

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Polytechnique



Département de Génie Chimique
Projet de Fin d'Etudes
pour l'obtention du diplôme
d'Ingénieur d'Etat en Génie Chimique

Thème

Hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation

Proposé et dirigé par :

Pr. S. CHARCHARI

Etudié par :

M^{lle} Dalila BOUNOUA

M^{lle} Lamia BOUMAHDI

Soutenu le 25 Juin 2013 devant le jury composé de :

Mr E.H. BENYOUSSEF

Professeur à l'ENP

Président

Mr T. AHMED ZAID

Professeur à l'ENP

Examinateur

Mme F. KIES

Docteur à l'ENP

Examinatrice

Mme S. CHARCHARI

Professeur à l'ENP

Rapporteur

Promotion : Juin 2013

Dédicaces

A ma mère, pour tous ses sacrifices, son courage et son amour,

A mon père, puisse-t-il reposer en paix,

A mon frère et à tous mes amis,

A mon très cher binôme et amie Lamia,

A tous ceux qui me sont chers,

Je dédie cet humble travail en signe d'affection et de reconnaissance.

Dalila

A mes parents, pour tout leur amour, leurs sacrifices et leur soutien,

A la mémoire de ma Mamie, puisse-t-elle reposer en paix,

A ma sœur et à mon frère,

A mes amis,

A mon très cher binôme et amie Dalila,

A tous ceux qui me sont chers,

*Je dédie ce modeste travail en signe de reconnaissance et de profonde
affection.*

Lamia

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à toutes les personnes qui nous ont aidés à l'accomplissement de notre mémoire.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Madame S. CHARCHARI, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique. Le dévouement, la patience et l'amabilité dont elle a fait preuve tout au long de la réalisation et la rédaction de ce mémoire ont été pour nous un immense soutien.

Nous tenons à remercier Monsieur E.-H. BENYOUSSEF, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury d'examen.

A Monsieur T.AHMED ZAID, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique et Madame F. KIES, Docteur à l'Ecole Nationale Polytechnique, pour avoir accepté de faire partie du jury d'examen de notre soutenance, qu'ils soient assurés de nos remerciements les plus distingués.

Nous tenons à témoigner notre reconnaissance à Monsieur A. NEHITI, technicien au Département de Génie chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique, ainsi qu'à Madame N. KASBADJI, Directrice de l'Unité de Développement des Equipements Solaires et Monsieur TASSALIT, Chercheur à l'Unité de Développement des Equipements Solaires.

Enfin, un grand Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et que nous avons peut être omis de citer.

.

*P*réambule

Cette étude a été réalisée, sous la direction du Professeur S. Charchari, au laboratoire de Valorisation des énergies fossiles, dirigé par le Professeur C. E. Chitour, dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe de Valorisation des espèces végétales, dirigée par le Professeur R. Derriche.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تأثير التخزين والمعالجة بالمواد الفعالة لنبتتي المريمية و إكليل الجبل على مردود الزيوت الأساسية التي تم الحصول عليها عن طريق التقطير بالبخار. تم تحديد تركيز المركبات الفينولية في مياه التقطير والعينات التي تم الحصول عليها عن طريق الاستخلاص في وسط قاعدي باستخدام طريقة معايرة فولين دينيس و طريقة محاصرة الجذور الحرة DPPH التي مكنتنا من تقييم القدرة المضادة للأكسدة لهؤلاء.

كلمات البحث: المريمية ، إكليل الجبل، زيوت أساسية، التقطير بالبخار، المادة الفعالة، وسط قاعدي، البوليفينول،النشاط المضاد للأكسدة.

Résumé

Cette étude porte sur l'évaluation de l'influence du stockage et du prétraitement avec tensioactif de la matière végétale, en l'occurrence, *Salvia officinalis* L. et *Rosmarinus officinalis* L. sur le rendement en huile essentielle obtenue par hydrodistillation. La détermination de la teneur en composés phénoliques des eaux de distillation et des échantillons obtenus par extraction en milieu basique a été déterminée par la méthode de dosage de Folin-Denis. La méthode du piégeage du radical libre DPPH a été utilisée pour l'évaluation du potentiel anti-radicalaire de l'huile essentielle, des eaux de distillation et des extraits des deux plantes, obtenus en milieu basique. Le potentiel antioxydant des eaux de distillation c'est révélé comparable à celui de l'acide gallique et permet d'envisager une valorisation de ce sous-produit de l'extraction de l'huile essentielle.

Mots clés : *Salvia officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., huile essentielle, hydrodistillation, tensioactif, composés phénoliques, activité anti-oxydante.

Abstract

The effect of storage and pretreatment, with surfactant, of the plant material, namely, *Salvia officinalis* L. and *Rosmarinus officinalis* L., on the essential oil yield obtained by hydrodistillation was investigated. The Folin-Denis assay was used for the determination of the total phenolic content of the distillation waters and of the samples obtained by extraction in an alkaline medium. The antiradical potential of these ones and of the essential oil was evaluated by DPPH free radical scavenging. The distillation waters antioxidant potential is comparable to that of gallic acid and allows envisaging the valorization of this by-product of the essential oil extraction.

Key words: *Salvia officinalis* L, *Rosmarinus officinalis* L, essential oil, hydrodistillation, surfactant, phenolic compounds, antioxidant activity.

Table des matières

Table des matières	V
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	IX
Introduction	1

Chapitre I. Etude bibliographique

I.1. La matière végétale.....	2
I.1.1. <i>Salvia officinalis</i> L.....	2
I.1.1.1. Description botanique.....	2
I.1.1.2. Classification botanique.....	3
I.1.1.3. Répartition géographique.....	3
I.1.1.4. Composition chimique.....	3
I.1.1.5. Structure sécrétrice de <i>Salvia officinalis</i> L.....	4
I.1.1.6. Composition de l'huile essentielle et chémotypes.....	6
I.1.2. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	8
I.1.2.1. Description botanique.....	9
I.1.2.2. Classification botanique.....	10
I.1.2.3. Répartition géographique.....	10
I.1.2.4. Composition chimique.....	11
I.1.2.5. Structure sécrétrice de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	12
I.1.2.6. Composition chimique de l'huile essentielle et chémotypes.....	14
I.2. Le procédé d'hydrodistillation.....	15
I.2.1. Principe.....	16
I.2.2. Mécanisme.....	17
I.2.3. Hydrodistillation en présence de tensioactif.....	18
I.2.3.1. Généralités sur les tensioactifs.....	18
I.2.3.2. Structure et constitution de la cuticule végétale.....	20
I.2.3.3. Action des tensioactifs sur la cuticule.....	22
I.3. Les antioxydants.....	23
I.3.1. Les radicaux libres.....	24
I.3.2. Le mécanisme d'action des antioxydants.....	24
I.3.3. Classifications des antioxydants.....	24
I.3.3.1. Les antioxydants naturels.....	24
I.3.3.2. Les antioxydants synthétiques.....	26
I.3.4. Domaines d'application des antioxydants.....	27
I.3.5. Les antioxydants de <i>Salvia officinalis</i> L. et de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L.....	27

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Matière végétale utilisée.....	30
II.1.1. Cueillette.....	30
II.1.2. Echantillonnage.....	30

II.1.3. Détermination du taux d'humidité.....	31
II.2. Appareillage et protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle.....	32
II.3. Extraction des antioxydants de <i>Salvia officinalis</i> L. et de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. en milieu basique.....	33
II.3.1.Principe.....	33
II.3.2. Dispositifs et protocole expérimental.....	34
II.4. Dosage des antioxydants.....	36
II.4.1. Mode opératoire.....	36
II.4.2. Expression des résultats du dosage.....	36
II.5. Evaluation des propriétés anti-oxydantes.....	37
II.5.1. Principe de la réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant.....	37
II.5.2. Mode opératoire.....	38
II.5.3. Détermination du pourcentage d'inhibition.....	39
II.5.4. Détermination de la concentration inhibitrice IC50.....	39
II.5.5. Détermination de l'indice d'activité anti-oxydante.....	39
II.5.6. Détermination de l'indice d'efficacité anti-radicalaire.....	40
II.6. Analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC).....	40
II.7. Réactifs utilisés.....	41

Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Influence de la durée de stockage de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle.....	42
III.2. Influence du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur le rendement en huile essentielle.....	43
III.3. Influence de la durée de stockage et du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur la teneur en composés phénoliques des eaux de distillation.....	45
III.4. Influence de la température d'extraction et du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur la teneur en composés phénoliques des extraits obtenus en milieu basique.....	49
III.5. Evaluation du potentiel antioxydant des eaux de l'hydrodistillation de <i>Salvia</i> <i>officinalis</i> L. et de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	50
III.5.1. Détermination de la concentration inhibitrice IC50.....	50
III.5.2. Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire.....	52
III.5.3. Détermination de l'indice d'efficacité anti-radicalaire.....	52
III.6. Evaluation des capacités anti-oxydantes des extraits de <i>Salvia officinalis</i> L. et de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., obtenus en milieu basique.....	54
III.7. Potentiel antioxydant des huiles essentielles.....	56
III. 8. Analyse par chromatographie en phase liquide.....	57

Conclusion.....	61
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Webographie

ANNEXE I

ANNEXE II

Liste des figures

Figure I.1 : La sauge officinale (<i>Salvia officinalis</i> L.).....	3
Figure I.2 : Coupe de la tige de <i>Salvia officinalis</i> L. (Gx80) (Charchari et al., 2010).....	4
Figure I.3 : Coupe de la tige de <i>Salvia officinalis</i> L. (Gx320). Différents types de trichomes capités (Charchari et al., 2010).....	5
Figure I.4 : Coupe de la feuille de <i>Salvia officinalis</i> L. (Gx80)Trichome pelté et poche endogène située dans le parenchyme (Charchari et al., 2010)	5
Figure I.5 : Coupe de la feuille de <i>Salvia officinalis</i> L. (Gx80) Trichome pelté et trichomecapité du type I avec une extension reliant la cellule basale à une cavité endogène (Charchari et al., 2010).....	6
Figure I. 6: Le romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	9
Figure I.7 : Micrographie lumineuse des trichomes non glandulaires de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Marin et al, 2006)	12
Figure I. 8 : Trichomes peltés de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Gr : 100 x 3.2).....	13
Figure I. 9 : Micrographie lumineuse des trichomes glandulaires capités de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Marin et al, 2006)	13
Figure I. 10 : Schéma simplifié d'une molécule de tensioactif (Stolzenberg, 1989)	199
Figure I.11 : Structure de la cuticule de la feuille foliaire (Site web [3])	21
Figure I.12 : Structure de la membrane cellulaire ou bicouche lipidique (Site web [4]).....	21
Figure I. 13 : Interaction tensioactif – bicouche lipidique et formation des micelles.....	23
Figure I. 14: Antioxydants de synthèse (Pokorny et al., 2001)	26
Figure II.1 : Echantillonnage de la matière végétale	30
Figure II.2 : Appareil de Dean et Stark.....	31
Figure II. 3 : Dispositif expérimental d'hydrodistillation à l'échelle laboratoire.....	32
Figure II.4 : Dispositif expérimental de l'extraction en milieu basique à 60°C	35
Figure II.5 : Dispositif expérimental de l'extraction en milieu basique à 100°C	35
Figure II. 6 : Structure du radical libre DPPH• (2,2 Diphenyl-1-pikryl-hydrazyle).....	37
Figure III. 1 : Hydrodistillation de <i>Salvia officinalis</i> L. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée de stockage.	42
Figure III. 2 : Hydrodistillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée de stockage.	42
Figure III. 3 : Hydrodistillation de <i>Salvia officinalis</i> L. sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA). Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction du taux d'humidité.	44

Figure III. 4 : Hydrodistillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA). Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction du taux d'humidité.	44
Figure III. 5 : Hydrodistillation de <i>Salvia officinalis</i> L. sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA). Teneurs en composés phénoliques, en mgEAG, par mL d'eau de distillation(A), par gramme de matière végétale sèche(B) et par gramme d'extrait sec(C).....	46
Figure III. 6 : Hydrodistillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA). Teneurs en composés phénoliques, en EAG, par mL d'eau de distillation(A), par gramme de matière végétale sèche(B) et par gramme d'extrait sec(C).....	47
Figure III. 7 : Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'échantillon testé.....	51
Figure III. 8 : Evolution de l'absorbance de la solution DPPH en présence de l'échantillon, en fonction du temps	51
Figure III. 9 : Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'extrait testé	54
Figure III.10 : Chromatogrammes des échantillons des eaux de distillation, issues de l'hydrodistillation <i>Salvia officinalis</i> L. sans (A) et avec (B) prétraitement par tensioactif et de l'extrait obtenu en milieu basique (C).....	58
Figure III.11 : Valeurs des IC ₅₀ , IAA et IEAR des échantillons des eaux de distillation sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA) et de l'extrait en milieu basique de <i>Salvia officinalis</i> L.	60

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Teneurs relatives, %, des constituants majoritaires de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> L. provenant de différents pays	7
Tableau I.2: Composition de l'huile essentielle commerciale de <i>Salvia officinalis</i> L.....	8
Tableau I.3: Chénotypes de l'huile essentielle commerciale de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ..	15
Tableau II.1 : Conditions opératoires des essais d'extraction des antioxydants de la sauge et du romarin, illustrant l'application de l'invention du brevet US 4,012,531 (Viani,1974).....	34
Tableau III.1 : Résultats du dosage des composés phénoliques dans les eaux de l'hydrodistillation de <i>Salvia officinalis</i> L. de différents taux d'humidité (H), sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA)	45
Tableau III.2 : Résultats du dosage des composés phénoliques dans les eaux de l'hydrodistillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. de différents taux d'humidité (H), sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA).....	45
Tableau III.3 : Résultats du dosage des composés phénoliques dans les extraits de <i>Salvia officinalis</i> L., obtenus en milieu basique à 60 et 100°C, sans et avec prétraitement par tensioactif	49
Tableau III.4 : Résultats du dosage des composés phénoliques dans les extraits de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., obtenus en milieu basique à 60 et 100°C, sans et avec prétraitement par tensioactif	49
Tableau III. 5 : Valeurs des IC ₅₀ , IAA et IEAR des échantillons des eaux de l'hydrodistillation de <i>Salvia officinalis</i> L. de différents taux d'humidité (H), sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA)	52
Tableau III. 6 : Valeurs des IC ₅₀ , IAA et IEAR des échantillons des eaux de l'hydrodistillation de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. de différents taux d'humidité (H), sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA).....	53
Tableau III. 7 : Valeurs des IC ₅₀ , IAA et IEAR des composés de référence	53
Tableau III. 8: Valeurs des IC ₅₀ , IAA et IEAR des extraits en milieu basique de <i>Salvia officinalis</i> L. à différentes températures, sans et avec prétraitement par tensioactif (TA).....	55
Tableau III. 9: Valeurs des IC ₅₀ , IAA et IEAR des extraits en milieu basique de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. à différentes températures, sans et avec prétraitement par tensioactif.....	55
Tableau III. 10: Valeurs des concentrations d'inhibition IC ₅₀ , IAA et IEAR des huiles essentielles de <i>Salvia officinalis</i> L. et de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	56
Tableau III.11 : Teneurs relatives en acides phénoliques en diterpènes phénoliques dans les eaux de distillation et dans l'extrait en milieu basique de <i>Salvia officinalis</i> L.....	59

Introduction

Depuis le début de son histoire, l'homme s'est intéressé au monde végétal principalement pour se nourrir et se protéger ainsi que pour se soigner. Les premières traces attestant l'emploi de plantes comme remèdes remontent à plusieurs millénaires avant notre ère, tant en Chine qu'en Egypte, en Inde et en Mésopotamie. Cette médecine vieille comme le monde puise sa substantifique moelle à la source de chaque civilisation.

A côté de leurs vertus médicinales et culinaires, les plantes aromatiques renferment de l'huile essentielle. Celle-ci, possédant entre autre des propriétés antibactériennes et antiseptiques, est très sollicitée dans le domaine de la cosmétique.

Par ailleurs, les vertus thérapeutiques des espèces végétales sont essentiellement dues à leur composition chimique susceptible d'agir directement sur l'organisme.

Les vertus thérapeutiques des espèces végétales sont essentiellement dues à leur composition chimique susceptible d'agir directement sur l'organisme. En effet, comme tout être vivant, les plantes aromatiques possèdent un métabolisme primaire, fournissant des molécules de base, tels que les acides nucléiques, les lipides, les protéines et les acides aminés, indispensables à leur survie. Elles produisent, aussi, des métabolites secondaires, comme entre autres, les huiles essentielles, pour se protéger des agressions des insectes ou pour les attirer et assurer la pollinisation, ou encore, des composés phénoliques pour lutter contre le stress oxydatif.

Ces derniers, appelés aussi polyphénols, constituent, grâce à leur diversité structurale, une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Ils font l'objet de nombreuses recherches basées sur les cultures de tissus végétaux *in vivo* et *in vitro*, et ce afin d'exploiter leurs fonctions anti-oxydante et anti-radicalaire principalement.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés, d'une part, de quantifier les composés phénoliques contenus dans les extraits, obtenus en milieu basique, et dans les eaux, issues de l'hydrodistillation, en présence et en l'absence de tensioactif, de deux plantes de la famille des Lamiacées, en l'occurrence, *Salvia officinalis* L. et *Rosmarinus officinalis* L. et, d'autre part, d'estimer le potentiel antioxydant, en particulier, celui des eaux de distillation, sous produit de l'extraction des huiles essentielles, en vue de leur valorisation.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique concernant la matière végétale, le procédé d'extraction de l'huile essentielle et les antioxydants, en général, et ceux de *Salvia officinalis* L. et du *Rosmarinus officinalis* L., en particulier.

La préparation de la matière végétale, préalable à l'extraction de son huile essentielle, les dispositifs et les protocoles expérimentaux d'extraction, les réactifs et les différentes méthodes d'analyse utilisées, font l'objet du second chapitre.

Le troisième chapitre quant à lui, regroupe les résultats expérimentaux relatifs aux rendements en huile essentielle, ainsi qu'à leurs propriétés anti-oxydante et celles des eaux de distillation et des extraits en milieu basique.

Chapitre I.
Etude bibliographique

I.1. La matière végétale

I.1.1. *Salvia officinalis* L.

La sauge officinale est un sous-arbrisseau de la famille des Lamiacées qui comprend plus de 900 espèces (Maksinovic et al., 2007 ; Longaray et al., 2007).

Son nom vient du latin *salvare*, qui signifie « sauver ». En effet, certaines espèces de sauge, notamment la sauge officinale, possèdent des vertus médicinales. Cette dernière est considérée au Moyen Âge comme une panacée.

Les Romains lui consacraient un cérémonial spécial pour sa récolte. Celle-ci se faisait sans l'intervention d'outils de fer, pensant que les sels de fer seraient incompatibles avec la sauge. Ses effets dus à son huile essentielle et à la présence d'œstrogènes avaient déjà été observés aussi bien par les Romains que par les Égyptiens.

