utilisé dans l'industrie alimentaire.

Les valeurs des CI50 sont données dans le **Tableau IV-4**. Nous notons que, pour la détermination des CI50, la corrélation entre l'activité antioxydante et la concentration des échantillons a été réalisée par une régression linéaire.

Il ressort de l'ensemble des résultats que :

- Tous les extraits de feuilles d'olivier étudiés ont manifesté une activité antioxydante, mais d'importance différente. L'activité antioxydante des 7 extraits de FO est proportionnelle à la concentration de chaque extrait. En effet, pour un extrait donné, une augmentation de la concentration de l'extrait entraîne une augmentation de l'activité antioxydante (**Tableaux IV-2** et **IV-3**).

- Concernant la variété d'olivier Chemlal, les extraits méthanolique, éthanolique et hydro-méthanolique (80 :20 v/v et 70 :30 v/v) ont manifesté une activité antioxydante meilleure que celle de l'extrait dichlorométhanique. Ce dernier a donné une activité antioxydante la plus faible qui correspond à une CI50 la plus élevée (116,88 mg.L⁻¹) (**Figure IV-5**). Ce solvant paraît donc inadéquat à l'extraction des polyphénols des feuilles d'olivier.

Tableau IV-2: Activité du piégeage (%) du radical DPPH de 5 extraits de feuilles d'olivier de la variété Chemlal comparé à celle du BHT.

Extraits de Feuilles d'olivier de la variété Chemlal						
C (mg.L ⁻¹)	Dichlorométhane	Méthanol	Méthanol : H ₂ O (80 :20)	Ethanol	Méthanol:H ₂ O (70 :30)	BHT
0,1	1,42 ± (1,00)	3,40 ± (0,20)	3,47 ± (2,71)	--	--	--
0,5	2,28 ± (0,09)	4,34 ± (0,21)	7,13 ± (0,48)	--	--	11,46 ± (1,08)
2	3,20 ± (0,52)	8,68 ± (0,37)	7,19 ± (0,52)	--	--	27,07 ± (4,59)
5	2,66 ± (0,94)	14,23 ± (0,80)	20,56 ± (4,28)	34,21 ± (0,90)	7,15 ± (0,62)	53,16 ± (1,64)
10	6,89 ± (0,13)	32,59 ± (1,36)	55,79 ± (3,85)	40,50 ± (1,32)	10,88 ± (0,39)	69,74 ± (7,56)
25	10,57 ± (0,02)	39,35 ± (1,84)	77,48 ± (2,71)	--	--	73,77 ± (10,97)
50	17,07 ± (4,74)	80,13 ± (2,31)	92,44 ± (0,40)	95,55 ± (1,96)	33,01 ± (0,10)	77,59 ± (0,78)
80	34,77 ± (0,62)	95,84 ± (0,26)	94,12 ± (0,87)	--	--	91,79 ± (0,59)
100	45,43 ± (0,62)	97,72 ± (0,40)	96,27 ± (1,46)	96,97 ± (0,93)	55,82 ± (0,89)	91,58 ± (0,66)
200	--	--	--	94,98 ± (0,05)	79,38 ± (1,82)	--
300	--	--	--	93,77 ± (0,21)	89,37 ± (2,54)	--
400	--	--	--	--	91,83 ± (0,48)	--

Les valeurs de l'activité antioxydante ont été exprimées en moyenne ± écart-type, en triplicatas.

Tableau IV-3: Activité du piégeage (%) du radical DPPH de 2 extraits de feuilles d'olivier de la variété Limli comparé à celle du BHT.

Extraits de Feuilles d'olivier Limli		
Concentration (mg.L ⁻¹)	Méthanol	Ethanol
0,5	6,35 ± (0,01)	--
2	10,11 ± (0,21)	49,77 ± (0,20)
5	17,06 ± (1,48)	64,33 ± (5,81)
10	19,56 ± (5,37)	72,48 ± (1,17)
25	31,07 ± (1,09)	74,37 ± (0,04)
50	56,40 ± (1,12)	93,25 ± (1,72)
100	82,27 ± (3,52)	93,88 ± (0,95)

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type, en triplicatas.