La sauge officinale a été utilisée comme tonique et en compresse contre les morsures de serpent. Certains rapportent qu'au XVI^{ème} siècle, les femmes égyptiennes buvaient du jus de sauge pour accroître leur fertilité. La plante était associée à l'immortalité et à la longévité. Ce qui est confirmé par le dicton: "Qui a de la sauge dans son jardin, n'a pas besoin d'un médecin".

I.1.1.1. Description botanique

Le mot sauge que l'on trouve utilisé au XIII^e siècle viendrait du vieux français salje. Si le terme anglais sage semble dérivé du français, les noms allemand Salbei, ou néerlandais salie semblent avoir connu leur propre évolution. La traduction portugaise sálvia ou espagnole et italienne salvia viennent directement du latin (Site web [1]).

La sauge officinale, appelée aussi herbe sacrée ou thé d'Europe, est souvent cultivée dans les jardins comme plante condimentaire et officinale ou tout simplement pour la beauté de son feuillage et de ses fleurs.

Salvia officinalis L. forme en peu de temps un sous-arbrisseau rustique, aux racines brunâtres et fibreuses et au feuillage persistant.(Figure I.1). Ses tiges, qui mesurent de 20 à 30 cm, sont recouvertes de feuilles elliptiques, inférieures pétiolées, rugueuses, à bord dentelé, réticulées, molles, à dessus blanchâtre, qui persistent en hiver grâce à leur revêtement de poils laineux blancs. Ses fleurs sont bleu violacé nuancées de rose, groupées à la base des feuilles supérieures, l'ensemble forme de grands épis qui s'épanouissent au début de l'été. Les fleurs dégagent une odeur fortement aromatique, balsamique, qui attire les abeilles.



Figure I.1 : La sauge officinale (*Salvia officinalis* L.)

La récolte des feuilles de sauge officinale se fait du printemps à l'automne, aussi fréquemment qu'on le désire, toujours par temps sec pour effectuer un séchage à l'ombre rapide.

I.1.1.2. Classification botanique

La classification botanique place la sauge officinale dans:

- ✓ Règne : *Plantae*
- ✓ Division : *Magnoliophyta*
- ✓ Classe : *Magnoliopsida*
- ✓ Ordre : *Lamiales*
- ✓ Famille : *Lamiaceae*
- ✓ Genre : *Salvia*
- ✓ Espèce : *Salvia officinalis* L

I.1.1.3. Répartition géographique

Cette plante aromatique, médicinale, condimentaire et décorative se cultive dans les zones tempérées, en sol léger et perméable, voire rocailleux et ingrat, non calcaire, qui évitera aux racines l'eau stagnante en hiver, toujours à exposition ensoleillée. Malgré ses poils laineux, la sauge officinale craint les très fortes gelées et redoute l'humidité. La multiplication se fait par bouturage ou division des touffes, plus rarement par semis.

I.1.1.4. Composition chimique

S'agissant d'une plante aromatique, la sauge officinale possède une composition chimique complexe. Celle-ci est constituée de deux fractions :

- Une fraction volatile, constituée de métabolites secondaires formant l'huile essentielle présente, en proportions différentes, dans tous les organes de la plante.

- Une fraction non volatile, constituée de coumarines, flavonoïdes, composés acétyléniques, ainsi que de lactones sesquiterpéniques, phénols ou polyphénols, jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (El Kalamouni, 2010).

Les principaux constituants de *Salvia officinalis* L sont :

- ✓ L'huile essentielle, 1 à 2,5 % contenant, parfois, 35 à 60 %, de α -thuyone qui serait à l'origine de l'activité oestrogénique, antiseptique et digestive de la plante, mais aussi de β -thuyone, responsable des effets neurotoxique et convulsivante de l'huile.
- ✓ Les tanins et autres composés phénoliques dont l'acide rosmarinique à 3 - 7%.
- ✓ Les diterpènes phénoliques : acide carnosique, carnosol et rosmanol, des antioxydants puissants.
- ✓ Les flavonoïdes (1 - 3 %) : lutéoline, 5-méthoxysalvigénine.
- ✓ Les triterpènes : très riches en acide oléanolique et ses dérivés, acide ursolique.

I.1.1.5. Structure sécrétrice de *Salvia officinalis* L.

Une étude récente (Charchari et al., 2010), basée sur l'observation microscopique des coupes de la tige et de la feuille de sauge officinale, a permis de confirmer le caractère exogène de la structure sécrétrice et de soupçonner la présence de poches endogènes. La structure sécrétrice exogène serait constituée de trichomes peltés et de trichomes capités, situés à la surface des différents organes de la plante, visibles sur les figures I.2 et I.3.

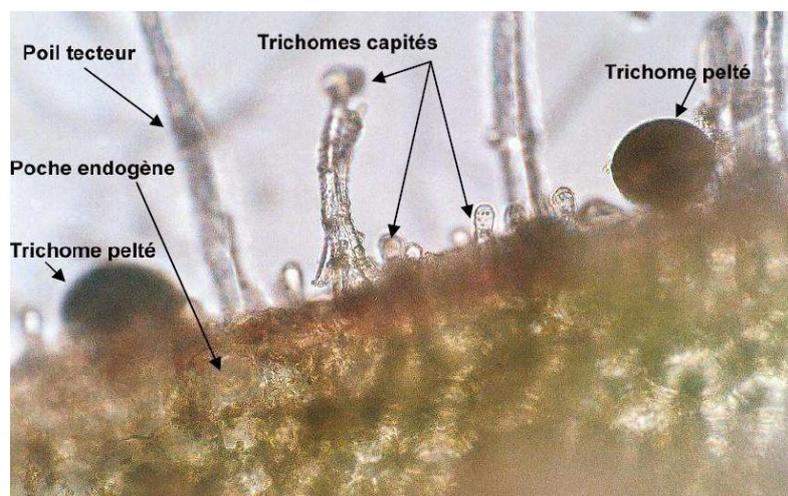


Figure I.2: Coupe de la tige de *Salvia officinalis* L. (Gx80) (Charchari et al., 2010)



Figure I.3 : Coupe de la tige de *Salvia officinalis* L. (Gx320)
Différents types de trichomes capités (Charchari et al., 2010)

Les trichomes capités de type III seraient alors la principale source d'huile essentielle de *Salvia officinalis* L., tandis que les trichomes peltés et capités de types II et IV n'en produisent qu'en faible quantité. Les trichomes capités de type I quant à eux, ne produisent pas d'huile essentielle.

Par ailleurs, Charchari et al. (2010) signalent, pour la première fois, la présence des poches endogènes, illustrées sur les figures I.4 et I.5 suivantes.

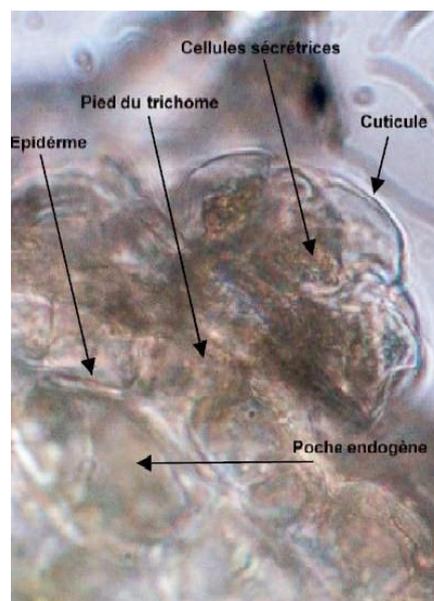


Figure I.4 : Coupe de la feuille de *Salvia officinalis* L. (Gx80)

Trichome pelté et poche endogène située dans le parenchyme (Charchari et al., 2010)

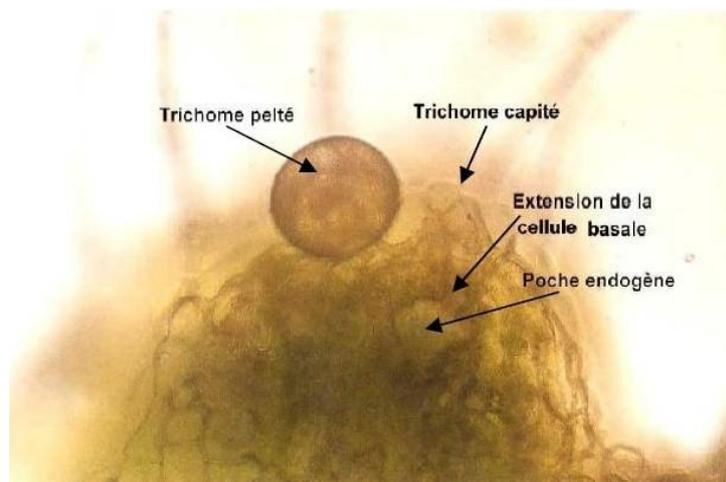


Figure I.5 : Coupe de la feuille de *Salvia officinalis* L. (Gx80) Trichome pelté et trichomecapité du type I avec une extension reliant la cellule basale à une cavité endogène (Charchari et al., 2010)

Le mécanisme de la formation de ces cavités, par lysogénie ou schisogénie, la mise en évidence des cellules sécrétrices endogènes et la nature de leurs sécrétions restent à élucider.

I.1.1.6. Composition chimique de l'huile essentielle et chémotypes

L'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. présente une grande variété de chémotypes. Ceux-ci sont singularisés par la prépondérance des mono- et des sesquiterpènes et de leurs dérivés oxygénés.

L'exigence du marché concernant la qualité de la production de l'huile essentielle de sauge, a incité les chercheurs à mener plusieurs études, afin d'élucider sa composition chimique. Les nombreux travaux entrepris sur cette espèce de diverses origines, ont permis de démontrer l'existence de nouvelles variétés chimiques. Le tableau I.1 suivant récapitule les résultats de travaux publiés, relatifs à la teneur des composés majoritairement présents dans l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. provenant de différents pays.

Tableau I.1 :Teneurs relatives, %, des constituants majoritaires de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. provenant de différents pays

Différents pays (Bernotiene et al., 2007, Jirovetz L. et al., 2006)]							
Islande	Italie	Cuba	Serbie	Géorgie	Roumanie	Portugal	France
α -thuyone 45,5 Camphre 15,9 β -thuyone 8,4 1,8-cineole 8,3	Camphre 26,8 α -thuyone 20,3 p-cymène 11,8 Pinocarvéol 6,6	α -humulène 14,7 Viridiflorol 13,4 α -thuyone 12,9 β -thuyone 10,8	α -thuyone 22,1 1,8- cineole 16,2 α -humulène 11,0 β -caryophyllene 6,0	α -thuyone 31,5 β -thuyone 17,5 1,8-cinéol 17,5	α -thuyone 21,8 Viridiflorol 11,7 Camphre 11,2 Manool 9,1	α -thuyone 22,8 1,8-cinéol 15,7 Viridiflorol 10,9	Camphre 22,0 α -thuyone 20,9 1,8-cinéol 13,4
Hongrie	Rép. Tchèque	Brésil	Herzégovine	Bulgarie	Turquie	Espagne	Iran
Camphre 30,7 β -thuyone 17,6 1,8-cinéol 17,0 Camphene 4,4	α -thuyone 25,1 Camphre 24,1 1,8-cinéol 11,9 α -humulène 6,9	α -thuyone 24,8 1,8-cinéol 14,8 Borneol 11,1 Camphre 10,9	Viridiflorol 18,5-24,0 α -thuyone 9,3-15,6 α -humulène 10,2-13,6 Manool 10,0-13,3	α -thuyone 21,5 1,8-cinéol 16,2 α -humulène 11,2 β -pinène 7,6	α -thuyone 29,4 β -thuyone 17,4 1,8-cinéol 12,5 Camphre 11,7	Camphre 22,9 α -thuyone 20,6 β -thuyone 15,1 Bornéol 7,9	1,8-cinéol 15,3-22,3 α -thuyone 9,1-25,2 β -pinène 7,1-16,4 p-cymene 3,5-11,0
Lituanie (Bernotiene et al.,2007)							
Lituanie-Vilinius	Lot A	Lot B	Lot C	Lot D	Lot E	Lot G	Lot H
α -thuyone 14,8-18,0 α -humulène 7,6-8,7 Manool 10,0-13,3 Viridiflorol 7,7-8,2 1,8-cinéol 6,6-8,2	1,8-cinéol 17,6 Viridiflorol 13,8 α -humulène 11,2 β -caryophyllene 10,2 Manool 7,9	1,8-cinéol 12,4 β -caryophyllene 9,0 Manool 8,9 α -thuyone 8,3 Borneol 7,5	Manool 14,4 α -thuyone 11,5 Viridiflorol 10,5 α -humulène 8,7 Borneol 5,9	Manool 20,9 Viridiflorol 16,5 α -humulène 7,2 Epoxyde de humulène 3,7	Manool 15,5 Viridiflorol 11,2 α -thuyone 9,6 α -humulène 8,7 Borneol 8,1	α -thuyone 12,6 Manool 11,5 Viridiflorol 10,5 α -humulène 9,8 Borneol 7,1	α -thuyone 12,6 Manool 10,3 Camphor 9,9 α -humulène 9,2 Viridiflorol 9,0
Algérie							
Amellal (1998)	Dob et al.(2007)	Chafaa (2009) ¹	Charchari et al (2010) ²	Rougou (2012) ²	Rougou (2012) ²	Rougou (2012) ^{2,3}	Rougou (2012) ^{2,4}
α -thuyone 19,9 Camphre 16,8 1,8- cinéol 15,5 β -thuyone 9,0	Camphre 20,4 α - thuyone 19,6 1,8- cinéol 12,3 β -thuyone 8,0	α -thuyone 17,3 1,8- cinéol 13,5 β -caryophyllène 12,2 Camphre 10,2 α -humulène 9,7	α -thuyone 12,6 viridiflorol 12,5 β -caryophyllène 11,7 α -humulène 10,3 1,8-cinéol 8,9	α -thuyone 17,3 Camphre 16,5 1,8-cinéol 4,2 Viridiflorol 6,8 Manool 4,9	Viridiflorol 17,8 Manool 13,0 α -thuyone 13,2 β -caryophyllène 6,4 α -humulène 5,9	Manool 25,5 Viridiflorol 20,1 α -thuyone 10,8 β -caryophyllène 9,6 α -humulène 7,9	α -thuyone 22,0 Camphre 14,5 1,8-cinéol 10,6 Viridiflorol 8,6 Manool 6,1

¹Plante cultivée au Jardin d'essais d'Alger ; extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau² Plante cultivée au Jardin d'essais d'Alger, récoltée à différentes périodes du cycle végétatif ; extraction de l'huile essentielle par hydrodistillationPlante cultivée au Jardin d'essais d'Alger, récoltée pendant la période de croissance, stockée pendant une³ et deux⁴ semaines

L'examen de tableau I.1 montre une variabilité remarquable de la composition de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. En effet, les résultats des travaux rapportés dans ce tableau I.1, montrent que la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. est influencée, aussi bien, par le lieu et la période de végétation, par la durée et la température de stockage (Rougou, 2012), que par le procédé d'extraction mis en œuvre (Fellah et al., 2006, Chafaa, 2009, Rougou, 2012) et ses paramètres.

Dans le cadre de cette étude, le substrat végétal utilisé est *Salvia officinalis* L., cultivée à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. La composition de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation, élucidée par CG-SM (Charchari et al, 2010) est présentée en Annexe I.

En 1999, la composition de l'huile commerciale de *Salvia officinalis* L. a été réglementée par la norme ISO 9909. Les teneurs relatives des principaux constituants de l'huile commerciale sont regroupées dans le tableau I.2 suivant.

Tableau I.2: Composition de l'huile essentielle commerciale de *Salvia officinalis* L.

Hydrocarbures terpéniques		Terpènes oxygénés	
α -thuyène	1,0 à 6,5%	α -thuyone	18,0 à 43,0%
Myrcène	0,3 à 3%	β -thuyone	3,0 à 8,5%
Limonène	0,5 à 3,0%	Camphre	45 à 24,5%
Camphène	1,5 à 7,0%	1,8 cinéol	5,5 à 13,0%
Humulène	trace à 12,0%	Acétate de bornyle	<2,5%

Une attention particulière est portée à la teneur en β -thuyone, connu pour sa neurotoxicité.

I.1.2. *Rosmarinus officinalis* L

Le romarin est l'une de ces plantes qui inspiraient le respect des anciennes civilisations de par leurs multiples bienfaits qui leurs valaient d'être considérées sacrées. Ainsi, le poète latin lyrique et satirique Horace (65-8 av. J.-C.), le désigne comme étant une plante sacrée douée de vertus fantastiques.

Le romarin fut d'abord associé aux rites célébrant la naissance, le mariage ou encore la mort. Aussi, il apparaît dans plusieurs légendes et mythes : la tradition bretonne voulait que les mariés en portent un brin autour du cou, le romarin étant synonyme de fidélité et de bonheur éternel ; on dit qu'il protégeait des mauvais esprits et au temps des grandes épidémies, on en mettait un petit sac autour du cou pour s'en protéger ; les étudiants grecs l'utilisaient pour améliorer la mémoire et la concentration, propriétés que de récentes recherches tendent à confirmer. Mais sa réputation ne connut son essor que lorsque la reine de Hongrie, âgée de soixante-douze ans et paralysée aurait miraculeusement retrouvé sa beauté par une cure d'alcoolat à base de romarin (Teuscher et al., 2005).

De nos jours, ses vertus médicinales sont amplement exploitées au même titre que ses vertus aromatiques dans la production d'une large gamme de produits notamment en agro-alimentaire et en parfumerie.

I.1.2.1. Description botanique

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) tiendrait son appellation du latin « *ros marinus* » (Scheler, 1862), signifiant rosée de mer en référence à l'habitat de la plante que l'on trouve, selon une légende, uniquement dans les régions où s'étend, au petit jour, la rosée venant de la mer ou encore du latin *Rosa marina* qui signifie « Rose de mer » (Escuder, 2007). Son nom pourrait aussi lui venir d'autres origines, telles que du grec « *rhops myrinos* » signifiant buisson aromatique ou encore du latin « *rhus marinus* » ou sumac de mer (Rameau et al, 2008). Enfin, on l'appelle également « herbe-aux-couronnes », « romarin des troubadours » et, en provençal, « encensier » (Paume, 2008). La vie du romarin peut durer jusqu'à trente-trois ans.

Le romarin est un arbrisseau de 50cm à 1,5 voire 2 mètres, ligneux très aromatique, toujours vert. (Figure I.6). Très ramifié dès la base, il arbore un feuillage très dense et persistant, ses feuilles sont coriaces, linéaires étroites et enroulées sur les bords, d'un vert sombre, par le dessus, et blanchâtres, parcourues par une nervure médiane saillante à la face inférieure. Leur odeur, est très camphrée et évoque l'encens (d'où il tient son nom « *encensier* » en provençal).