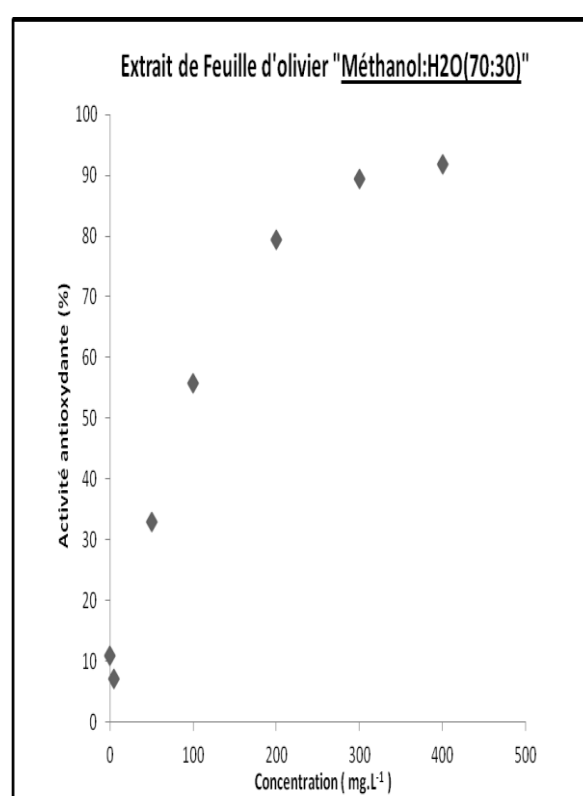
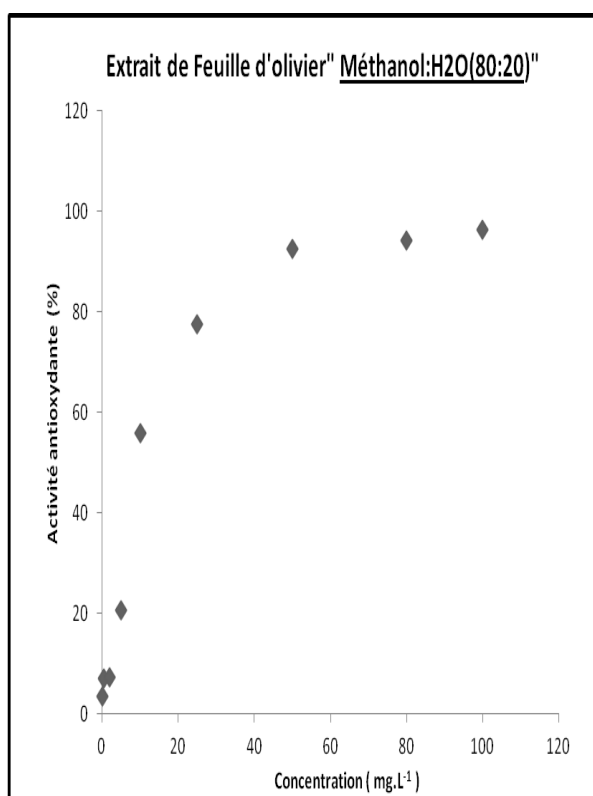
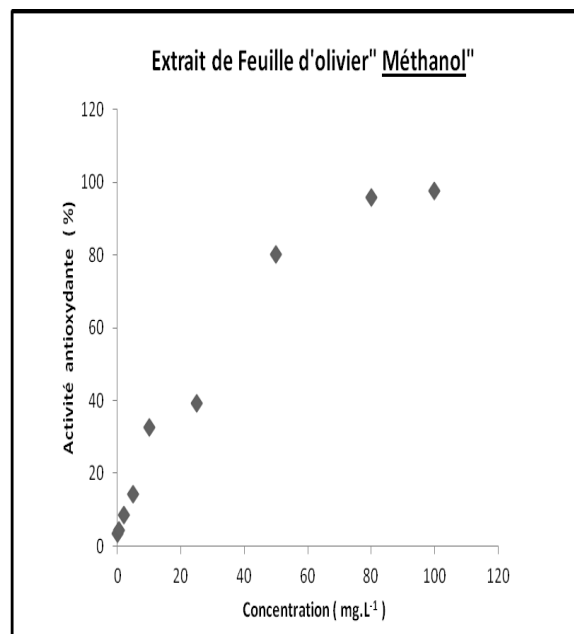
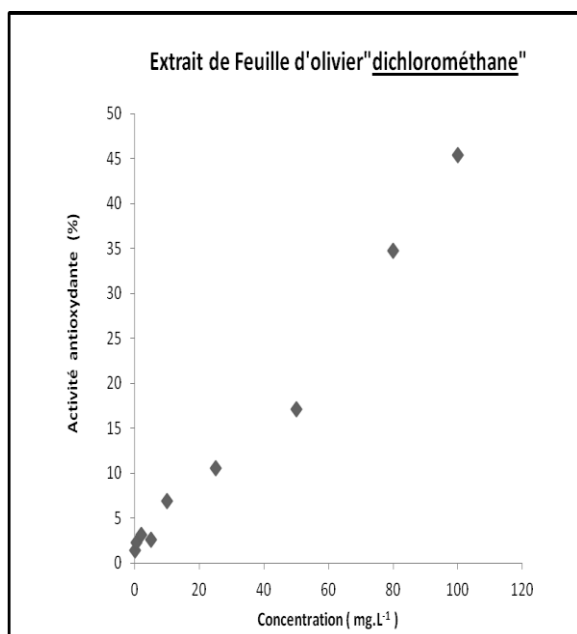


Figure IV-3 : Activité anti-radicalaire (test DPPH) en fonction de la concentration (mg.L⁻¹) des différents extraits de feuilles d'olivier de la variété Chemlal et du BHT.