Figure I.6: Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

La floraison du romarin a lieu, en général, deux fois par an, la première au mois de février jusqu'en avril voire mai, et la seconde en automne (Paume, 2008), mais exceptionnellement, si les conditions nécessaires sont réunies, on peut le voir fleurir tout au long de l'année (Escuder, 2007).

Ses fleurs sont souvent bleuâtres, plus rarement blanches, ponctuées à l'intérieur de taches violettes (pour le *R. officinalis albiflorus*), bilabiées, rapprochées en petites grappes axillaires et terminales disposées au sommet des rameaux. Leur calice, en cloche, est velu à dents bordées de blanc, bilabié, nu à la gorge, à lèvre supérieure ovale et entière et à lèvre inférieure divisée en deux lobes lancéolés. La corolle est, elle aussi, de forme bilabiale, à tube saillant. Elle possède une lèvre supérieure à casque bifide et une lèvre inférieure à trois lobes dont le médian est très large et concave. Les deux étamines, à filets saillants, sont munies vers la base d'une petite dent, et sont insérées à la gorge de la corolle. Les anthères sont linéaires et à une loge. Comme pour la plupart des lamiacées, le fruit est un tétrakène à quatre carpelles obovales et lisses, dissimulés au fond du calice (Ducercf, 2007).

I.1.2.2. Classification botanique

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*L.), complexe de par le nombre de variétés qu'il compte; ne s'est vu attribuer une classification botanique complète qu'au début du 20^{ème} siècle.

Selon Beauquesne et al.(1980), la classification botanique du *Rosmarinus officinalis* L. est la suivante :

- ✓ Règne : *Plantae*
- ✓ Embranchement : *Phanérogames*
- ✓ Sous-embranchement : *Angiospermes*
- ✓ Classe : *Dicotylédones*
- ✓ Sous-classe : *Gamopétales*
- ✓ Ordre : *Lamiale*
- ✓ Famille : *Labiées, Labiacées* ou *Lamiacées*
- ✓ Genre : *Rosmarinus*

La famille des *Labiées* ou *Lamiacées* compte plus de 200 genres et 3500 espèces de plantes à fleurs, ligneuses ou herbacées, contenant en général des huiles aromatiques (Boelens, 1985). Il s'agit de l'une des familles les plus répandues de la flore algérienne, dont font partie les trois espèces : *Rosmarinus officinalis* L, *Rosmarinus eriocalyx* et *Rosmarinus tomentosus* décrites par Quezel et Santa (1963).

I.1.2.3. Répartition géographique

Le romarin couvre un domaine géographique relativement vaste. Il pousse naturellement sur tous types de terrains et, préférentiellement, sur les sols calcaires bien drainés, argileux ou argileux limoneux, situés dans des endroits ensoleillés chauds, secs et abrités du vent et ayant idéalement un pH compris entre 6,5 et 7.

Le romarin n'apprécie pas une sécheresse trop importante et peut se contenter de l'humidité du littoral, d'ailleurs, on le rencontre entre le niveau de la mer et une altitude de 650 voire

jusqu'à 1500 mètres, et bien que ce soit une plante aimant les climats chauds, il supporte les gelées si le sol ne conserve pas l'humidité.

Le romarin pousse spontanément sur la plupart des maquis, garrigues et rocailles et il accompagne le thym, la sauge, l'origan et le pin d'Alep (Gilly, 2005) dans les régions du bassin méditerranéen où il est cultivé pour en extraire son huile essentielle, notamment au voisinage du littoral de la Corse, Italie, Tunisie, Maroc, Egypte, Portugal et Algérie où il s'étend sur une superficie de plus de 100000 hectares (Bensebia et al., 2009).

Sa culture s'étend jusqu'au sud-ouest de l'Asie (Rombi et Robert, 2007) et sa production a été introduite en Inde par CIMAP (*Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants*) vers la fin des années 80 notamment dans les Nilgiri et autour du Bangalore.

I.1.2.4. Composition chimique

Les principaux constituants du *Rosmarinus officinalis* L sont :

- ✓ L'huile essentielle, représentant 1 à 2,5% de la plante et composée essentiellement de monoterpènes et leur dérivés oxygénés. Elle possède une composition chimique qualitative relativement constante, mais les différences de teneurs des constituants majoritaires ont donné lieu à la définition des chémotypes.
- ✓ Les diterpènes phénoliques tri-cycliques, tels que l'acide carnosique, le carnosol, l'isorosmanol, le rosmadial, le rosmariquinone ...etc.
- ✓ Les acides phénoliques, ou encore les tannins de *Labiées* (à 3,5%) notamment, les dérivés de l'acide cinnamique, comme les acides rosmarinique, caféique et chlorogénique.
- ✓ Les flavonoïdes, sous forme d'aglycones, hétérosides de la lutéoline, de la diosmétine, flavones méthoxylées : genkwanine et dérivés, crisimaritine, scutellaréine, hespéridine et homoplantiginine.
- ✓ Les triterpènes et les stéroïdes, tels que l'acide oléanolique (10%), dérivés de l'acide ursolique et α - et β -amyrine (5%).
- ✓ Les lipides, en particulier, les phospholipides, contenus dans la cuticule cireuse de jeunes feuilles
- ✓ Autres constituants : n-alcanes, iso-alcanes et alcènes, polysaccharides acides (6%) et traces de salicylates.

I.1.2.5. Structure sécrétrice de *Rosmarinus officinalis* L.

Les cellules, sécrétant et stockant les produits du métabolisme secondaire d'un végétal, tels que les huiles essentielles, ont en commun leur fonction physiologique, ce qui ne permet pas de les décrire comme un tissu sécréteur au sens propre, car il n'y a pas de continuité morphologique entre elles.

La structure sécrétrice du *Rosmarinus officinalis* L. est exclusivement exogène. En effet, une étude (Marin et al 2006) portant sur des analyses stéréologiques et histochimiques des trichomes glandulaires des feuilles de *Rosmarinus officinalis* L. par microscopie de fluorescence et de la lumière, a montré que les feuilles sont recouvertes d'une cuticule épaisse. Une uni-couche épidermique est présente sur les surfaces abaxiale et adaxiale. Les feuilles portent des trichomes glandulaires et non glandulaires sur les deux côtés de la lame.

✓ Les trichomes non glandulaires

Ils peuvent être multicellulaires ramifiés, dans le cas le plus fréquent, ou plus rarement monocellulaires. On les retrouve dans les veines et les marges de la feuille.

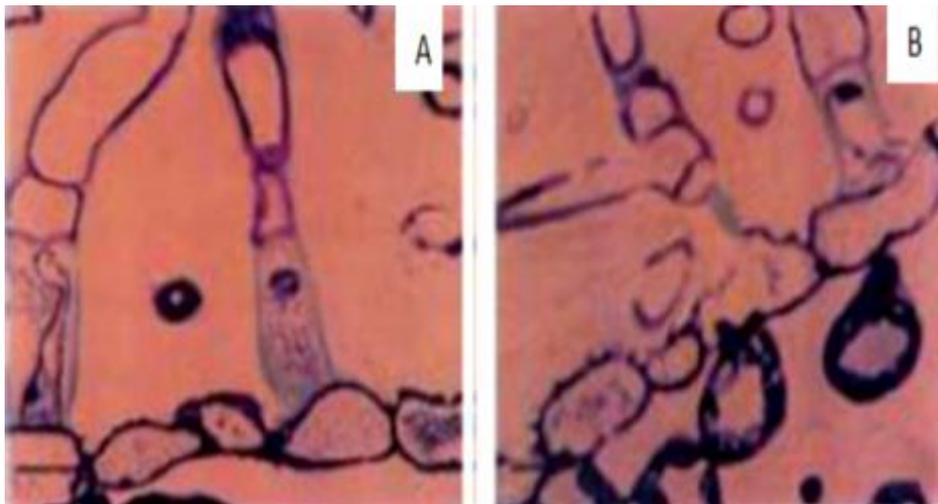


Figure I.7 : Micrographie lumineuse des trichomes non glandulaires de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. (Marin et al, 2006)

A: Section longitudinale des trichomes non glandulaires non ramifiés, bar=100µm.

B: Section longitudinale des trichomes non glandulaire ramifiés, bar=100µm.

✓ Les trichomes glandulaires

Dans un premier temps, deux types de poils sécréteurs ont été découverts dans le limbe de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L par Perrot (1968). Plus tard, il a été rapporté que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. est produite et stockée dans deux types des trichomes, en l'occurrence, les trichomes peltés et les trichomes capités.

✓ Les trichomes peltés

Constitués d'une cellule épidermique basale, d'une large tige unicellulaire et d'une tête sécrétrice multicellulaire, les trichomes peltés sont principalement situés sur la surface abaxiale et localisés dans des dépressions épidermiques.

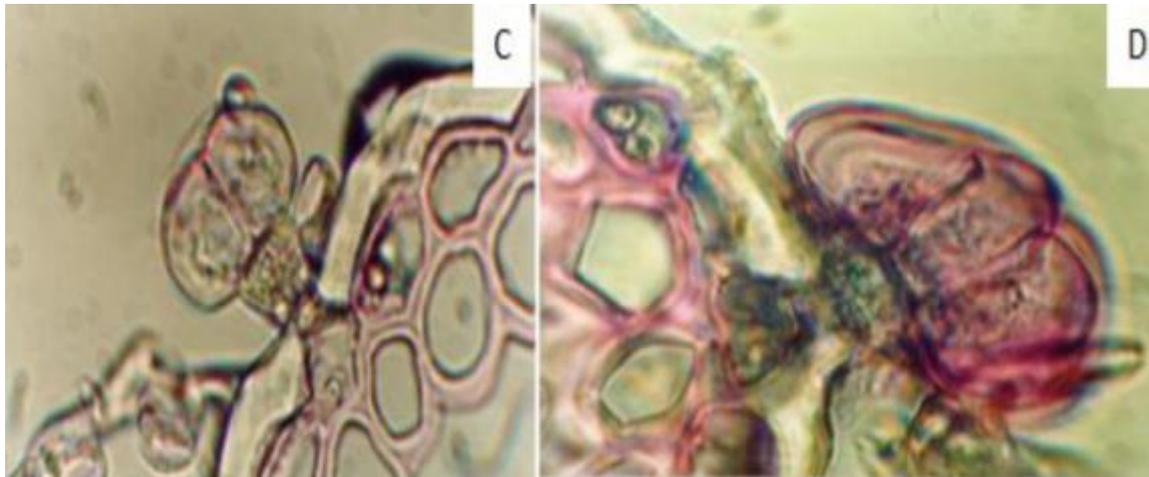


Figure I. 8 : Trichomes peltés de *Rosmarinus officinalis* L. (Gr : 100 x 3.2)
 C: Trichome pelté bicellulaire de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L.; D: Trichome pelté pluricellulaire de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. (Boutekedjiret, 1999)

✓ Les trichomes capités

Ils sont présents sur les faces adaxiale et abaxiale des feuilles. (Figure I.9)

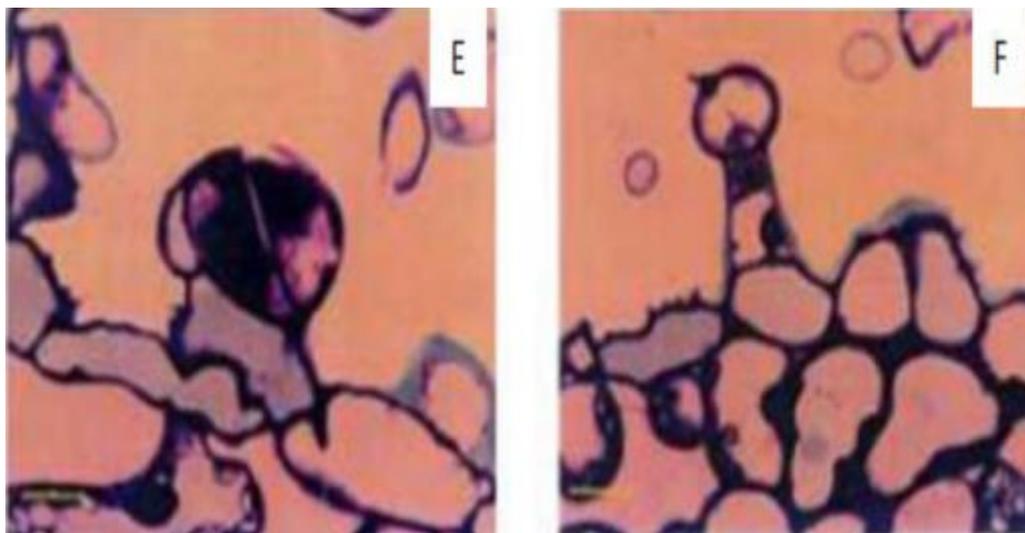


Figure I. 9 : Micrographie lumineuse des trichomes glandulaires capités de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. (Marin et al, 2006)

E: section longitudinale d'un trichome glandulaire capité de type I, bar=100 μ m ;
 F: section longitudinale d'un trichome glandulaire capité de type II, bar=100 μ m.

Ces trichomes sont plus nombreux que les trichomes peltés et peuvent être subdivisés en :

- ✓ Trichomes capités de type I : constitués d'une cellule basale, d'une courte tige unicellulaire et d'une tête à une ou à deux loges sécrétoires.
- ✓ Trichomes capités de type II : composés d'une cellule basale, d'une courte tige mono ou bicellulaire et une tête sécrétrice unicellulaire.

I.1.2.6. Composition chimique de l'huile essentielle et chémotypes

Les composés aromatiques ne sont pas présents en quantités constantes pour une même espèce, et ce, en raison de différents facteurs reliés à la localisation géographique, tels, que l'ensoleillement, l'altitude, la nature et la composition du sol qui influencent la biosynthèse végétale et, dans le cas du *Rosmarinus officinalis* L., plusieurs études l'ont démontré (Tuker and Maciarello, 1986; Tewari and Virmani, 1987; Mizrahi et al., 1991; Svoboda et Deans, 1992; Chalchat et al., 1993; Lawrence, 1995; Rao et al., 1997; Dellacassa et al., 1999). Notamment, en 1973, Granger et al. ont étudié la composition du romarin en provenance d'Italie, d'Espagne et de Corse et en ont déduit que le composé majoritaire du romarin d'Italie est le 1,8 cinéole, alors que pour le romarin de Corse c'est l'α-pinène et pour le romarin poussant en Espagne, le camphre.

Afin de différencier cette variation chimique, relativement constante, on utilise le terme de chémotype ou race chimique.

Quatre chémotypes de *Rosmarinus officinalis* L., sont rapportés par Raskin (2003):

- ✓ Chémotype à camphre qui présente des propriétés anti-inflammatoires.
- ✓ Chémotype à 1,8-cinéole qui présente des propriétés antiseptiques pulmonaires et mucolytiques.
- ✓ Chémotype à myrcène.
- ✓ Chémotype à verbénone qui présente des propriétés cholagogues et hépatoprotectrices.

La teneur des principaux constituants de l'huile essentielle varie suivant le chémotype dans les proportions suivantes :

- ✓ 13 et 18,5% pour le camphre,
- ✓ 3 et 60 % pour le 1,8 cinéole,
- ✓ 0,5 à 15 % pour le myrcène,
- ✓ 0 et 28 % pour la verbénone,
- ✓ 1 et 18 % pour le bornéol,
- ✓ 1 et 57 % pour l'α pinène,
- ✓ 0,5 et 10 % pour le p-cymène,
- ✓ 1 et 21 % pour l'acétate de bornyle,

A côté des constituants majoritaires sus cités, les différents chémotypes incluent dans leurs compositions du : β -caryophyllène, limonène, linalool, β -pinène, sabinène, γ -terpinène, α -terpinéol et du terpinen-4-ol (Teuscher et al., 2005).

La Pharmacopée française (1993) retient deux types de chémotypes de *Rosmarinus officinalis* L., à usage pharmaceutique, tous deux à camphre :

– Type Espagne : 16-25 % de 1,8-cinéole, 18-26 % d' α -pinène, 8-12 % de camphène et 13-18 % de camphre.

– Type Maroc et Tunisie : 38-55 % de 1,8-cinéole, 9-14 % d' α -pinène, 2,5-6 % camphène et 5-15 % de camphre.

Le tableau I.3 suivant regroupe les principaux constituants des huiles essentielles du romarin, appartenant aux différents chémotypes.

Tableau I.3 : Chémotypes de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

Chémotypes	Teneur en (%)					
	Camphre (Alaux, 2006)	1,8-cinéol (Alaux, 2005)	Verbénone (Site web [2])	Myrcène (Mateus et al., 2006)	ALGERIE	
					1,8-cinéol Boutekdjiret (1999)	Camphre Abdelli (2010)
1,8-cinéol	19,1	44,5	8,1	14,9	31,9	—
Camphre	18,7	10,1	14,5	14,4	19,7	15,2
Myrcène	5,6	1,1	1,7	31,5	tr	1,5
Verbénone	0,5	0,2	10,8	1,4	—	0,4

Dans le cadre de cette étude, le substrat végétal utilisé est le *Rosmarinus officinalis* L., cultivé à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. La composition de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation, présentée en Annexe I, a été élucidée par CG-SM (Abdelli, 2010) et par CPG (Arab et Beddar, 2011). Les résultats de ces analyses montrent clairement qu'il appartient au chémotype à camphre.

I.2. Le procédé d'hydrodistillation

Il existe divers procédés pour l'extraction des produits aromatiques des plantes. Selon la substance que l'on cherche à extraire, ou le produit final que l'on veut obtenir (essence, huile essentielle, concrète, pommade...etc.), il faudra choisir le procédé adéquat permettant de répondre à des exigences quantitatives, les rendements en huiles essentielles étant très faible

et de l'ordre de (1-2%), mais aussi qualitatives, en veillant à ne pas dégrader les molécules odorantes fragiles.

Les différentes techniques d'extraction des produits aromatiques des plantes peuvent être classées en deux catégories :

- ✓ Techniques traditionnelles : entraînement à la vapeur d'eau, hydrodistillation et expression, pour l'extraction des huiles essentielles ; enfleurage, permettant d'obtenir des pommades ; extraction par solvant, pour récupérer des concrètes, teintures, résinoïdes, absolues.
- ✓ Techniques modernes : hydrodistillation assistée par micro-ondes, extraction au CO₂ supercritique, détente instantanée contrôlée...etc.

Nous nous intéresserons, dans ce qui suit, au procédé d'hydrodistillation, utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle lors de cette étude.

I.2.1. Principe

L'utilisation du procédé d'hydrodistillation pour l'extraction des molécules odorantes à partir d'une matrice végétale remonte à très loin dans le temps et les Chinois furent les premiers à découvrir cette méthode en l'an 2000 avant Jésus-Christ (Guenther, 1972). Cette pratique s'est ensuite répandue dans tout le monde antique et fut exportée en Europe par les Arabes entre le VIII^{ème} et le X^{ème} siècle.