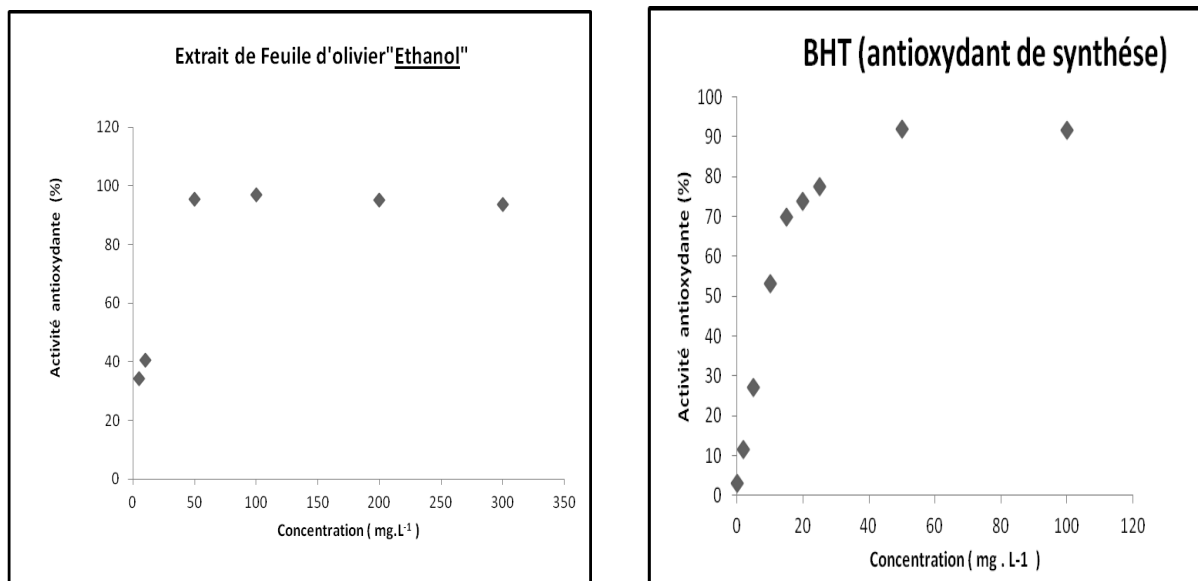


Figure IV-3 (suite): Activité anti-radicalaire (test DPPH) en fonction de la concentration (mg.L⁻¹) des différents extraits de feuilles d'olivier de la variété Chemlal et du BHT.

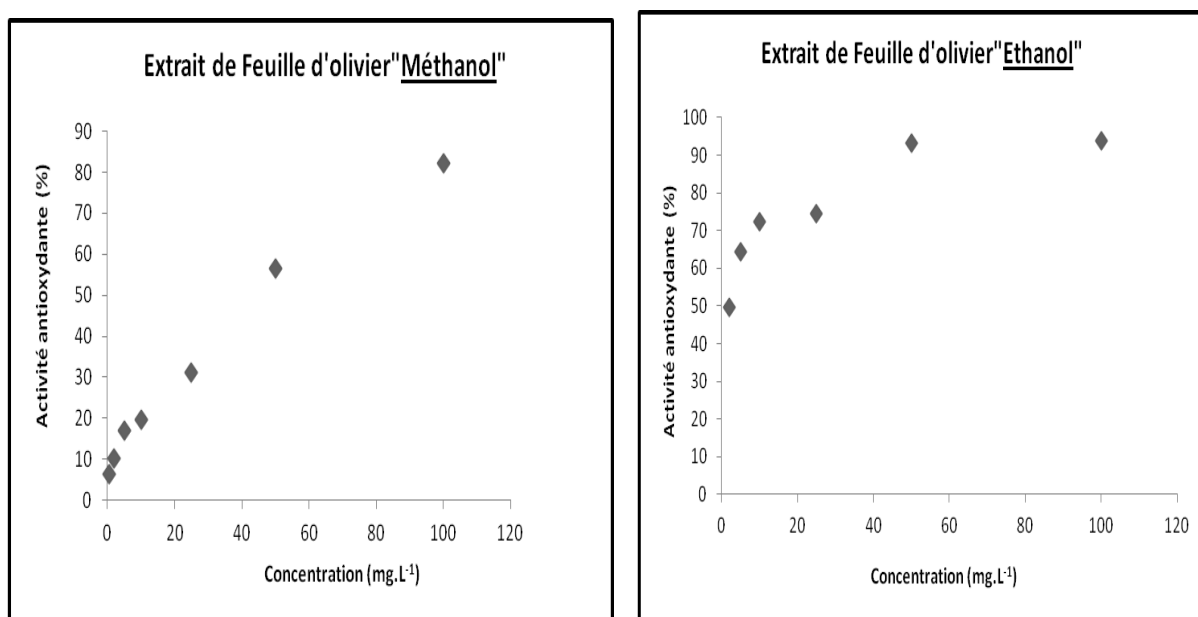


Figure IV-4: Activité anti-radicalaire (test DPPH) en fonction de la concentration (mg.L⁻¹) des différents extraits de feuilles d'olivier de la variété Limli.

Tableau IV-4: Les valeurs des CI50 (concentration inhibitrice de 50 %) de 7 extraits de feuilles d'olivier de deux variétés Chemlal et Limli.

Extrait	Feuilles d'olivier Chemlal CI50	Feuilles d'olivier Limli CI50
- Dichlorométhane	116,88 ± (0,83)	--
- Ethanol	16,96 ± (1,75)	1,18 ± (1,41)
- Méthanol	29,45 ± (0,60)	43,46 ± (1,50)
- Méthanol : H ₂ O (80 :20)	9,55 ± (1,30)	--
- Méthanol : H ₂ O (70 :30)	87,28 ± (0,83)	--
- BHT	10,14 ± (2,99)	

Les valeurs des CI50 sont exprimées en mg.L⁻¹ (moyenne ± écart-type, en triplicatas).