Si l'hydrodistillation est la méthode normée pour l'extraction des huiles essentielles, elle est aussi la plus utilisée, car rentable et convenant le mieux à l'extraction des substances odorantes destinées à un usage thérapeutique (Willem, 2002).

Le principe du procédé consiste à introduire la matière première végétale dans un bain d'eau puis de chauffer jusqu'à ébullition, généralement à pression atmosphérique. La vapeur d'eau entraîne les molécules aromatiques libérées sous l'action du chauffage et un mélange azéotropique est alors formé.

Par ailleurs, la température d'ébullition du mélange étant atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle sera donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures, ce qui permet à ce mélange « eau-huile essentielle » de distiller à une température de 100°C.

Le distillat obtenu est ensuite refroidi puis condensé et récupéré au moyen d'un essencier, et la séparation des deux phases : huile essentielle (qui constitue la phase organique) et eau florale (qui constitue la phase aqueuse) a lieu du fait de la différence entre leurs densités.

On peut introduire dans le procédé un dispositif de recyclage (re-distillation) des eaux de distillations, appelé cohobage et, à l'échelle laboratoire, l'équipement le plus souvent utilisé permettant cela est l'appareil de Clevenger.

Suivant la matrice végétale à traiter et le matériel utilisé, la durée d'une hydrodistillation est variable, pouvant dans certains cas atteindre plusieurs heures. Cependant il est très important

d'optimiser ce paramètre du fait qu'il influe sur le rendement et la composition de l'huile essentielle (Lucchesi, 2005).

Lors de l'hydrodistillation, certaines réactions d'hydrolyse peuvent avoir lieu entre l'eau et certains constituants de l'huile essentielle. La réaction d'hydrolyse des esters est la plus fréquente et elle conduit à la formation d'acides organiques qui, à leur tour, catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation (Lagunez Rivera, 2006).

Pour la quantité d'eau en contact avec la matière végétale, un optimum est donc à trouver car plus celle-ci est importante plus les réactions sont accélérées favorisant la formation d'alcools et d'acides, causant ainsi la diminution du rendement en huile essentielle. Ce processus d'hydrolyse est, donc, à l'origine de la formation d'artefacts, (Handa et al. 2008).

Par ailleurs, la majorité des constituants de l'huile essentielle étant instables et réactifs, les températures élevées en favorisent la décomposition thermique et l'hydrolyse et peuvent aller jusqu'à modifier le degré de solubilité de ces derniers dans l'eau bouillante. Dans ce cas, des températures relativement basses couplées à une bonne dispersion de la matière végétale, peuvent contribuer à améliorer le rendement et la qualité de l'huile essentielle.

I.2.2. Mécanisme

Pour expliquer les différentes phases de l'hydrodistillation des végétaux, des études relativement récentes (Gueorguiev, 1995) proposent un mécanisme comportant les trois étapes suivantes:

- ✓ La thermodiffusion : dans un premier temps, pour que l'huile puisse être entraînée, il faut qu'elle soit en contact direct avec la vapeur. Une telle contrainte impose la destruction de la structure cellulaire du végétal, chose que les conditions sous lesquelles est menée l'hydrodistillation ne permettent pas. On pense alors qu'au début du processus, on assiste à la « thermodiffusion » ou exsudation thermique de l'huile et ceci se poursuit jusqu'à l'établissement d'un équilibre des températures à l'extérieur et à l'intérieur du site sécréteur.
- ✓ L'osmose : au contact de la surface du végétal, l'eau pénètre par osmose dans les sites sécréteurs et engendre une augmentation de la pression à l'intérieur du site. Cette pression dite de « turgescence » qui s'exerce sur la cuticule, provoque l'expansion du trichome et une dilatation des pores. Il s'ensuit l'expulsion de l'huile essentielle du site sécréteur, vers l'extérieur, sans que la cuticule du trichome soit déchirée. La température élevée, quant à elle, provoque la coagulation du protoplasme du trichome et, par conséquent, la semi-perméabilité de la cuticule se trouve diminuée.
- ✓ L'hydrodiffusion : Une fois à l'extérieur du trichome, l'huile essentielle rencontre une couche d'eau de condensation qui enveloppe le substrat végétal. L'huile essentielle diffuse à travers cette couche (hydrodiffusion), jusqu'à atteindre l'interface huile-vapeur. Le contact direct huile-vapeur étant assuré, l'huile s'évapore et est entraînée par le flux de vapeur.

Cependant, une conséquence à l'étape d'hydrodiffusion est le fait que la vitesse de vaporisation des constituants de l'huile essentielle est davantage conditionnée par leurs solubilités dans l'eau que par leurs points d'ébullition (Leguet 1993).

I.2.3. Hydrodistillation en présence de tensioactif

L'utilisation des tensioactifs pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques a fait l'objet de plusieurs travaux.

Les premières études dans ce domaine ont été menées sur l'extraction des huiles essentielles de menthe, de lavande et de rose dans les années 1960 (Trandafilov et Minkov, 1969 ; Minkov et *al.*, 1967). Les résultats obtenus montrent une augmentation de 30 à 40% du rendement en huile sans altération significative de sa composition.

Mis de côtés, puis repris dans les années 1970 et 2000, ces travaux ont été, cette fois, menés sur l'extraction de l'huile essentielle des pétales de deux espèces de rose, respectivement de *Rosa damascena* Mill. (Gantchev et *al.*, 1978 ; Baydar et Baydar, 2005) et de *Rosa alba* L. (Dobрева et Kovatcheva, 2007).

Les auteurs ont constaté une augmentation de 50 % du rendement en huile pour *Rosa damascena* Mill. et de 130 à 316 % pour *Rosa alba* L.

L'augmentation du rendement pour *Rosa damascena* L est attribuée à l'intervention du tensioactif qui faciliterait le mouillage de la matière végétale tout en prévenant le dépôt de l'huile sur la surface de celle-ci (Dobрева et Kovatcheva, 2007). Ceci s'explique par le fait que les agents tensioactifs agissent en réduisant la tension entre la phase aqueuse et la surface hydrophobe des tissus végétaux, d'une part, et entre l'eau et la phase huileuse, d'autre part. Par conséquent, les auteurs préconisent la macération de la matière végétale avant extraction, afin de permettre un meilleur mouillage du substrat végétal.

La forte augmentation du rendement en huile de *Rosa alba* L. serait due à l'hydrolyse des glycosides, renfermant des constituants de l'huile essentielle, dont la présence dans cette espèce de rose a été prouvée (Staikov et Zotovitch, 1963).

A l'occasion de travaux ultérieurs, l'hydrodistillation de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L a été réalisée en présence de tensioactif non ionique (Charchari et al, 2011; Abdelli, 2010, Rougou, 2012).

Les résultats de ces études montrent une augmentation du rendement de l'ordre de 50% avec conservation de la composition qualitative de l'huile qui s'est avérée relativement peu affectée par la présence du tensioactif

I.2.3.1. Généralités sur les tensioactifs

Un tensioactif, ou agent de surface, est un composé qui a pour but d'abaisser la tension superficielle entre deux surfaces. Ce sont des molécules amphiphiles présentant deux parties de polarité différente :

- ✓ Partie lipophile apolaire : constituée par une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées. Son caractère hydrophobe varie avec le nombre d'atomes de carbone, le nombre d'insaturations et les ramifications, et est à l'origine de son affinité avec les matières grasses.
- ✓ Partie hydrophile polaire : présente une grande affinité pour l'eau (Onesippe, 2005).

Cette dualité au sein de la molécule du tensioactif lui permet de solubiliser deux phases non miscibles, en interagissant avec l'une apolaire, par sa partie hydrophobe; et avec l'autre, polaire, par sa partie hydrophile, cette propriété qui est à l'origine de l'activité de surface, de la miscellisation et des capacités de solubilisation, introduit les diverses applications des molécules amphiphiles.



Figure I. 10 :Schéma simplifié d'une molécule de tensioactif (Stolzenberg, 1989)

Par ailleurs, on distingue quatre types de composés tensioactifs, classés selon la nature de leur partie hydrophile (Stolzenberg, 1989):

- ✓ Les tensioactifs anioniques : le groupement fonctionnel est chargé négativement (-COO⁻, -SO₃⁻ -SO₄⁻, ..etc).
- ✓ Les tensioactifs cationiques : le groupement fonctionnel est chargé positivement c'est le cas des amines protonés ou des ammoniums quaternaires.
- ✓ Les tensioactifs zwitterioniques (ampholytes): dans cette catégorie les molécules tensioactives se comportent en anions dans les milieux basiques et en cations dans les milieux acides.
- ✓ Les tensioactifs non-ioniques: ils ne donnent pas lieu à des ions en solution aqueuse et selon (Knoch, 1994), ce dernier type de tensioactifs est le plus intéressant à utiliser, car ils ne sont pas chargés et sont donc généralement compatibles avec toutes les matières actives.

Enfin, les propriétés et les applications d'un tensioactif seront fonction de la valeur de sa balance hydrophile-lipophile ou HLB (Tadros, 1994), pour être solubilisant celle-ci doit être comprise entre 15 et 18.

I.2.3.2. Structure et constitution de la cuticule végétale

Dans les organes aériens du végétal (feuilles et jeunes tiges), l'épiderme représente le tissu superficiel de protection. Il ne comporte en général qu'une seule couche de cellules, dont la paroi externe est épaisse et pourvue d'une couche imperméable, la cuticule, qui a pour but de réduire les pertes d'eau par évaporation.

L'épiderme de la plante est interrompu çà et là par des ouvertures, les stomates, qui permettent de réguler les échanges gazeux et d'eau, nécessaires à la respiration et à la photosynthèse, avec l'extérieur.

La cuticule est formée de trois couches :

- ✓ La cuticule proprement dite formée de : cutine qui se forme par dépôts successifs de cire enrobée dans un polymère de lipide qui donne naissance à un biopolyester d'acide et d'alcool gras (Baudrand-Alzieu, 1995) ;
- ✓ Une couche cuticulaire assurant le lien entre la cuticule et la paroi cellulaire sous-jacente;

Les deux couches citées précédemment peuvent être classées dans le domaine des cires cuticulaires qui sont essentiellement constituées de composés aliphatiques que l'on peut répartir en deux groupes (Stevens et Baker, 1987):

- ✓ Dans le premier, on trouve des composés communs de type : alcanes ($C_{19}-C_{37}$), esters ($C_{30}-C_{60}$), acides ($C_{12}-C_{36}$), alcools primaires ($C_{12}-C_{36}$) et aldéhydes ($C_{14}-C_{34}$).
- ✓ Le deuxième, en revanche, concerne des composés plus rares de type : cétones ($C_{25}-C_{33}$), alcools secondaires ($C_{21}-C_{33}$), ou β -dicétones ($C_{27}-C_{35}$) qui sont le plus souvent majoritaires dans les cires qui en contiennent.
- ✓ De même, une teneur faible en éléments non aliphatiques est rencontrée, comprenant des composés cycliques ou polycycliques regroupés sous le terme de triterpénoïdes et présents sous forme d'alcool (stérols, α -amyrin, β -amyrin, lupeol, erythrodiol) ou d'acides (ursolique, olnolique).
- ✓ Dépôt de cires épicuticulaires à la surface de la cuticule : qui limitent l'évapotranspiration tout en empêchant la pénétration de dioxyde de carbone et qui forment soit un film amorphe à la surface de la plante, soit des structures organisées appelées « cristoïdes » liées à la présence prépondérante d'une ou plusieurs familles de composés lipidiques (Baudrand-Alzieu, 1995).

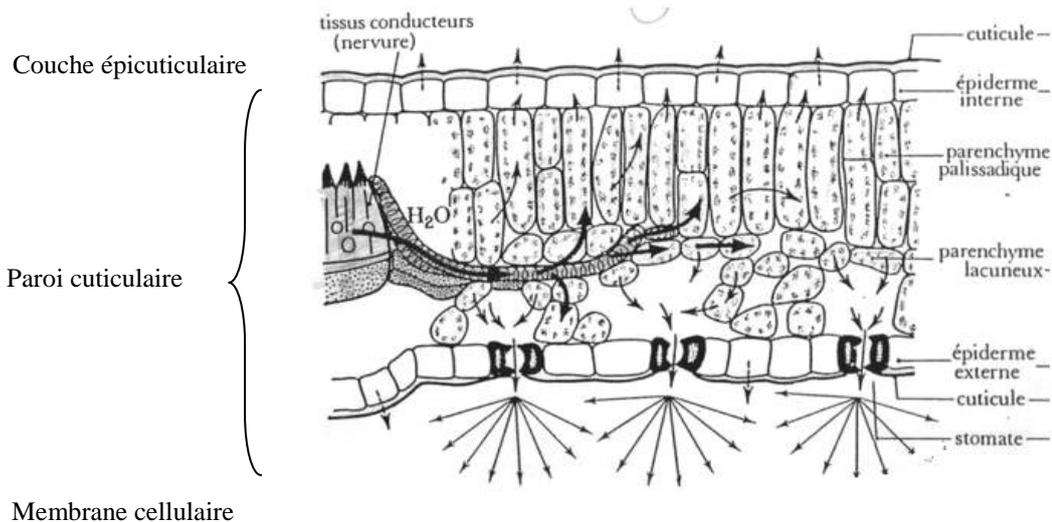


Figure I.11 : Structure de la cuticule de la feuille foliaire (Site web [3])

La membrane cellulaire, quant à elle, est constituée d'une bicouche lipidique contenant des :

- ✓ molécules amphiphiles : essentiellement des phospholipides et des stérols.
- ✓ protéines globulaires : Elles traversent la membrane cellulaire et pointent de chaque côté du fait qu'elles contiennent une partie hydrophobe transmembranaire, et une partie hydrophile qui constitue les parties exposées (Reverts, 2006).
- ✓ acides gras : les acides laurique (C_{12}), myristique (C_{14}) et palmitique (C_{16}) interviennent dans la composition de la membrane plasmique des cellules.

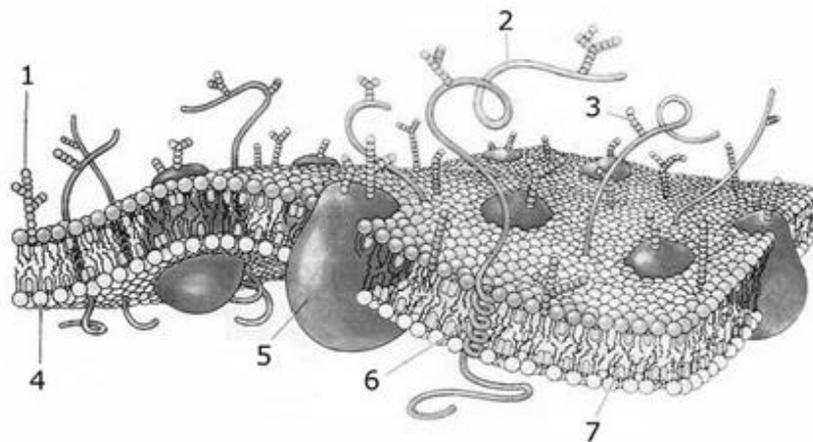


Figure I.12 : Structure de la membrane cellulaire ou bicouche lipidique (Site web [4])

- (1) : Glucides accochés à des lipides ou glycolipides ;
- (2) : Glucides accochés à des protéines ou glycoprotéines ;
- (3) Phospholipides composant la bicouche lipidique, ils comportent une tête hydrophile tournée vers l'extérieur de la membrane cellulaire, et une queue hydrophobe orientée vers l'intérieur de celle-ci.
- (5) et (6) : Protéines (ce sont par exemple des canaux pour les échanges entre intérieur et extérieur de la cellule) ;
- (7) Cholestérols (aussi des lipides) éparpillés parmi les phospholipides.

I.2.3.3. Action des tensioactifs sur la cuticule

Le tensioactif agit sur la couche externe de la cuticule, pour cela, nous nous intéresserons à la couche épicuticulaire de la cutine, celle-ci étant en contact immédiat avec le milieu extérieur.

La nature chimique de la couche épicuticulaire influe considérablement sur les phénomènes d'étalement, de mouillage et de pénétration de l'eau ; et étant formée par des dépôts de cires, ce qui lui confère son caractère hydrophobe, on assiste à un mauvais mouillage de la surface avec l'eau, et un bon mouillage avec des solutions aqueuses contenant des agents tensioactifs convenablement choisis (Chamel et *al.*, 1991).

Cette même étude a montré que la pénétration de la solution aqueuse de tensioactif dans la cuticule est d'autant plus importante que la tension superficielle de la solution est petite. Par conséquent, on admet que le tensioactif agit en tant que solubilisant sélectif des constituants des cires épicuticulaires ce qui permet de frayer des chemins (canaux) à l'eau qui peut alors pénétrer dans les cellules végétales, et bien que ce principe n'ait pas encore été clairement élucidé, un mécanisme comportant trois étapes est proposé par (Tamura et *al.*, 2002) :

- ✓ Etape d'adsorption: de la solution aqueuse de tensioactif sur la feuille et plus précisément sur la portion soluble de la cire épicuticulaire. Le tensioactif interagit ensuite par sa partie hydrophobe avec les constituants hydrophobe de cette couche.
- ✓ Etape de réorganisation: La barrière diffusionnelle des cires épicuticulaires est affaiblie du fait de l'altération de certaines de ses propriétés physiques sous l'effet du tensioactif.
- ✓ Phase de pénétration: Après micellisation de la cire épicuticulaire, la solution pénètre les tissus végétaux.

Ces étapes sont illustrées à la figure I.13, où chacun des points est une représentation schématique des observations, menées par microscopie électronique par Tamura et *al.* (2002), des interactions entre un tensioactif non-ionique et la surface d'une bicouche lipidique.

Ces interactions peuvent être résumées comme suit :

- ✓ Les molécules du tensioactif pénètrent dans la bicouche lipidique dès leur mise en contact (point 2).
- ✓ Des perforations apparaissent dans la bicouche lipidique, suite à la formation de micelles mixtes et au détachement de certaines d'entre elles, (point 3).
- ✓ Le détachement des micelles croît de plus en plus (Point 4) jusqu'à disparition totale de la bicouche lipidique (Point 5).

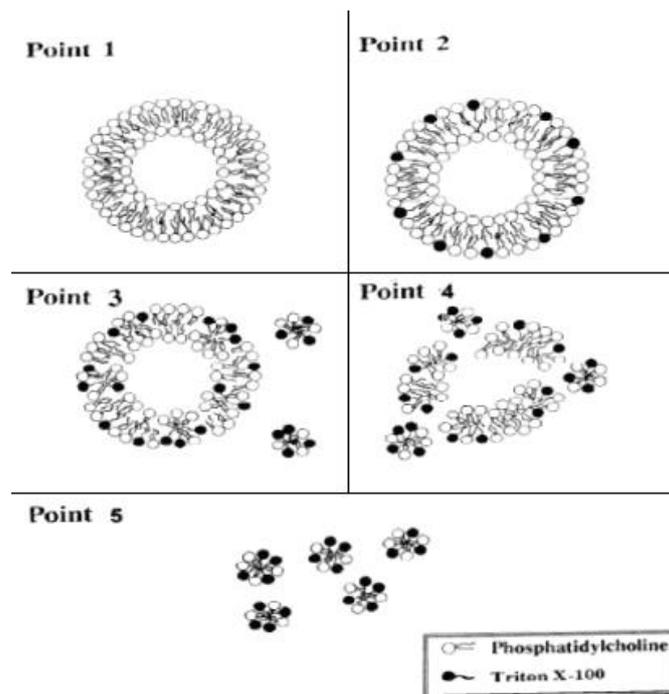


Figure I. 13 : Interaction tensioactif – bicouche lipidique et formation des micelles

Point 1: Bicouche lipidique ; Point 2: étape d'adsorption du tensioactif ; Point 3: étape de réorganisation; Points 4 et 5 : solubilisation de la bicouche lipidique (formation des micelles)

En plus de l'interaction avec les lipides, les tensioactifs peuvent aussi réagir avec les protéines cuticulaires. Il en résulte une modification de la couche protéique en présence de molécules du tensioactif de faible poids moléculaire et, suivant la nature des espèces, les interactions entre protéines et tensioactifs peuvent produire un renforcement ou un affaiblissement mécanique de l'interface (Chen et Dickinson, 1995; Krägel *et al.*, 1999).

I.3. Les antioxydants

Les antioxydants sont considérés comme étant des composés agissant à faible concentration, capables de diminuer ou d'inhiber le processus d'oxydation d'autres substances chimiques (Favier, 2003) et de protéger l'organisme contre les dommages causés par les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives.

Ces dernières, naturellement présentes dans l'organisme, jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques. Toutefois lorsqu'elles sont fabriquées en excès par nos cellules, notamment sous l'effet de la pollution, du tabac, des rayons ultraviolets... (Site web [5]). Cela peut alors engendrer le vieillissement prématuré des cellules et le développement de certaines maladies dues à un déséquilibre de la balance entre la production des espèces oxygénées réactives et les systèmes de défense anti-oxydante qui donne lieu à un état redox altéré de la cellule appelé « stress oxydatif » (Favier, 2003).

I.3.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons libres sur leur couche externe (Lehucher-Michel et al, 2001). Ce caractère chimique leur confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules, ce qui signifie qu'ils ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus, le plus souvent, non spécifiques et que leur durée de vie en solution est très courte. Cette instabilité varie selon la nature du radical et de l'environnement dans lequel il est présent. Une «réaction en chaîne» débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui «volant» son électron, et «la molécule attaquée» devient alors elle-même un radical libre (Martinez-Cayuela, 1995).

Les radicaux libres sont formés au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente, ou rupture homolytique, pendant laquelle chaque atome conserve son électron, mais ils apparaissent le plus souvent au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électron à partir d'un composé non radical (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

Les espèces oxygénées réactives regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène ($O_2^- \bullet$, $\bullet OH$, $NO \bullet$, $ROO \bullet \dots$), mais également les composés non radicalaires ($ROOH$, H_2O_2 , O_2), (Milane, 2004).

I.3.2. Le mécanisme d'action des antioxydants

Lorsque l'on parle d'activité anti-oxydante, on distingue deux types d'action. La première consiste à capter directement les radicaux libres. En effet, les antioxydants neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers. La seconde comprend l'inhibition des enzymes responsables de la génération des espèces oxygénées réactives : les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (M.A. Ribeiro et al., 2001).

I.3.3. Classifications des antioxydants

Les antioxydants sont naturellement présents dans presque toutes les plantes, tous les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux. Le groupe le plus important est celui des antioxydants naturels, les antioxydants synthétiques, quant à eux, sont généralement préparés en laboratoire (Kristiina Pelli et Marika Lyly, 2003).

I.3.3.1. Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels, les plus connus, sont les caroténoïdes, tels que le lycopène et le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), et les polyphénols. Ce groupe inclut, aussi, les flavonoïdes, très répandus dans les végétaux, les tanins, présents dans le cacao, le café, le thé, le raisin, les anthocyanes, que l'on trouve dans les fruits rouges et les acides phénoliques contenus dans les fines herbes, les céréales, les fruits et les légumes (Site web [6]).

- Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur fonction de provitamine A, les caroténoïdes sont capables de neutraliser l'oxygène singulet et les radicaux libres, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardèse et al., 2003). Selon Burton et Ingold (1984), l'effet antioxydant du β -carotène serait dû à une interaction entre le radical et le système de doubles liaisons conjuguées de la chaîne insaturée du piègeur qui serait stabilisé par résonnance. L'effet antioxydant des caroténoïdes serait dépendant de la pression d'oxygène. Différents systèmes in vitro ont confirmé le rôle protecteur de ces molécules. Cependant, les études effectuées in vivo sont peu nombreuses et le rôle anti-radicalaire des caroténoïdes reste à préciser.

- Vitamine C (acide ascorbique)

L'action de la vitamine C est très controversée quant à son effet protecteur ou activateur face à la toxicité de l'oxygène. La vitamine C n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, la vitamine C passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui sera régénérée par le glutathion. Celle-ci est capable de capter l'oxygène singulet et certaines espèces radicalaires (Pokorny et al., 2000). C'est ainsi qu'elle protégerait la peau de la toxicité induite par les rayonnements ultraviolets. Cependant, à forte concentration, la vitamine C peut se comporter comme un pro-oxydant générateur de radicaux libres.

- Vitamine E

Elle désigne une famille de molécules liposolubles. Il en existe quatre isomères dont l'activité anti-oxydante est fortement tributaire à la structure. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. En effet, son action anti-oxydante est extrêmement efficace et l'on estime qu'une molécule d' α -tocophérol peut inhiber la peroxydation de 1000 molécules d'acides gras polyinsaturés (Benammar, 2011). Aux concentrations élevées, il peut jouer le rôle de pro-oxydant. Il semble que parmi les quatre principaux tocophérols, l' α -tocophérol est plus rapidement oxydé à l'air et formerait un excès de radicaux libres tocophéroxyles susceptibles de relancer le mécanisme de l'autoxydation (Cillard et al., 1980).

- Les huiles essentielles

Les huiles essentielles et leurs composants sont connus pour posséder des activités anti-oxydantes. Ainsi, les huiles essentielles suscitent beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Leur activité anti-oxydante est essentiellement due à la présence des composés phénoliques.

- Les composés phénoliques

Egalement appelés « polyphénols », ces derniers représentent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leur diversité est due à leur structure qui est constituée d'un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles (Bloor, 2001).

Ce sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la production (Belkhir, 2009).

Les polyphénols, principalement, flavonoïdes, acides phénoliques, tannins, constituent une richesse déjà largement exploitée par les industries agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Ils entrent dans la composition des produits de consommation les plus courants, en particulier les fruits et légumes.

I.3.3.2. Les antioxydants synthétiques

A cause de l'instabilité inhérente des antioxydants naturels, plusieurs antioxydants synthétiques sont utilisés pour stabiliser les matières grasses et les huiles.

L'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'hydroxyanisole butylé (BHA) ont été développés à l'origine pour protéger le pétrole contre le gommage oxydatif (Porter, 1980). Ces composés sont cependant utilisés depuis 1954 comme antioxydants dans les aliments destinés à la consommation humaine et ce sont peut-être les plus répandus aujourd'hui.

Il existe d'autres composés phénoliques utilisés comme antioxydants de synthèse, tels que le Ter-Butyl Hydroxy-quinone (TBHQ) et les esters de l'acide gallique (Pokorny et al., 2001).

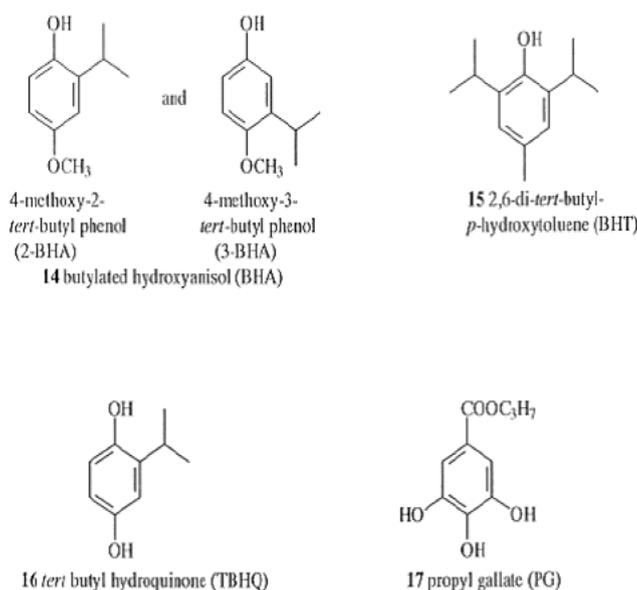


Figure I. 14: Antioxydants de synthèse (Pokorny et al., 2001)

Même si l'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'hydroxyanisole butylé (BHA) font tous les deux parties des substances « généralement reconnues comme sécuritaires », leur usage dans les aliments pour les humains et la nourriture pour animaux suscite des inquiétudes. En effet, des études de toxicité chronique ont attribué une certaine activité tumorigène au BHT lorsqu'il est absorbé en concentrations élevées (Witschi, 1981 ; National Institute of Health Publications NIH, 1979).

I.3.4. Domaines d'application des antioxydants

Avec leur diversité structurale remarquable, les antioxydants constituent une richesse déjà largement exploitée. Que ce soit dans les industries agro-alimentaire et cosmétique, pour prévenir l'oxydation des graisses et des huiles, ou pharmaceutique, l'objectif principal est d'empêcher l'altération des caractéristiques du produit par inhibition de l'oxydation.

Les antioxydants sont aussi des ingrédients importants des compléments alimentaires utilisés dans le but d'entretenir la santé et de prévenir certaines maladies, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et coronariennes, la cataracte, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et les problèmes articulaires. En effet, toutes ces pathologies seraient liées à un déséquilibre entre antioxydants et radicaux libres.

Par ailleurs, les antioxydants permettent de lutter contre les signes de vieillesse dus essentiellement à la destruction des cellules. Ils permettent aussi de favoriser la réponse et la protection immunitaires.

Même si des études suggèrent que les compléments d'antioxydants sont bénéfiques à la santé, de nombreux travaux cliniques ont prouvé qu'un excès de suppléments ou compléments en antioxydants peut, parfois, avoir des effets négatifs (Site web [7]).

I.3.5. Les antioxydants de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus Officinalis* L.

Salvia officinalis L. et *Rosmarinus Officinalis* L. font partie des fines herbes employées en cuisine, et ne sont habituellement pas consommées en grande quantité. Utilisées comme assaisonnements, elles ne peuvent donc pas procurer tous les bienfaits pour la santé qui leur sont attribués. Reste que l'ajout de fines herbes aux aliments, de façon régulière et significative, permet de contribuer, ne serait-ce que de façon minimale, à l'apport en antioxydants dans l'alimentation.

Quelques chercheurs ont évalué la capacité anti-oxydante des fines herbes et tous s'entendent pour dire que les fines herbes fraîches montrent une capacité anti-oxydante non négligeable, parfois même plus élevée que celle de certains fruits et légumes (Campanella L, Bonanni A, Favero G et al., 2003 ; Ninfali P, Mea G, Giorgini S et al., 2005 ; Zheng and Wang , 2001). Cela démontre qu'effectivement, l'ajout de fines herbes de façon régulière dans l'alimentation contribue à l'apport en antioxydants.

Les principaux antioxydants présents dans les plantes peuvent être classés, entre autres, selon :

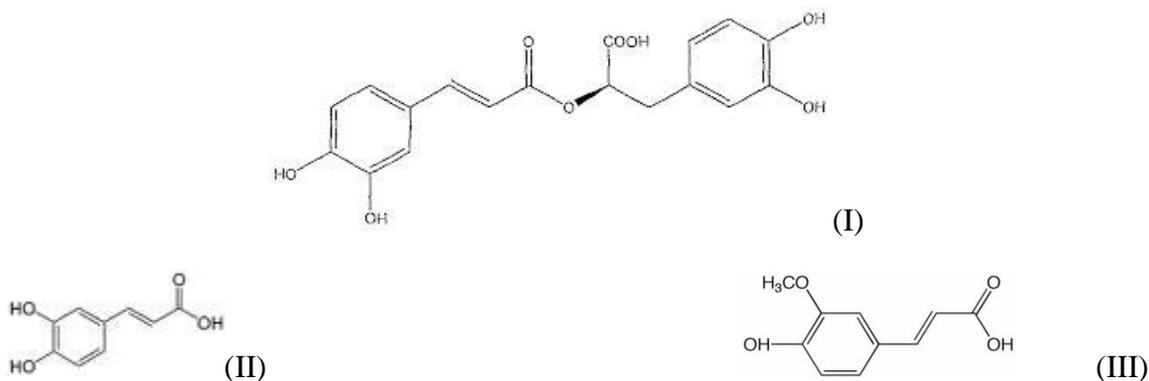
- ✓ leur solubilité dans les solvants courants : on distingue des antioxydants hydrosolubles et liposolubles.
- ✓ leur appartenance à une classe chimique : acides phénoliques, flavonoïdes, tanins, anthocyanes, caroténoïdes...

Parmi les extraits naturels susceptibles d'être utilisés industriellement, figurent les extraits des plantes des *Lamiacées* qui contiennent des teneurs élevées en antioxydants (Zheng et Wang,

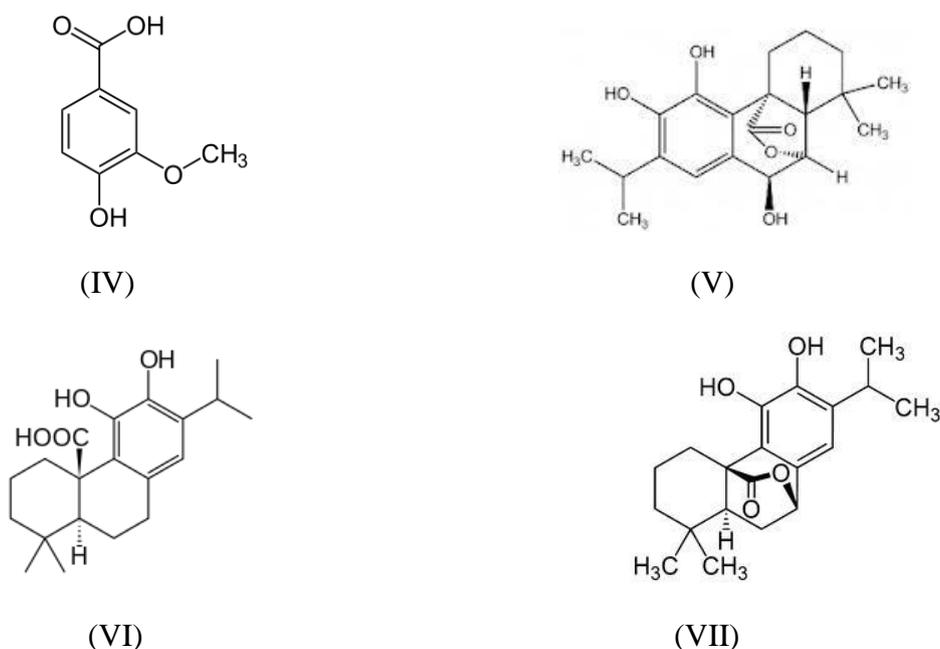
2001 ; Dragland et al.,2003 ; Shan et *al.*, 2005 ; Halvorsen et al.,2006).Appartenant tous deux à cette famille, il est normal que la sauge et le romarin présentent une composition similaire en antioxydants.

Les antioxydants hydrosolubles identifiés dans la sauge et le romarin sont les acides phénoliques, dérivés hydroxylés des acides cinnamique et benzoïque et les diterpènes phénoliques.

Les plus répandus, parmi les dérivés hydroxylés d'acide cinnamique sont l'acide rosmarinique (I), l'acide caféïque (II) et l'acide férulique (III) :



L'acide vanillique (IV) est un dérivé hydroxylé de l'acide benzoïque, alors que le rosmanol (V), l'acide carnosique(VI) et le carnosol (VII) sont des diterpènes phénoliques.



L'acide carnosique, le carnosol et l'acide rosmarinique sont signalés comme les principaux responsables du caractère antioxydant élevé de la sauge et du romarin (Aruoma et al., 1992,

Cuvelier et al., 1996, Richheimer et al., 1996, European Food Safety Authority, 2008) et leur extraction a fait objet de plusieurs brevets, déposés aux Etats-Unis et en Europe.

L'acide carnosique suscite un très grand intérêt dans les domaines de l'agroalimentaire et du biomédical, cependant, on n'en connaît que très peu sur sa fonction dans la plante *in vivo*. A ce sujet Munne-Bosch et al.,(1999) ont constaté que la teneur en constituants diterpéniques hautement oxydés augmente, lorsque la plante est soumise à la lumière et à la sécheresse. Ces constituants seraient, en fait, le résultat de l'activité anti-oxydante de l'acide carnosique.

Une étude, menée sur l'analyse par HPLC des extraits de romarin de différentes provenances dissouts dans du méthanol (Zegarska et al., 1995), a montré que les extraits les plus actifs sont ceux qui contiennent les huit constituants suivants : acide caféique, acide rosmarinique, carnosol, rosmandial, cirsimaritin, genkwanin et acide carnosique. Les auteurs rapportent que l'acide caféique et l'acide rosmarinique sont ceux à plus fort caractère antioxydant, même plus fort que le α -tocopherol.

Par ailleurs, en 1992, Wada et Fang, ont observé un important effet de synergie entre les extraits de romarin (0,02%) et le tocophérol (vitamine E à 0,05%), de la sauge et le BHT. Enfin, Popovici et al.(2009) ont mis en évidence que la structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres. En étudiant les propriétés anti-oxydantes des solutions modèles, contenant plusieurs composés fonctionnels à activité anti-radicalaire, en l'occurrence, l'acide gallique, l'acide tannique et épicatechine, ils observent des effets synergiques, mais aussi antagonistes.

Chapitre II.
Matériels et méthodes

II.1. Matière végétale utilisée

II.1.1. Cueillette

La matière végétale utilisée lors de cette étude provient des lots cultivés à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. Les deux plantes ont été identifiées au sein du Département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger comme étant, respectivement, *Rosmarinus officinalis* L et *Salvia officinalis* L.

La récolte de *Salvia officinalis* L a été effectuée en période de boutonnisation, au début du mois de Mars 2013. *Rosmarinus officinalis* L. a été récolté en période de post-floraison, à la mi-Avril 2013. Les parties utilisées de chaque plante sont les sommités aériennes constituées des feuilles et des tiges.

Chacun de ces lots a été stocké à la température ambiante quasi-constante, égale à 16 ± 1 °C, pour *Salvia officinalis* L. et 20 ± 1 °C, pour *Rosmarinus officinalis* L.