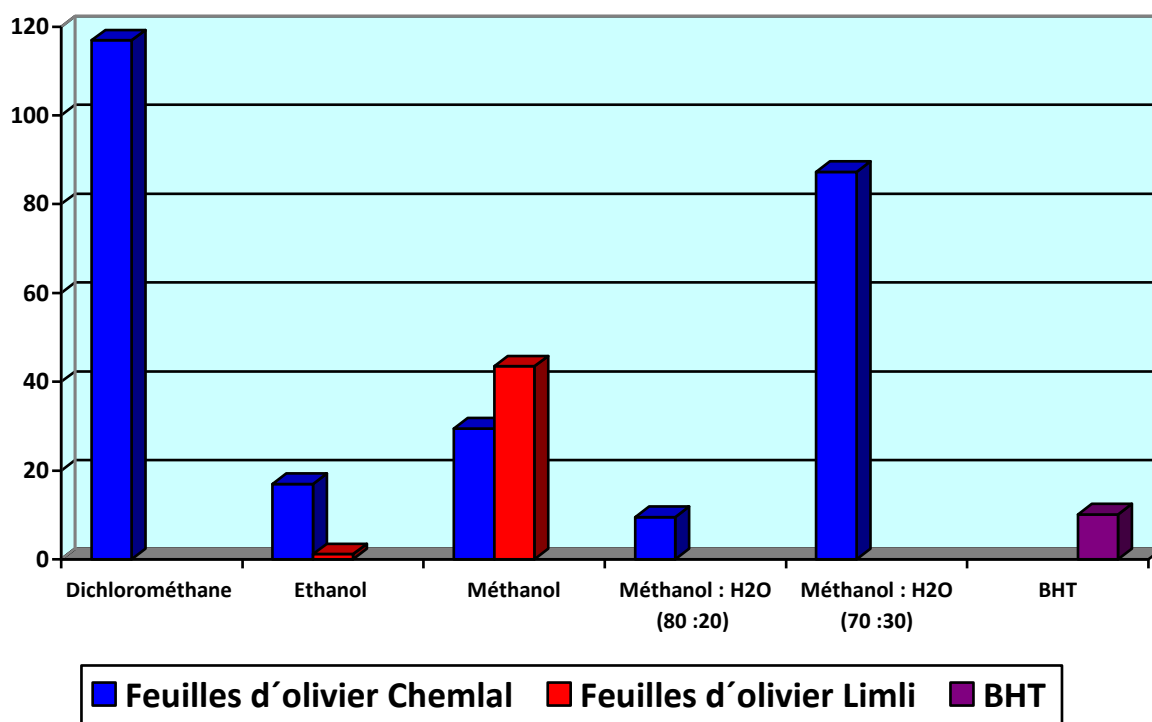


Figure IV-5: Concentration inhibitrice de 50% (CI50 en mg.L⁻¹) des extraits de feuilles d'olivier Chemlal et Limli comparé à celle du BHT.

- Pour les feuilles d'olivier **Chemlal**, les extraits méthanolique, éthanolique et hydro-méthanolique méthanol-H₂O (80:20 v/v) sont plus actifs que l'extrait méthanol-H₂O (70:30). Globalement, pour les feuilles d'olivier de la variété **Chemlal**, les valeurs des CI50 (correspond à une inhibition de 50% de l'activité du radical libre DPPH) suivent l'ordre suivant :

CI50 de l'extrait Méthanol-H₂O (80 :20) > CI50 de l'antioxydant de synthèse BHT > CI50 de l'extrait éthanolique > CI50 de l'extrait méthanolique > CI50 de l'extrait hydro-méthanolique méthanol-H₂O (70 :30) > CI50 de l'extrait dichlorométhanique.

La valeur de CI50 de l'extrait méthanol-H₂O (80 :20) est la plus faible (9,55 mg.L⁻¹), c'est-à-dire que, cette composition du solvant hydro-méthanolique 80 :20 a permis d'extraire le plus de composés polyphénoliques des feuilles d'olivier comparativement aux différents autres solvants testés dans cette étude. De plus, cet extrait est légèrement plus actif que l'antioxydant de synthèse le BHT qui a donné une CI50 de 10,14 mg.L⁻¹.

- Concernant la variété d'olivier Limli, on observe que, pour l'extrait éthanolique (1,18 mg.L⁻¹), l'activité de piégeage du radical DPPH est nettement plus importante que celle relevée pour l'extrait méthanolique (43,46 mg.L⁻¹). En effet l'extrait éthanolique est 8 fois plus actif que l'antioxydant synthétique de référence le BHT.

Les valeurs des CI50 des extraits éthanoliques pour les deux variétés de FO **Chemlal** et **Limli** et celui de l'extrait hydro-méthanolique 80 :20 pour la variété **Chemlal** montrent que ces derniers sont les plus riches en antioxydants susceptibles d'être utilisés dans la lutte contre les radicaux libres.

Cette activité est certainement due à une conjugaison de plusieurs principes actifs qui agissent en synergie, tels que, les sécoiridoïdes, est principalement le composé actif des feuilles d'olivier l'oleuropeine et l'hydroxytyrosol [93-94].

De ce fait, dans le futur, nous visons à la caractérisation qualitative et quantitative par HPLC-MS des principes actifs contenus dans les 7 extraits polyphénoliques de feuilles d'olivier Chemlal et Limli étudiés dans ce travail.

IV-7) Conclusion :

Cette étude a révèlè la richesse des feuilles d'olivier des deux variétés **Chemlal** et **Limli** en composés polyphénoliques connus pour leurs propriétés biologiques et thérapeutiques intéressantes.

Les valeurs des CI50 obtenues en utilisant le test de DPPH des extraits éthanoliques pour les deux variétés de Feuilles d'olivier **Chemlal** (16,96 mg.L⁻¹) et **Limli** (1,18 mg.L⁻¹) et celui de l'extrait hydro-méthanolique (80 :20 v/v) pour la variété Chemlal (9,55 mg.L⁻¹) montrent que ces derniers sont les plus riches en antioxydants susceptibles d'être utilisés dans la lutte contre les radicaux libres.