II.1.2. Echantillonnage

Etant donné la répartition aléatoire des feuilles et des tiges lors du conditionnement de la matière végétale et dans le but d'obtenir des échantillons représentatifs du lot mère, nous avons procédé à l'échantillonnage de la matière végétale. Celui-ci permet d'obtenir des échantillons homogènes comportant les mêmes propriétés moyennes que le lot mère, ce qui revient à considérer que chaque élément de la population a une chance égale d'appartenir à un même échantillon (Dagnelle, 1981).

La procédure d'échantillonnage est la suivante:

- ✓ Une fois bien mélangée, la masse de matière végétale du lot mère est étalée sur toute la surface d'un carré.
- ✓ Cette masse est divisée en deux parties identiques, représentant chacune la somme des deux triangles opposés formés par les deux diagonales du carré, comme montré sur la figure II.1 suivante.



Figure II.1 : Echantillonnage de la matière végétale

- ✓ Chaque partie obtenue, est à son tour mélangée et étalée sur la surface d'un carré, puis divisée en quatre triangles identiques. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention de la masse des échantillons désirée.

II.1.3. Détermination du taux d'humidité

La connaissance du taux d'humidité permet d'exprimer le rendement en huile essentielle par rapport à la masse de la matière végétale sèche et ainsi de comparer les rendements en huile essentielle obtenus à partir de différents essais sur la même base : la masse de matière sèche.

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé, avant chaque essai d'extraction, par distillation azéotropique au xylène, dans un appareil de Dean et Stark, présenté à la figure II.2

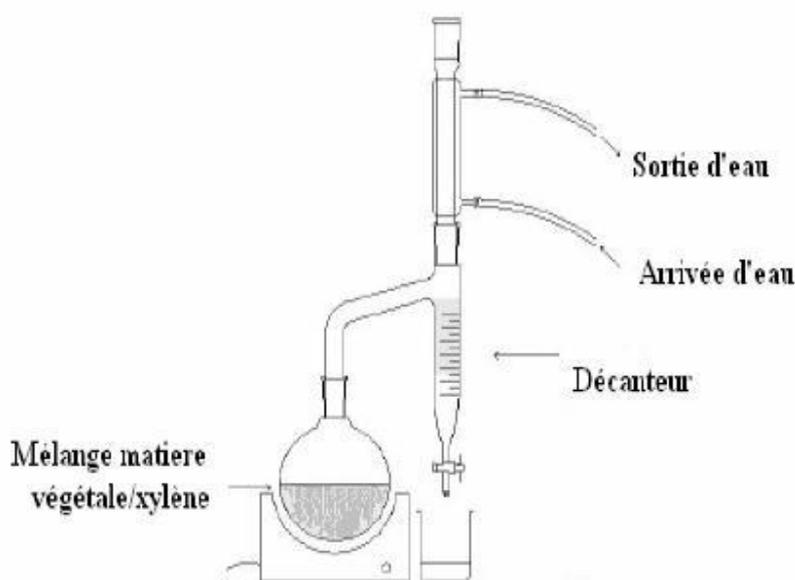


Figure II.2 : Appareil de Dean et Stark

La détermination du taux d'humidité a été réalisée selon la méthode normalisée ISO 1897-2 (site web [8]) et dont le protocole expérimental est le suivant.

Une masse de matière végétale, pesée avec une précision de 10^{-4} g, est introduite dans le ballon et immergée dans le xylène. Le mélange est, ensuite, porté à ébullition. Les vapeurs eau-xylène, refroidies et condensées dans le réfrigérant, sont recueillies dans le tube gradué. Lorsque la phase supérieure, dans ce cas le xylène, atteint le niveau du bras, elle s'écoule et retourne dans le ballon, alors que la phase inférieure, l'eau, reste dans le tube. L'opération est arrêtée lorsque le volume d'eau est constant. Le volume d'eau et la température ambiante sont mesurés avec précision, après une séparation complète des deux phases.

La teneur en eau de la matière végétale, exprimée en pourcentage (%), est calculée par la formule suivante :

$$H = \frac{V_{\text{eau}} \times \rho_{\text{eau}}}{M} \times 100 \quad (\text{II.1})$$

Où par H est désigné le taux d'humidité, en %, V_{eau} est le volume d'eau recueilli dans le tube récepteur, en mL, ρ_{eau} est la masse volumique de l'eau à la température ambiante, en g/mL et M, la masse de la matière végétale humide, en g.

II.2. Appareillage et protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle

Les essais d'hydrodistillation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et de *Salvia officinalis* L. ont été réalisés à l'échelle laboratoire dans le dispositif expérimental schématisé à la figure II.3. Le protocole expérimental et les conditions optimales ont été établis lors des travaux antérieurs (Abdelli, 2010, Charchari et al., 2011).

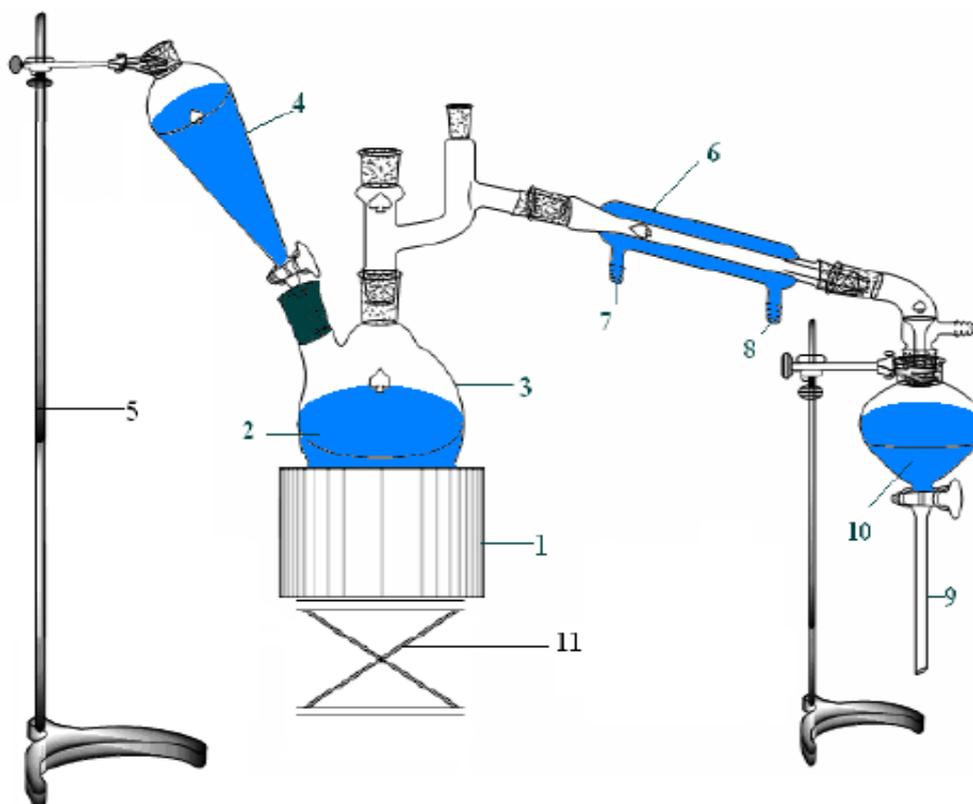


Figure II. 3 : Dispositif expérimental d'hydrodistillation à l'échelle laboratoire

- 1 : Chauffe ballon
- 2 : Mélange eau/matière végétale.
- 3 : Ballon.
- 4 : Ampoule à couler.
- 5 : Support.
- 6 : Réfrigérant.

- 7 : Sortie de l'eau de refroidissement.
- 8 : Entrée de l'eau de refroidissement.
- 9 : Ampoule à décanter, récipient de recette.
- 10 : Distillat
- 11 : Support élévateur.

La matière végétale préalablement pesée, est mise en contact avec l'eau, ou avec une solution aqueuse de tensioactif à 0,5%, dans le ballon de 6 litres. L'ensemble est porté à l'ébullition à pression atmosphérique. Le chauffage est assuré par un chauffe-ballon à puissance de chauffe variable. Les vapeurs d'eau et d'huile essentielle sont refroidies et condensées dans le réfrigérant et le condensât est recueilli dans l'ampoule à décanter. Un système de cohobage a été utilisé, afin de maintenir le volume d'eau dans le ballon constant et de récupérer l'huile essentielle dissoute : les eaux de distillation, recueillies dans l'ampoule à décanter, sont transférées dans l'ampoule à couler et réintroduites dans le ballon.

Le rapport volume d'eau/masse de matière végétale correspond au rapport minimal permettant d'immerger l'intégralité de la matière végétale dans le liquide. Il a été fixé à 16,8. Le débit de vapeur de $18,5 \pm 1,5$ mL/mn en moyenne, est maintenu constant pendant toute la durée d'extraction. Cette dernière a été fixée à 2 h 30 pour *Rosmarinus officinalis* L. et à 4 heures pour *Salvia officinalis* L.

A la fin de l'opération, l'huile est séparée des eaux de distillation par décantation et sa masse est déterminée par pesée. Le rendement en huile est calculé par rapport à la masse de matière sèche selon la relation suivante :

$$R_{HE} = \frac{100 \times m_{HE}}{M_s} \quad (\text{II.2})$$

Où R_{HE} désigne le rendement en huile essentielle, exprimé en pourcentage, m_{HE} et M_s sont, respectivement, les masses, en grammes, de l'huile essentielle et de la matière végétale sèche.

Des échantillons des eaux de distillation sont prélevés et conservés dans le réfrigérateur.

II.3. Extraction des antioxydants de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L. en milieu basique

L'extraction des antioxydants de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L. a fait objet de nombreux brevets américains et européens. Quel que soit le procédé, l'extraction comprend une étape dans laquelle les substances anti-oxydantes seront dissoutes dans un solvant. L'utilisation des solvants organiques, recommandée par certains brevets, présente des inconvénients, liés à leur toxicité et leur prix élevé, mais leur inconvénient majeur réside dans le fait qu'ils ne soient pas sélectifs et risquent d'extraire de nombreuses substances indésirables, entre autres, la chlorophylle et les constituants de l'huile essentielle. De ce fait, des opérations supplémentaires de décoloration et de désodorisation des extraits sont nécessaires. Pour éviter ces inconvénients le brevet US 4,012,531 (Viani,1974) a recommandé l'utilisation des solutions aqueuses basiques, comme solvants sélectifs des antioxydants de nature phénolique.

II.3.1. Principe

Le procédé décrit dans le brevet US 4,012,531 (Viani,1974) consiste en un traitement de la matière végétale par une solution basique ayant un pH dans l'intervalle 8,5 – 10, au cours duquel les composés phénoliques sont transformés en sels, solubles dans l'eau. Bien qu'il soit

tout à fait possible d'utiliser cette fraction soluble en tant que telle, il est parfois préférable d'éliminer l'eau et de récupérer les substances anti-oxydantes sous forme solide, notamment, lorsque leur stockage est envisagé.

Si cela est nécessaire, les sels peuvent être éliminés par différentes méthodes, par exemple la cristallisation ou par ajout d'un acide, pour précipiter les acides. Ils peuvent, aussi, être extraits par un solvant organique tel que, le chlorure de méthylène non miscible à l'eau.

Un autre avantage important du procédé, selon l'invention, réside dans le fait qu'il est possible d'isoler des substances anti-oxydantes dont l'hydrosolubilité et la liposolubilité peuvent être ajustées en fonction des applications envisagées pour ces derniers.

Les exemples présentés dans ce brevet sont regroupés dans le Tableau II.1 suivant.

Tableau II.1 : Conditions opératoires des essais d'extraction des antioxydants de la sauge et du romarin, illustrant l'application de l'invention du brevet US 4,012,531 (Viani,1974)

Matière végétale	Réactif utilisé	pH	Atmosphère	Durée d'extraction, h	Température d'extraction, °C
Romarin	NaHCO ₃	8,6	N ₂	3	55
Romarin	NaHCO ₃	8,6	air	2	90
Romarin	KHCO ₃	8,7	air	2.5	65
Romarin	Na ₂ HPO ₄	9,3	N ₂	2	55
Sauge	NaHCO ₃	8,6	N ₂	1.75	55

Nous avons mis au point un protocole expérimental d'extraction des antioxydants de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L. en s'inspirant des recommandations du brevet US 4,012,531 (Viani,1974).

II.3.2. Dispositifs et protocole expérimental

Les extractions à 60 et à 100°C ont été réalisées en utilisant les dispositifs expérimentaux schématisés sur les figures II.4.et II.5, respectivement.

La matière végétale sèche est broyée et tamisée. Les fractions granulométriques appartenant aux intervalles [125 - 250] µm, pour la sauge, et [250 µm – 1 mm], pour le romarin, ont été utilisées. L'échantillon de matière végétale est introduit dans un ballon d'un litre surmonté d'un réfrigérant à reflux, et mis en contact avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 4%, ayant un pH égal 8,6.

Le rapport du volume de la phase liquide et la masse du solide est fixé à 10. Le contact intime entre les deux phases est assuré par agitation magnétique. Le mélange est maintenu à 60°C ou à 100°C, respectivement, pendant deux heures.

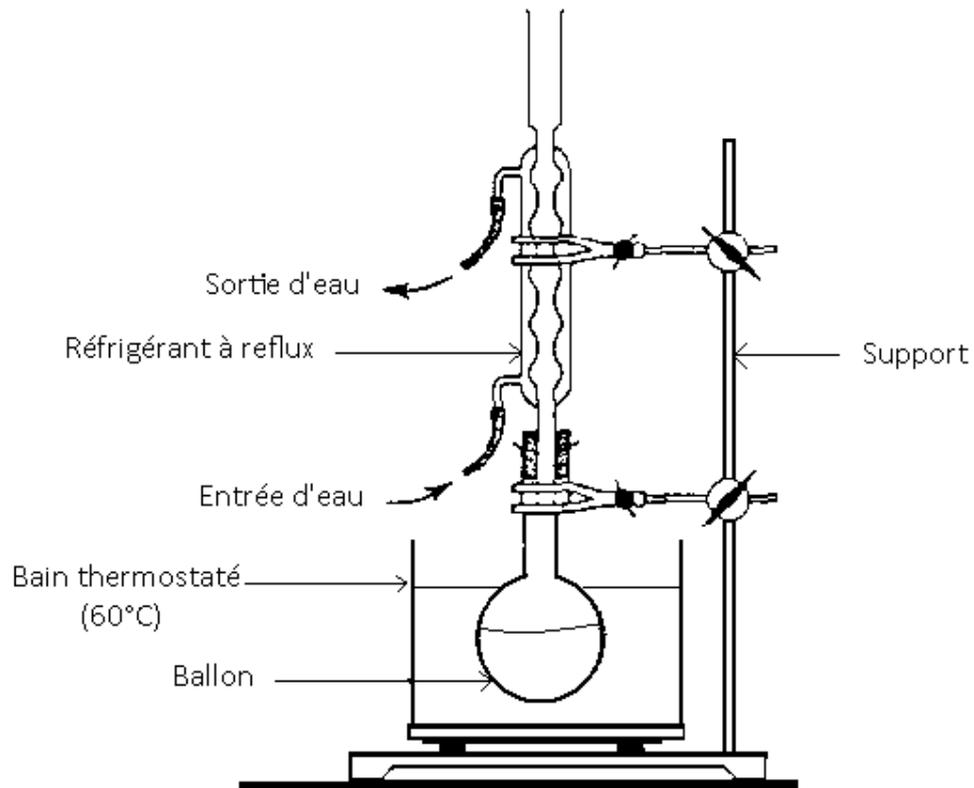


Figure II.4 : Dispositif expérimental de l'extraction en milieu basique à 60°C

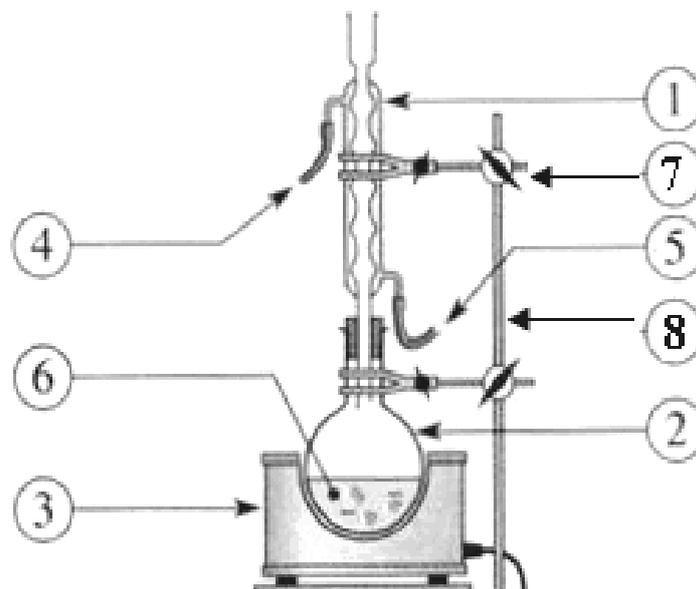


Figure II.5 : Dispositif expérimental de l'extraction en milieu basique à 100°C

1: Réfrigérant à reflux 2: Ballon, 3: Chauffe-ballon, 4:Sortie d'eau, 5: Entrée d'eau, 6: Mélange solide-liquide
7 : Noix de serrage, 8 : Support

A la fin de l'opération, le mélange est filtré, la phase liquide contenant les sels de sodium des composés phénoliques est récupérée et conservée au réfrigérateur.

Des essais d'extraction ont été réalisés en présence de tensioactif non ionique suivant le même protocole expérimental. Dans ce cas, la matière végétale est macérée, pendant 24 heures dans une solution aqueuse de Tween 20 à 0,5 % et la masse nécessaire de bicarbonate de sodium, pour obtenir une solution à 4%, est ajoutée au début de l'extraction.

II.4. Dosage des antioxydants

Le dosage des antioxydants présents dans les eaux de distillation et dans les extraits aqueux, obtenus en milieu basique a été réalisée par la méthode colorimétrique de Folin-Denis, décrite par JIAO et al. (2005).

Le réactif de Folin-Denis est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Ceux-ci sont réduits, en présence des composés phénoliques et en milieu basique, formant un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur du mélange est proportionnelle à la concentration de composés phénoliques oxydés.

II.4.1. Mode opératoire

Un volume de 0,5 mL d'échantillon à doser est versé dans une fiole de 20mL et complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. De cette solution, un volume de 0,1 mL est prélevé, versé dans une fiole de 25mL, contenant 12,5 mL d'eau distillée et 1,25 mL de réactif de Folin-Denis y sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 3 minutes, puis 1,25 mL d'une solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3) sont versés dans la fiole et complétés à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

L'échantillon ainsi préparé est conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 20 minutes. L'absorbance de la solution est mesurée à une longueur de 760 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-VIS Secomam S250.