Nous signalons que, dans cette étude, l'extrait hydrométhanolique méthanol-H₂O (80 :20) de la variété **Chemlal** et l'extrait éthanolique de variété **Limli** ont révélé une activité antioxydante plus élevée que celle de l'antioxydant de synthèse le BHT (10,14 mg.L⁻¹).

De ce fait, dans le futur, nous visons à la caractérisation qualitative et quantitative par HPLC-MS des principes actifs contenus dans les 7 extraits polyphénoliques de feuilles d'olivier **Chemlal** et **Limli** étudiés dans ce travail.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE:

Dans le cadre de la valorisation des produits naturels nationaux, nous nous sommes intéressés dans ce travail à deux plantes aromatiques et médicinales poussant en Algérie, principalement aux feuilles d'olivier et également à la sauge officinale.

- La première partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la composition chimique par GC-FID et GC-MS-EI sur une colonne apolaire HP5MS de deux extraits volatils de feuilles d'olivier (FO) de la variété **Chemlal** (FO1 et FO2) de la région de Tizi ouzou. Les extraits ont été récupérés par hydrodistillation. Ainsi, 33 composés au total ont été identifiés dans les extraits de FO. L'extrait FO1 a été caractérisé par les composés majoritaires le Theaspirane B (23,13%), le (E)-hex-2-énal (20,35%), le Theaspirane A (19,34%), le Benzyl alcool (13,93%) et le Nonanal (9,64%). L'extrait FO2 a été caractérisé par les composés majoritaires le Theaspirane B (29,46%), le Theaspirane A (23,74%), le β -Damascenone (21,43%) et le Cis- α -Bergamotène (6,57%).

- L'étude semi-quantitative a montré que l'extrait FO1 est riche en oxydes (42,47%), en aldéhydes (31,46%), en alcools (16,65%) et en composés cétoniques (8,45%). Les esters (0,43%) ainsi que les composés hydrocarbonés (sesquiterpènes 0,32 %) sont en faibles concentration. Pour l'extrait FO2, le taux d'aldéhydes (4,72%) et d'alcools (3,06%) est faible, par contre, la teneur des oxydes (54,53%), des cétones (23,64%) et des sesquiterpènes est importante.

Nous tenons à signaler que, il n'existe aucune référence bibliographique concernant le profil chimique des extraits volatils des FO poussant en Algérie. De ce fait, dans le cadre de ce travail, et pour la première fois (à notre connaissance), une tentative d'extraction et d'identification des volatils des FO de la variété **Chemlal** a été proposée.

La deuxième partie a été consacrée à une étude qualitative et semi-quantitative de 3 huiles essentielles de sauge officinale de la région de Blida. Nous avons utilisé deux procédés d'extraction : l'hydrodistillation classique (HD) et l'hydrodistillation assistée par chauffage micro-ondes (HD-MO). Nous avons également étudié l'influence de l'humidité initiale du matériel végétal (sauge fraîche HD et sauge sèche HD) sur la variation de la composition chimique. Les analyses chromatographiques ont été réalisées par GC-FID et GC-MS-EI et ceci sur deux colonnes de polarités différentes (HP5MS et HPWAX).

- L'extraction de la sauge fraîche par une HD-MO est 6 fois plus rapide que l'extraction de la sauge fraîche par HD (30 minutes contre 3 heures) avec un rendement 3 fois plus élevé (0,79% contre 0,25%).

- L'analyse des 3 essences de sauge a fait ressortir que l'essence de sauge fraîche extraite par HD présente le plus grand nombre de composés (37-47) comparativement à la sauge fraîche extraite par HD-MO (28-37 composés) et seulement (10-14) pour la sauge sèche HD.

- Le composé majoritaire recensé dans la sauge fraîche HD est l' α -Thujone avec une teneur de 18,42%, puis le Camphre (16,23%) et le 1,8-Cinéole (12,44%). Par contre, dans l'essence de sauge HD-MO et la sauge sèche le composé majoritaire est le Camphre avec une teneur de 25,71% et 39,58% respectivement. Le 1,8-Cinéole, et l' α -Thujone ont une teneur notable dans la sauge sèche et la sauge fraîche HD-MO.

- L'utilisation de la sauge sèche et les radiations électromagnétiques des micro-ondes pour extraire les essences de sauge donnent des teneurs les plus élevées en cétones et en oxydes (composés oxygénés). Les monoterpènes et les sesquiterpènes (composés hydrocarbonés) ainsi que les alcools sont plus importants pour l'HD en utilisant un matériel végétal frais.

Dans la troisième partie, nous avons évalué l'activité antioxydante par la réactivité avec le radical libre DPPH par spectrophotométrie UV-Visible de 7 extraits alcooliques et hydroalcooliques de deux variétés de FO (**Chemlal** et **Limli**).

- Les valeurs des CI50 obtenues pour les extraits éthanoliques concernant les deux variétés de feuilles d'olivier Chemlal (16,96 mg.L⁻¹) et Limli (1,18 mg.L⁻¹) et celui de l'extrait hydrométhanolique (80 :20 v/v) pour la variété Chemlal (9,55 mg.L⁻¹) montrent que ces derniers sont les plus riches en antioxydants susceptibles d'être utilisés dans la lutte contre les radicaux libres. L'extrait hydrométhanolique méthanol-H₂O (80 :20) de la variété Chemlal et l'extrait éthanolique de la variété Limli ont révélé une activité antioxydante plus élevée que celle de l'antioxydant de synthèse le BHT (10,14 mg.L⁻¹).