La concentration en antioxydants, exprimée en mg équivalents d'acide gallique par millilitre de solution à doser, mg EAG/mL, est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage donnant l'évolution de l'absorbance, en fonction de la concentration d'acide gallique, utilisé comme standard.

II.4.2. Expression des résultats du dosage

Le dosage de chaque échantillon a été répété plusieurs fois, afin d'estimer l'erreur expérimentale. Cette dernière a été exprimée par la variance S_y^2 , donnant la dispersion des résultats autour de leur valeur moyenne :

$$S_y = \sqrt{\sum \frac{(y_i - y_m)^2}{(N-1)}} \quad (\text{II.3})$$

Où par y_i sont désignés les résultats des essais répétitifs, y_m est la moyenne arithmétique des valeurs des résultats et N correspond au nombre d'essais répétitifs.

Les résultats du dosage ont été exprimés par : $y_m \pm \frac{s_y}{2}$

Ces résultats ont été utilisés pour la détermination de la teneur en antioxydants, exprimée en mg équivalents d'acide gallique, dans un gramme de matière sèche (Ms) et dans un gramme d'extrait sec (ES): mgEAG/gMs et mgEAG/gES, respectivement.

La concentration en extrait sec, en g/mL, des eaux de distillation et des extraits, obtenus en milieu basique a été déterminée, en procédant au séchage à 40°C, jusqu'au poids constant, d'un millilitre de chacun des échantillons.

II.5. Evaluation des propriétés anti-oxydantes

Il existe plusieurs méthodes permettant d'évaluer l'activité anti-oxydante. Certaines sont basées sur le transfert d'électron singulet, telles, les méthodes ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Re et al. 1999), FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie et al., 1996) et DPPH (2,2'-diphényl-1-picryl-hydrazyle) (Sharma et al., 2009). D'autres, prennent en compte le transfert d'hydrogène, telles que les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo da Silva et al., 1991).

II.5.1. Principe de la réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant

L'activité anti-radicalaire des composés phénoliques contenus dans les eaux de distillation et dans les extraits obtenus en milieu basique, a été évaluée en mesurant leurs capacités à piéger les radicaux libres de DPPH. Dans ce test les antioxydants réduisent le 2,2'-diphényl-1-picryl-hydrazyle, ayant une couleur violette en un composé jaune, le 2,2'-diphényl-1-picryl-hydrazyle, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des radicaux d'hydrogène (Sanchez-Moreno, 2002).

La mesure de l'activité d'un antioxydant sera, alors, relative à celle de la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH, que l'on peut mesurer par spectrophotométrie à 515-518 nm.

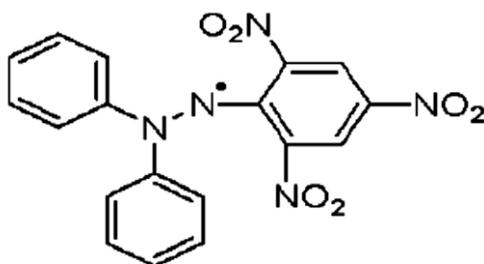
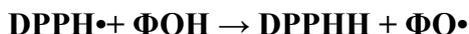
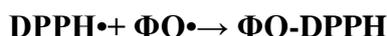
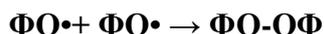


Figure II. 6 : Structure du radical libre DPPH• (2,2 Diphenyl-1-pikryl-hydrazyle)

S'agissant de composés phénoliques ($\Phi\text{-OH}$), le piégeage des radicaux libres par des antioxydants se fera par la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle qui sera transféré sur le DPPH afin de le transformer en une molécule stable DPPHH (Molyneux, 2004; Sanchez-Moreno et al., 1998):



Plusieurs voies réactionnelles qui forment des structures plus ou moins stables sont alors possibles:



Ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de la réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydants donateurs d'hydrogène (Villano et al., 2007).

La capacité anti-radicalaire, ou la capacité à fixer des radicaux libres, donc, à arrêter la propagation de la réaction en chaîne, ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de la réduction, notamment, la durée de la réaction, le rapport massique Antioxydant/DPPH, la nature du solvant utilisé, le pH et le profil phénolique, en particulier (Molyneux, 2004).

II.5.2. Mode opératoire

La solution de DPPH à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ est préparée en diluant 0,040 g de DPPH dans 100mL de méthanol. Cette solution doit être conservée pendant une durée maximale de cinq jours, à l'abri de la lumière et à une température avoisinant les -5°C .

Des solutions aqueuses de concentrations en extrait sec allant de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ont été préparées à partir des eaux de distillation et des extraits obtenus en milieu basique, en absence et en présence de tensioactif, de même que des solutions méthanoliques, des acides ascorbique, gallique et tannique, utilisés comme des standards.

L'appareil est étalonné au méthanol, pour une longueur d'onde de 517 nm avant de procéder à l'analyse.

Un volume de 2 mL de la solution à tester est ajouté à 2 mL de solution de DPPH. Le mélange réactionnel obtenu est agité vigoureusement avant d'être introduit dans la cellule du spectrophotomètre. Celle-ci est ensuite incubée dans l'appareil pendant le temps nécessaire, à la stabilisation de la valeur de l'absorbance.

L'absorbance de la solution de DPPH est mesurée avant de procéder à l'analyse de chaque échantillon. Celle-ci reste pratiquement constante tout au long de la mesure.

II.5.3. Détermination du pourcentage d'inhibition

Le pourcentage d'inhibition (I %) est calculé par la relation II.4 suivante.

$$I(\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{éch}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (\text{II.4})$$

Avec:

- A_{DPPH} : Absorbance de la solution de DPPH pur.
- $A_{éch}$: Absorbance du DPPH en présence de l'échantillon.

Le pourcentage d'inhibition I(%) renseigne uniquement sur la capacité de l'échantillon à une concentration donnée, de réduire ou non les radicaux du DPPH.

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité anti-oxydante d'un composé, les résultats sont souvent comparés à ceux d'un antioxydant de référence, tels que l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique) (Molyneux 2004).

II.5.4. Détermination de la concentration inhibitrice IC_{50}

La concentration inhibitrice IC_{50} est la concentration d'un antioxydant, nécessaire pour provoquer une réduction de l'absorbance du DPPH de 50%.

Ce paramètre a été calculé à partir des équations des courbes, donnant l'évolution du pourcentage d'inhibition I en fonction de la concentration C de l'échantillon, $I = f(C)$, en posant $I = 50\%$.

La capacité anti-oxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa valeur d' IC_{50} est petite.

II.5.5. Détermination de l'indice d'activité anti-oxydante

L'indice d'activité anti-oxydante, IAA, est défini par le rapport (II.8)

$$IAA = \frac{C_{DPPH}}{IC_{50}} \quad (\text{II.5})$$

Où C_{DPPH} est la concentration de la solution du DPPH dans la cellule au moment de l'analyse, et IC_{50} , la concentration inhibitrice à 50%, toutes deux exprimées en $\mu\text{g/mL}$ (Scherer et al., 2009).

L'indice d'activité anti-oxydante est une constante, indépendante des concentrations du DPPH et de l'échantillon.

Selon Scherer et al., (2009), l'échantillon présente une faible activité anti-oxydante, si $IAA < 0,5$, une activité anti-oxydante modérée, pour des valeurs d'IAA entre 0,5 et 1, une forte activité anti-

oxydante, si $1 < IAA < 2$ et une très forte activité anti-oxydante, lorsque la valeur d'IAA est supérieure à 2.

II.5.6. Détermination de l'indice d'efficacité anti-radicalaire

L'indice de l'efficacité anti-radicalaire, IEAR, relie la concentration du DPPH, le temps t_{CE50} et la concentration effective CE_{50} de l'échantillon :

$$IEAR (g/mg.mn) = \frac{1}{(CE_{50} \times t_{CE50})} \quad (II.6)$$

Où CE_{50} et t_{CE50} sont, respectivement, la concentration effective et le temps de la réaction entre DPPH et l'échantillon, nécessaires pour provoquer une réduction de 50% des radicaux du DPPH utilisé.

La détermination expérimentale de ces deux grandeurs nécessite de suivre l'évolution du pourcentage d'inhibition des radicaux du DPPH, en fonction du temps, jusqu'à atteindre un palier. Ceci permet l'estimation du temps d'équilibre, t_e , et la concentration du DPPH à l'équilibre, C_{DPPHe} . La valeur de la concentration initiale du DPPH, C_{DPPH0} , est évaluée, en se référant à une courbe d'étalonnage, donnant l'évolution de l'absorbance, en fonction de la concentration du DPPH, et permet de calculer le pourcentage (%) de DPPH résiduel, $DPPH_{res}$ par la relation (II.10) suivante.

$$DPPH_{res}(\%) = 100 \times \frac{C_{DPPHe}}{C_{DPPH0}} \quad (II.7)$$

Par ailleurs, les données expérimentales permettent de calculer le rapport R_m de la masse, correspondant à différentes concentrations de l'échantillon et de la masse du DPPH.

$$R_m (mg/g) = \frac{M_{éch}}{M_{DPPH}} \quad (II.8)$$

La concentration efficace CE_{50} , exprimée en mg d'extrait par g de DPPH utilisé, est alors déterminée à partir de la courbe, donnant l'évolution du $DPPH_{res}$ en fonction de R_m , en posant $DPPH_{res}=50\%$.

Le temps t_{CE50} , de la réaction entre DPPH et l'échantillon, nécessaire pour provoquer une réduction de 50% des radicaux du DPPH utilisé, est estimé à partir de la courbe, donnant la diminution du pourcentage de $DPPH_{res}$ en fonction du temps.

II.6. Analyse par chromatographie en phase liquide (HPLC)

Les échantillons des eaux de distillation et des extraits obtenus en milieu basique ont été analysés par HPLC à l'aide d'un chromatographe : YI9100 HPLC system muni d'un détecteur UV, dans les conditions opératoires suivantes :

- Colonne de longueur : 50,0mm et de diamètre : 4,6 mm.

- Phase stationnaire C18.
- Phase mobile, constituée de deux solvants : solvant A : mélange d'acétonitrile, eau et acide acétique, dans le rapport volumique 15: 84: 0,85 ; solvant B : méthanol.
- Volume injecté 0,03 mL.
- Durée d'analyse 97minutes, avec un gradient de 0 à 100% de solvant B.
- Débit de la phase mobile 1 mL/mn.

Ces conditions opératoires sont identiques à celles utilisées par Cuvelier et al. (1996).

II.7. Réactifs utilisés

- Tensioactif non ionique Tween 20 (Sigma Aldrich)
- Méthanol (99,7%, Sigma Aldrich)
- Réactif de Folin-Denis (Merck)
- Acide gallique (99,5%, Sigma)
- Acide ascorbique (PA, Panreac)
- Acide tannique (purissimum, Panreac)
- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Aldrich)
- Carbonate de sodium (99%, Rectapur)
- Bicarbonate de sodium (99,5%, Prolabo)
- Acide acétique (Prolabo)
- Acétonitrile (Merck)
- Xylène (Fluka)

Chapitre III.
Résultats et discussions

Influence de la durée de stockage de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle

Afin d'étudier l'influence de la durée du stockage sur le rendement en huile essentielle, nous avons procédé à l'extraction par hydrodistillation des échantillons représentatifs des lots de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L., stockés à l'air libre et à la température ambiante du laboratoire. Cette dernière, mesurée quotidiennement, a été, en moyenne, de $16 \pm 1^\circ\text{C}$ et de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, respectivement, lors du stockage de la sauge et du romarin. L'évolution des rendements en huile essentielle, en fonction de la durée du stockage de la matière végétale, est illustrée par les figures III.1 et III.2 suivantes.

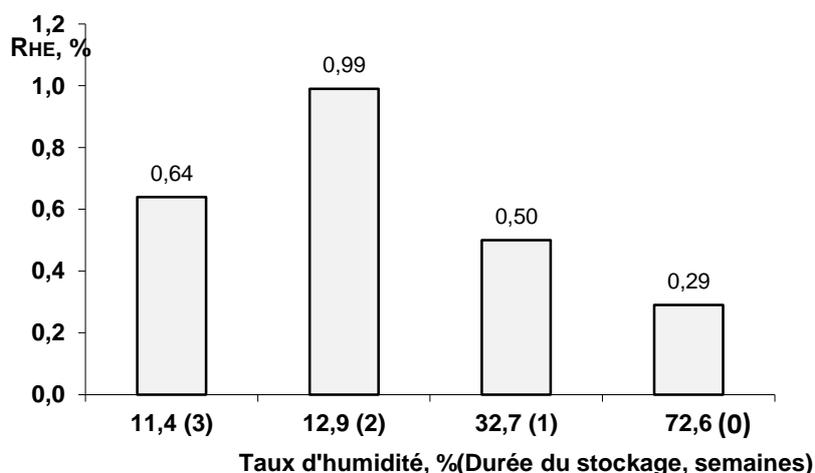


Figure III. 1 : Hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée de stockage.

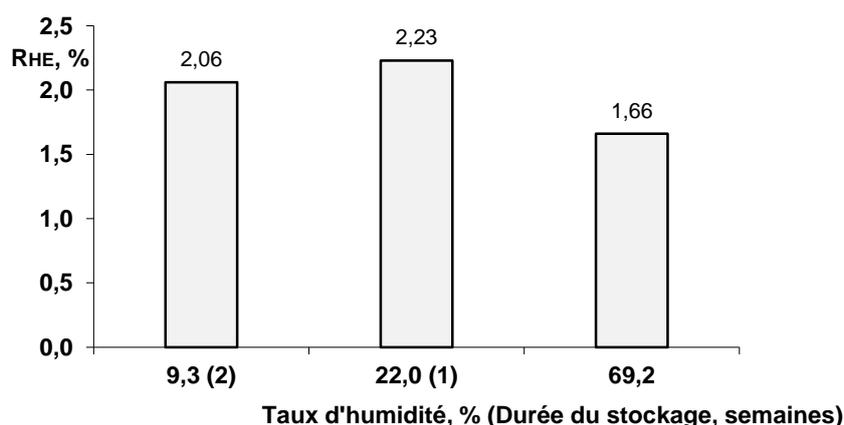


Figure III. 2 : Hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée de stockage.

Nous observons un maximum du rendement en huile essentielle au terme de la deuxième semaine du stockage de *Salvia officinalis* L. et après une semaine de stockage du *Rosmarinus officinalis* L.

Cette évolution du rendement en huile pourrait être attribuée au fait qu'elle soit affectée par deux processus compétitifs et contradictoires :

- ✓ la formation, pendant le stockage, des composés terpéniques constituant l'huile essentielle, issus du métabolisme glucidique. Ce processus dépend de la température et de la teneur en eau dans les tissus végétaux. Il s'agit d'une fonction particulière des cellules sécrétrices, appelée respiration terpénique (Gueorguiev, 1995; Silou et al., 2002).
- ✓ l'évaporation de l'huile essentielle pendant le stockage.

Il semble que la formation des métabolites secondaires soit le processus prédominant pendant la première semaine du stockage à 20°C de *Rosmarinus officinalis* L., et pendant la deuxième semaine du stockage à 16°C de *Salvia officinalis* L. Au-delà de ces durées, la déshydratation avancée de la plante conduit au ralentissement, voire, l'arrêt de la respiration terpénique, et par conséquent, le processus d'évaporation de l'huile devenu prépondérant provoque la diminution du rendement en huile essentielle.

Une telle évolution des rendements en huile essentielle de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L., en fonction de la durée du stockage, a été rapportée par des travaux antérieurs (Rougou, 2012, Haddou et Hammouche, 2012).

III.2. Influence du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur le rendement en huile essentielle

Les essais d'hydrodistillation des échantillons de la matière végétale de différents taux d'humidité, macérée pendant 24 heures dans des solutions aqueuses de tensioactif, nous a permis d'évaluer l'influence de ce prétraitement sur le rendement en huile essentielle. Les résultats obtenus pour *Salvia officinalis* L. et pour *Rosmarinus officinalis* L. sont représentés sur les figures III.3 et III.4, respectivement.

On remarque que quel que soit le taux d'humidité de la matière végétale, les rendements en huile obtenus en présence de tensioactif, sont supérieurs à ceux obtenus sans tensioactif. Ceci pourrait s'expliquer, d'une part, par la solubilisation sélective des cires épicuticulaires et des membranes cellulaires par le tensioactif, créant ainsi des ouvertures qui améliorent les échanges de matière. D'autre part, la micellisation de l'huile essentielle par le tensioactif, due à l'orientation de ses molécules amphiphiles, avec leur partie hydrophobe vers l'huile essentielle et leur partie hydrophile vers l'eau, facilite son hydrodiffusion vers les interfaces solide-liquide, puis liquide-vapeur, d'où l'huile est entraînée par le flux de vapeur.

Par ailleurs, on constate une diminution de l'écart du rendement en huile essentielle obtenue en présence et en l'absence du tensioactif, avec la diminution du taux d'humidité de la matière végétale.

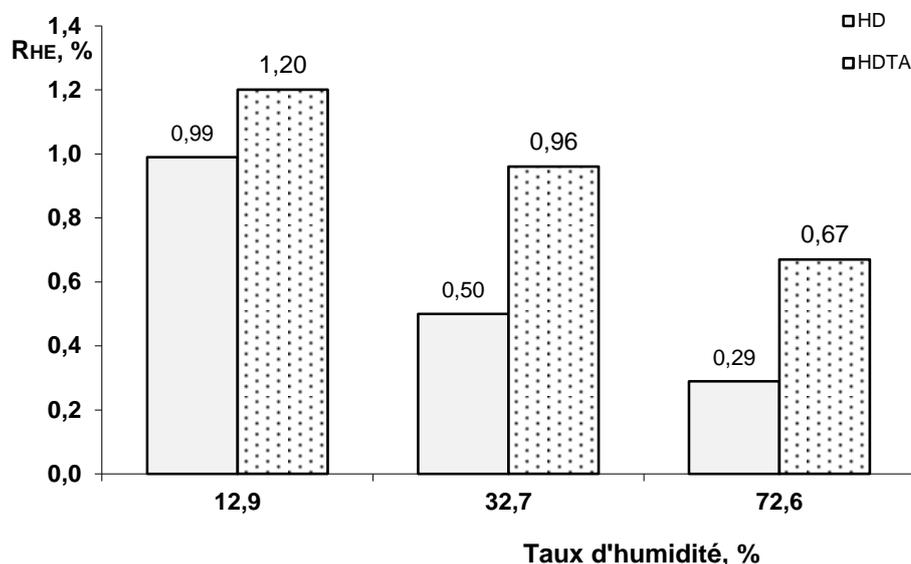


Figure III. 3 : Hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA). Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction du taux d'humidité.