Cette étude a révélé la richesse des FO des deux variétés **Chemlal** et **Limli** en composés polyphénoliques connus pour leurs propriétés biologiques et thérapeutiques intéressantes. En perspective, nous visons à réaliser une étude qualitative et quantitative par HPLC-MS des principes actifs contenus dans les 7 extraits polyphénoliques de FO **Chemlal** et **Limli** étudiés.

Bibliographie

Références Bibliographiques:

- [1] AFNOR. Association Française de Normalisation. Normes Françaises : huiles essentielles. Ed. AFNOR, (2000), Paris.
- [2] J. Bruneton, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, édition Lavoisier, Illinois, USA (1993).
- [3] A. Baalionamer, Thèse de Doctorat Es-science, Faculté de Chimie, U.S.T.H.B, (1987).
- [4] Normes AFNOR; Recueil des Normes Francaises. Huiles essentielles, Paris, (1992).
- [5] M. Warnod, Perfumer et Flavorist, 9, 93-104, (1984).
- [6] J.F. Clevenger, J. Am. Pharm. Ass., 17, 345, (1928).
- [7] A. Loupy, Microwaves in organic synthesis, 2 ème edition, Tome I et II, Wiley-VCH, (2006).
- [8] F. Chemat, M. Vian, F. Visioni, Microwave hydroffusion for isolation of natural products. Brevet Européen, EP 1955749A1, (2008).
- [9] [72] J. Tranchant, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Ed Masson Paris (1995).
- [10] http://Fr. Wikipedia.org/wiki/olea_europaea.
- [11] G. Rossini, « Mémoires de l'olivier », (1999), Ed, Équinoxe.
- [12] R. A. Flath, R. R. Forrey, D. G. Guadagni, J. Agric. Food Chem., 21, 948-952, (1973).
- [13] A. K. Kiritsakis, J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 673-681, (1998).
- [14] A. Kubo, C. S. Lunde, I. Kubo, J. Agric. Food Chem., 43, 1629-1633, (1995)..
- [15] J. Reiners, W. Grosch, Food Chem., 64, 45-47, (1999).
- [16] F. Angerosa, R. Mostallino, C. Basti, R. Vito, Food Chem., 68, 283-287, (2000).
- [17] O. Koprivnjak, G. Procida, T. Zelinotti, Food Chem., 70, 377-384, (2000).
- [18] F. Angerosa, R. Mostallino, C. Basti, Food Chem., 72, 19-28, (2001).
- [19] F. Angerosa, C. Basti, R. Vito, B. Lanza, Food Chem., 67, 295-299, (1999).
- [20] J. M. Olías, A. G. Pe´rez, J. J. Rios, L. C. Sanz, J. Agric. Food Chem., 41, 2368-2373, (1993).
- [21] A. Ranalli, G. Modesti, M. Patumi, G. Fontanazza, Food Chem., 69, 37-46, (2000).
- [22] M. Williams, M. T. Morales, R. Aparicio, J. L. Harwood, Phytochemistry, 47, 1253-1259, (1998).
- [23] R. A. Flath, R. R. Forrey, D. G. Guadagni, J. Agric. Food Chem., 21, 948-952, (1973).
- [24] R. Bortolomeazzi, P. Berno, L. Pizzale, L. S. Conte, J. Agric. Food Chem., 49, 3278-3283, (2001).

- [25] Y. Ouni, G. Flamini, M. Issaoui, N. Ben Youssef, P. L. Cioni, M. Hammami, D. Daoud, M. Zarrouk, *Food Chem.*, 124, 1770-1776, (2011).
- [26] M. Issaoui, G. Flamini, F. Brahmi, S. Dabbou, K. Ben Hassine, A. Taamali, H. Chehab, M. Ellouz, M. Zarrouk, M. Hammami, *Food Chem.*, 119, 220-225, (2010).
- [27] E. Campeol, G. Flamini, S. Chericoni, S. Catalano, R. Cremonini, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5409-5411, (2001).
- [28] E. Campeol, G. Flamini, S. Chericoni, S. Catalano, R. Cremonini, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1994-1999, (2003).
- [29] G. Flamini, P.L. Cioni, I. Morelli, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1382-1386, (2003).
- [30] F. Brahmi, G. Flamini, M. Issaoui, M. Dhibi, S. Dabbou, M. Mastouri, M. Hammami, *Med Chem Res*, online depuis Octobre (2011), DOI 10.1007/s00044-011-9817-8.
- [31] E. Haloui, Z. Marzouk, B. Marzouk, I. Bouftira, A. Bouraoui et N. Fnina, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, Vol.8 (2), 204-208, (2010).
- [32] k. kiritsakis, M.G. Kontominas, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, A. Moustakas A. Kiritsakis, *J Am Oil Chem Soc*, 87, 369-376 (2010).
- [33] A. De Leonardis, A. Aretini, G. Alfano, V. Macciola, G. Ranalli, *Eur Food Res Technol*, 226 (4), 653, (2008).
- [34] N. Allouche, I.Fki, S. Sayadi, *J. Agric. Food Chem*, 52 (2), 267-273,(2004).
- [35] W.Zheng, S. Y. Wang, *J Agric Food Chem*, 49, 5165, (2001).
- [36] E. Susalit, N. Agus, I. Effendi, R. Raymond Tjandrawinata, D. Nofiarny, T. Perrinjaquet-Moccetti, M. Verbruggen, *Phytomedicine*, 18 (4), 251-258, (2011).
- [37] A. Zarzuelo, J. Duarte, J. Jimenez, M. Gonzales, *Planta Med*, 57, 417-419, (1991).
- [38] K. Hansen, A. Adsersen, B.S. Christensen, S. Broeegger, J.S.Rosendal, U. Nyman, U. Wagner Smitt, *Phytomedicine*, 2, 319-332, (1996).
- [39] M. Gonzalez, A. Zarzuelo, M.J. Gamez, M.P. Utrilla, J. Jimenez, I. Osuna, *Planta Med*, 58, 513–515, (1992).
- [40] A. Kubo, C.S. Lunde, I. Kubo, *J Agric Food Chem*, 43, 1629–1633, (1995).
- [41] S. Mylonaki, E. Kiassos, D. P. Makris, P. Kefalas, *Anal. Bioanal. Chem.*, 392, 977–985, (2008).
- [42] H. P. Fleming, W. H. J. Walter, J. L. Etchells, *Appl. Microbiol.*, 26, 777-782, (1973).
- [43] H. Gourama, B. Letutour, A. Tantaoui Elaraki, M. Benbya, L. B. Bullerman, *J. Food Protect.*, 52, 264-266, (1989).
- [44] B. Juven, Y. Henis, *J. Appl. Bacteriol.*, 33, 721-732, (1970).

- [45] S. McDonald, P. D. Prenzler, M. Antolovich, K. Robards, *Food Chem.*, 73, 73-84, (2001).
- [46] http://Fr.wikipedia.org/wiki/sauge_officinale.
- [47] M. S. Karawya, S. El Hawary, *J. Pharm. Sci.*, 19, 301, (1981).
- [48] A. Bianchi. A .Sereri. A. Albasini. P. Pecorari, M. Melegari, *ATTI Soc. Nat. Mat. Modena*, 118, 1, (1987).
- [49] A. Belkamel. S. Drouet, M. Rouzet, *Rev. Mar. Pharmacol.*, 4, 7, (1990).
- [50] E. Putievsky, U. Ravid, D. Sanderovich, *J. Essent. Oil Res.*, 4, 291, (1992).
- [51] R. Piccaglia, M. Marotti, *Flav. Fragr. J.*, 8 , 115, (1993).
- [52] E. Tsankova. A .N. Konkchiev, E M. Genova, *J. Essent. Oil Res.*, 6, 375, (1994).
- [53] L. Place, R. Piccaglia, *J. Essent. Oil Res.*, 7, 443, (1995).
- [54] N. B. Perry, A. J. Baxter, N. J. Brennan, J. W. Van Klein, *Flav. Fragr. J.*, 11, 213, (1996).
- [55] R. R. Vera, J. Chane-Ming, D. J. Fraisse, *J. Essent. Oil Res.*, 11(4), 399-402, (1999).
- [56] U. Asllani, *J. Essent. Oil Res.*, 12(1), 79-84, (2000).
- [57] J. A. Pino, J. Aguero, V. Fuentes, *J. Essent. Oil Res.*, 14(5), 373-374, (2002).
- [58] D. Lorenzo, D. Paz, P. Davies, J. Villamil, R. Vila, S. Caniguer, E. Dellacassa, *Flav. Fragr. J.*, 19(4), 303-307, (2004).
- [59] C. F. Lima, F. Carvalho, E. Fernades, M. L. Bastos, P. C. Santos-Gomes, M. Fernandes-Ferreira, C. Pereira-Wilson, *Toxicol. in Vitro.*, 18(4), 457–465, (2004).
- [60] S. Fellah, M. Romdhane, M. Abderraba, *J. Soc. Alger. Chim.*, 16 (2), 193-202, (2006).
- [61] T. Dob, T. Berramdane, D. Dahmane, T. Benabdelkader, C. Chelgoum, *Chem. Nat. Compd.*, 43(4), 491, (2007).
- [62] M. Viuda-Martos, Y. Ruíz-Navajas, J. Fernández-López, J. A. Pérez-Álvarez, *Acta Chim. Slov.*, 54, 921–926, (2007).
- [63] J.C.Chalchat, A. Michet, and B. Pasquier, *Flav. Fragr. J.*, 13, 68 (1998).
- [64] M. H. Mirjalili, P. Saheli, A. Sonboli, M.M. Valer, *Chem. Nat. Compd.*, 42, 19, (2006).
- [65] Y. Bakkour, S. Kassir, D. Kanj, F. El Omar, Y. Mouneimne, *J. Nat. Prod.*, (4), 51-56, (2011).
- [66] D. Mockutė, O. Nivinskienė, G. Bernotienė, R. Butkienė, *Chemija (vilnius)*, 14(4), 216, (2003).
- [67] S. Velickovic, M.S. Ristic, D.T. Velickovic, S.N. Ilic, N.D. Mitic, *J. Serb. Chem. Soc.*, 68, 435, (2003).
- [68] A.P.L. Delmare, I.T. Moschem-Pistorello, L.A. Atti-Serafini, S. Echeverrigaray, *Food Chem.*, 100, 603, (2007).

- [69] Z. Djarmati, R.M. Jankov, E. Schwirtiich, B. Djuinac, A. Djordjevic, *JAOCs*, 68, 731, (1991).
- [70] I. Hamrouni-Sellami, I. Bettaieb-Rebey, J. Sriti, F.Z. Rahali, F. Limam, B. Marzouk, *Food Bioprocess Technol.*, online: 6 Août 2011 (DOI 10.1007/s11947-011-0661-0).
- [71] E. Kovàts, *Helv. Chim. Acta.*, 41, 1915-1932, (1958).
- [72] A. T. James, A.J.P. Martin, *Biochem. J.*, 50, 679, (1952).
- [73] E. Kovàts, *Advan. Chromatogr.*, 1, 229-247, (1965).
- [74] H. Van Den Dool, P. D. Kratz, *J. Chromatogr.*, 11, 463-471, (1963).
- [75] R.P. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy*. Allured, Carol Stream, (1995).
- [76] W.Jennings, T. Shibamota, *Quantitative analysis of flavor and fragrance volatiles by Glass Capillary Chromatography*. Academic Press, New York, (1980).
- [77] N.W. Davies, *J Chromatogr.*, 503, 1–24, (1990).
- [78] A.A. Swigar, R.M. Silvestein, In *monoterpenes*. Aldrich Chemical Company, Milwaukee, (1981).
- [79] Y. Massada, In *analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry*. Wiley, New York, (1976).
- [80] A. K. Atoui, A. Mansouri, G. Boskou, P. Kefalas, *Food Chem.*, 89(1), 27–36, (2005).
- [81] W. Rached, H. Benamar, M. Bennaceur, A. Marouf, *J. Biol. Sci.*, 10 (4), 316-324, (2010).
- [82] J.M. Ricardo da Silva, N. Darmon, Y. Fernandez, S. Mitjavila, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 549-1552, (1991).
- [83] I. F. Benzie, J. Strain, *Anal. Biochem.*, 239, 70-76, (1996).
- [84] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice- Evans, *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237, (1999).
- [85] M.S. Blois, *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. *Nature*, 181, 1199–1200, (1958).
- [86] C. Sanchez-Moreno, *Food Sci Technol Int*, 8 (3), 121-137, (2002).
- [87] Fr. Marc, A. Davin, L. Deglene-Benbrahim., C. Ferrand, *Med. Sci.*, 20(4), 458-463, (2004).
- [88] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856, (2005).
- [89] V.Y. Yvonne, E.B. Dawn, F.C. Meshell, *Food Chem.*, 91, 485–494, (2005).
- [90] P. Molyneux, *J Sci. Technol.*, 26, 211–219, (2004)

- [91] R. Japon-Lujan, J.M. Luque-Rodriguez, M.D. Luque de Castro, *J.Chromatogr. A*, 1108, 76–82, (2006)
- [92] M. D. Esclapez, J. V. García-Pérez, A. Mulet et J. A. Cárcel, *Food Eng Rev*, 3, 108-120, (2011).
- [93] O. Benavente-Garcia, J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuno, J. A. Del Rio, *Food Chem.*, 68, 457–462, (2000).
- [94] M. Bouaziz, I. Fki, H. Jemai, M. Ayadi, S. Sayadi, *Food Chem.*, 108, 253, (2008).

Partie Expérimentale

Partie Expérimentale :

Tableau I : Conditions opératoires des analyses **GC-FID**.

Paramètres	
Chromatographe en phase gazeuse :	Hewlett Packard (HP 6890)
Détecteur :	Ionisation de Flamme (FID)
Colonne capillaire	Apolaire HP5 MS
Longueur	30 m
Diamètre interne	0,25 mm
Epaisseur de phase stationnaire	0,25 μm
Programmation du four	4 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ de 60 $^{\circ}\text{C}$ à 250 $^{\circ}\text{C}$ 8 min à 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 min à 250 $^{\circ}\text{C}$
Gaz vecteur:	Helium
Débit du gaz vecteur:	0,4 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$
Température de l'injecteur :	250 $^{\circ}\text{C}$
Température du détecteur :	300 $^{\circ}\text{C}$
Concentration des échantillons :	Pur
Quantité injectée	1 μl
Mode d'injection	Split pour les essences de sauge (1 :20) et Splitless pour les extraits volatils des feuilles d'olivier.

Tableau II : Conditions opératoires des analyses **GC-MS-EI**.

Paramètres	
Appareil :	Hewlett Packard (HP 6890)
Injecteur automatique :	Agilent 7683B
Mode de détection :	Impact électronique à balayage
Courant d'ionisation :	70 eV
Colonne capillaire	HP5 MS
Longueur	30 m
Diamètre interne	0,25 mm
Epaisseur de phase stationnaire	0,25 μm
Colonne capillaire	HPWAX
Longueur	60 m
Diamètre interne	0,25 mm
Epaisseur de phase stationnaire	0,25 μm
Programmation du four	4 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ de 60 $^{\circ}\text{C}$ à 250 $^{\circ}\text{C}$ 8 min à 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 min à 250 $^{\circ}\text{C}$
Gaz vecteur:	Helium
Débit du gaz vecteur:	0,5 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$
Température de l'interface :	280 $^{\circ}\text{C}$
Température de l'injecteur :	250 $^{\circ}\text{C}$
Concentration des échantillons :	Pur
Quantité injectée	1 μl
Mode d'injection	Split pour les essences de sauge (1 :20) et Splitless pour les extraits volatils des feuilles d'olivier.