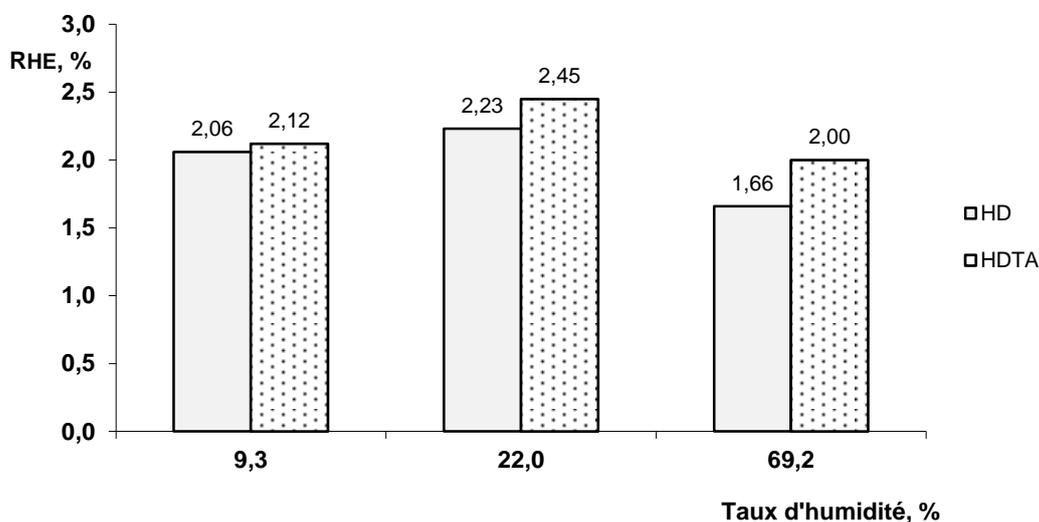


Figure III. 4 : Hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA). Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction du taux d'humidité.

En effet, la déshydratation des tissus végétaux au cours du stockage rend plus perméables les cuticules des trichomes contenant l'huile essentielle. Par conséquent, l'impact de l'effet solubilisant du tensioactif s'estompe au fur et à mesure que la matière végétale sèche et il

contribue à l'augmentation du rendement en huile essentiellement par sa propriété de former des micelles, favorisant de cette manière, l'hydrodiffusion de l'huile.

III.3. Influence de la durée de stockage et du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur la teneur en composés phénoliques des eaux de distillation

Le pH de l'ensemble des échantillons des eaux de distillation a été mesuré et trouvé égal à 5,5. Cette valeur du pH signifie la présence des composés à caractère acide, en l'occurrence, des acides carboxyliques et des composés phénoliques. Aussi, nous avons procédé à la détermination, par la méthode de Folin-Denis, de la concentration des composés phénoliques dans les eaux de distillation collectées lors des essais d'hydrodistillation, avec et sans prétraitement par tensioactif, des échantillons de *Salvia officinalis* L et de *Rosmarinus officinalis* L., stockés pendant une, deux et trois semaines.

La courbe d'étalonnage, utilisée à cet effet, donnant la variation de l'absorbance, en fonction des concentrations des solutions aqueuses d'acide gallique, allant de 0,01 à 0,08 mg/mL, est une droite, passant par l'origine, de pente égale à 0,7106 et de coefficient de corrélation $R^2=0,9996$:

$$A=0,7106.C \quad (III.1)$$

Les résultats du dosage, exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG), par millilitre des eaux de distillation (mg/mL), par gramme de matière sèche (mg/g Ms) et par gramme d'extrait sec (mg/gES), sont réunis dans les tableaux III.1 et III.2 suivants.

Tableau III.1 :Résultats du dosage des composés phénoliques dans les eaux de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. de différents taux d'humidité (H), sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA)

H, %	HD			HDTA		
	EAG± Sr* mg/mL	EAG ± Sr mg/g Ms	EAG± Sr mg/g ES	EAG± Sr mg/mL	EAG ± Sr mg/g Ms	EAG± Sr mg/g ES
12,9	1,46 ± 0,04	24,56± 0,67	71,05± 1,93	1,51 ± 0,02	25,27 ± 0,33	63,86 ± 1,18
32,7	1,56 ± 0,06	26,35 ± 1,01	96,42 ± 3,69	1,55 ± 0,00	26,11 ± 0,00	77,79 ± 0,00
72,6	1,46 ± 0,00	24,54 ± 0,00	87,12 ± 0,00	1,51 ± 0,02	25,25 ± 0,35	101,06 ± 1,34

*Sr : variance de dispersion des de résultats au tour de leur valeur moyenne

Tableau III.2 :Résultats du dosage des composés phénoliques dans les eaux de l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. de différents taux d'humidité (H), sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA)

H, %	HD			HDTA		
	EAG ± Sr mg/mL	EAG ± Sr mg/g Ms	EAG ± Sr mg/g ES	EAG ± Sr mg/mL	EAG ± Sr mg/g Ms	EAG ± Sr mg/g ES
9,3	1,49 ± 0,08	25,07 ± 1,39	86,73 ± 4,63	1,53 ± 0,02	25,78 ± 0,28	87,15 ± 1,13
22,0	1,58 ± 0,03	26,77 ± 0,34	88,05 ± 1,57	1,53 ± 0,14	26,68 ± 1,21	80,31 ± 7,29
69,2	1,72 ± 0,00	28,84 ± 0,00	131,06 ± 0,00	1,69 ± 0,08	28,37 ± 1,34	105,54 ± 4,98

Les valeurs relativement faibles de la variance de dispersion des résultats au tour de leur valeur moyenne, témoignent de la reproductibilité satisfaisante des résultats du dosage. Afin de mieux apprécier l'évolution des teneurs en composés phénoliques, en fonction du taux d'humidité de la matière végétale, nous les avons présentés graphiquement sur les figures III.5 et III.6, respectivement.

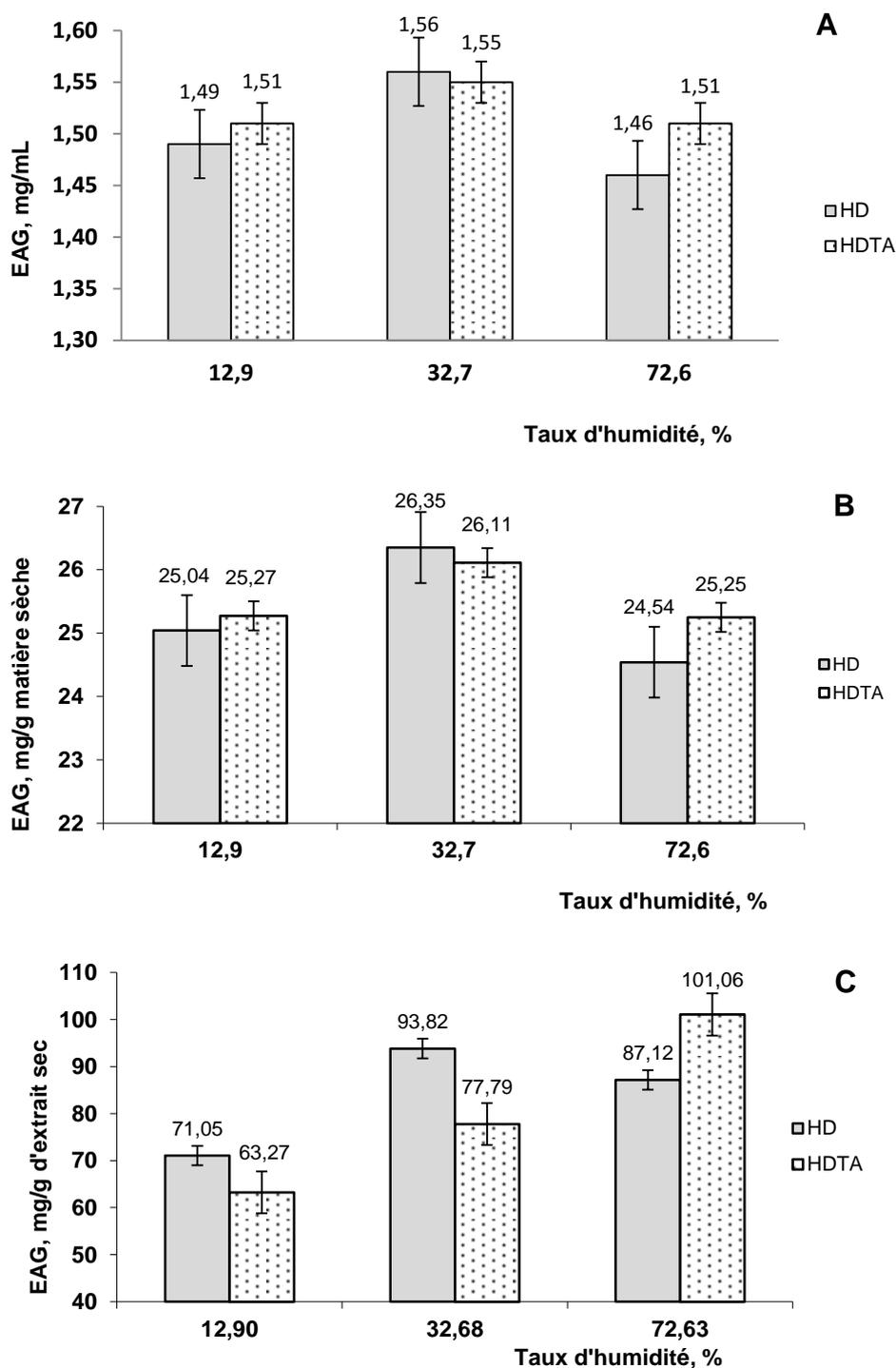


Figure III. 5 : Hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA). Teneurs en composés phénoliques, en mg EAG, par mL d'eau de distillation(A), par gramme de matière végétale sèche(B) et par gramme d'extrait sec(C)

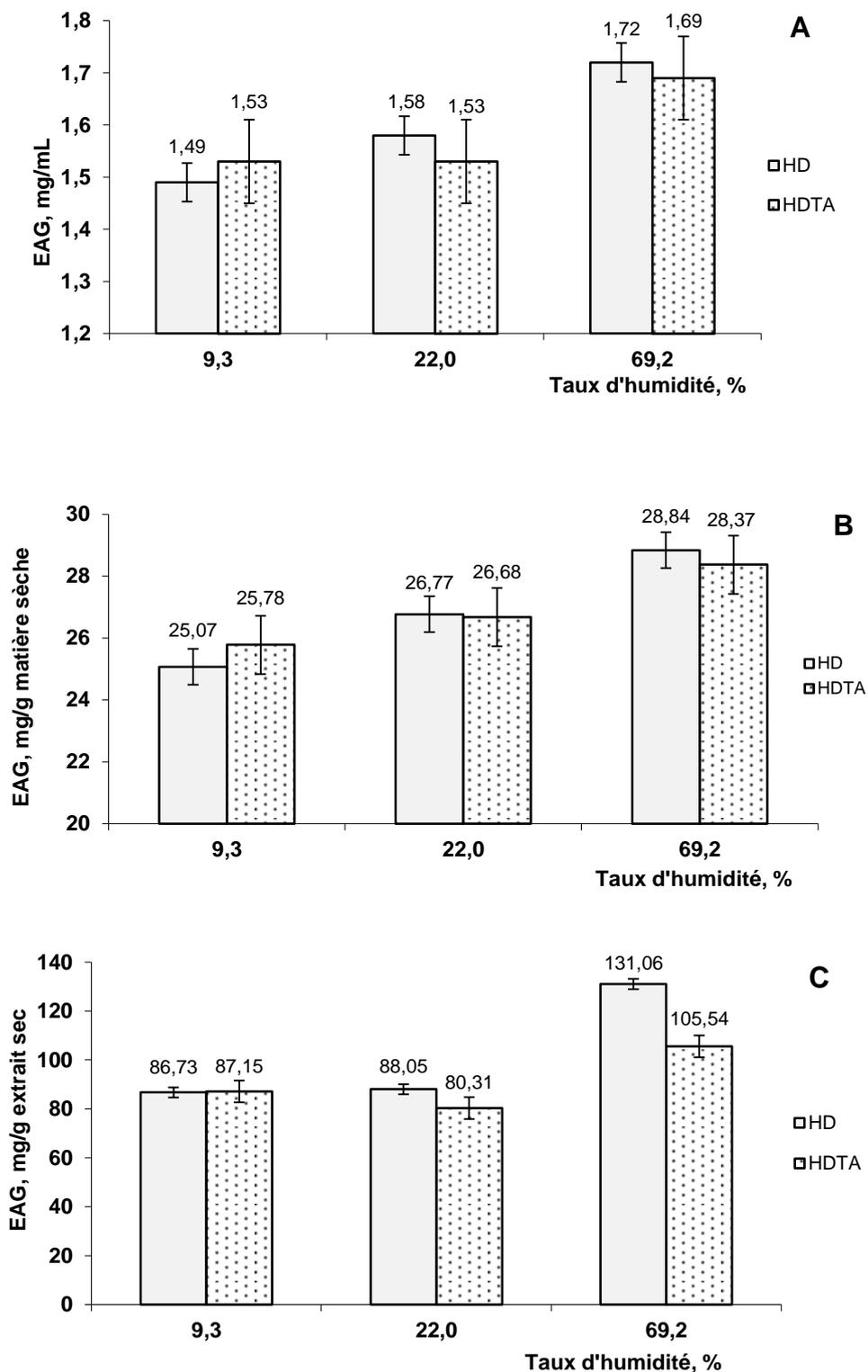


Figure III. 6 :Hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA). Teneurs en composés phénoliques, en EAG, par mL d'eau de distillation(A), par gramme de matière végétale sèche(B) et par gramme d'extrait sec(C)

L'examen des figures III.5 et III.6 laisse supposer que, mis à part de leur solubilité dans l'eau, donc, de leur structure chimique, la teneur en composés phénoliques dans les eaux de distillation, dépend de deux processus compétitifs et contradictoires. En effet, des réactions du métabolisme secondaire, déclenchées par les stress oxydatif, hydrique et lumineux auxquels sont exposés les tissus végétaux pendant le stockage de la plante, conduisent, en présence d'eau et à une température convenable, à la formation des métabolites secondaires parmi lesquels, des constituants des huiles essentielles, mais aussi des composés phénoliques. D'autre part, les composés phénoliques, initialement présents dans la plante peuvent être transformés, au cours des réactions d'inhibition des radicaux libres, soit en d'autres composés phénoliques, de structure chimique différente, soit en molécules n'appartenant pas à la classe des dérivés phénoliques. A titre d'exemple, des travaux antérieurs (Munné-Bosch, Alegre, 2001) font état de l'action *in vivo* de l'acide carnosique, l'un des antioxydants les plus puissants de la sauge et du romarin. En piégeant les radicaux libres, il se transforme en un autre antioxydant, le rosmanol et un dérivé ortho méthylé, inerte vis-à-vis des radicaux libres. Un autre exemple est la transformation de l'acide gallique, acide phénolique, en pyrogallol, un tri-phénol vicinal (Ivanov, 1967).

Dans le cas de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. en absence de tensioactif (HD), nous constatons, sur la figure III.5 A, B et C, que l'évolution de la teneur en composés phénoliques, en fonction du taux d'humidité de la plante, présente un maximum. Comme pour l'huile essentielle, cette allure serait à attribuer à la prédominance, pendant les deux premières semaines du stockage, des réactions du métabolisme secondaire, donnant lieu à la formation des composés phénoliques. La diminution de la quantité d'eau dans les tissus végétaux conduirait à l'arrêt de ces réactions et, donc, à une réduction de la teneur en composés phénoliques due à la formation des produits issus des réactions de l'oxydation des composés phénoliques.

Nous remarquons, par ailleurs, que la teneur en composés phénoliques dans les eaux de distillation est plus élevée lorsque la plante subit un prétraitement par tensioactif, en début et en fin de stockage (figure III.5 A, HDTA). Ceci nous suggère que les métabolites secondaires produits au cours du stockage de la plante ou issus du stress oxydatif, pourraient avoir différentes affinités avec le tensioactif.

Enfin, la teneur en composés phénoliques, exprimée par mg EAG/g ES, relative aux essais d'hydrodistillation en présence de tensioactif (figure III.5 C, HDTA), présente une allure décroissante. Ceci est probablement dû au fait, qu'en présence de tensioactif, la teneur en extrait sec dans les eaux de distillation augmente, suite à la solubilisation et micellisation des constituants de la plante, autres que les composés phénoliques et, par conséquent, la teneur de ces derniers devient inférieure à celle obtenue par hydrodistillation sans tensioactif.

Dans le cas de l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. l'évolution de la teneur en composés phénoliques dans les eaux d'hydrodistillation sans tensioactif, en fonction du taux d'humidité de la plante, présente une allure décroissante (figure III.6 A, HD). On pourrait, alors, supposer qu'au cours du stockage de la matière végétale, les réactions de transformation

des composés phénoliques prédominent celles de leur formation, suite au métabolisme secondaire.

On constate, par ailleurs, que le prétraitement avec tensioactif de la plante ne provoque l'augmentation de la teneur en composés phénoliques dans les eaux de distillation, que lors de l'hydrodistillation de la plante sèche, probablement, en raison d'une structure différente des composés phénoliques que cette dernière renferme.

III.4. Influence de la température d'extraction et du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur la teneur en composés phénoliques des extraits obtenus en milieu basique

Les résultats des essais d'extraction en milieu basique à 60 et 100°C, avec et sans prétraitement de la matière végétale par tensioactif, des échantillons représentatifs de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L., nous ont permis d'apprécier l'influence de ces deux paramètres sur la teneur en composés phénoliques des extraits.

Ces résultats sont réunis dans les tableaux III.3 et III.4 suivants.

Tableau III.3 : Résultats du dosage des composés phénoliques dans les extraits de *Salvia officinalis* L., obtenus en milieu basique à 60 et 100°C, sans et avec prétraitement par tensioactif

T, °C	Sans tensioactif			Avec tensioactif		
	EAG ± Sr* mg/mL	EAG ± Sr mg/g Ms	EAG ± Sr mg/g ES	EAG ± Sr mg/mL	EAG ± Sr mg/g Ms	EAG ± Sr mg/g ES
60	1,01 ± 0,00	11,63 ± 0,00	17,53 ± 0,00	1,49 ± 0,00	27,73 ± 0,00	32,12 ± 0,88
100	2,52 ± 0,02	28,92 ± 0,23	33,77 ± 0,27	1,66 ± 0,04	20,89 ± 0,50	35,61 ± 1,51

*Sr : variance de dispersion des de résultats au tour de leur valeur moyenne

Tableau III.4 : Résultats du dosage des composés phénoliques dans les extraits de *Rosmarinus officinalis* L., obtenus en milieu basique à 60 et 100°C, sans et avec prétraitement par tensioactif

T, °C	Sans tensioactif			Avec tensioactif		
	EAG ± Sr mg/mL	EAG ± Sr mg/g Ms	EAG ± Sr mg/g ES	EAG ± Sr mg/mL	EAG ± Sr mg/g Ms	EAG ± Sr mg/g ES
60	1,77 ± 0,12	29,34 ± 1,28	31,4 ± 2,06	1,67 ± 0,02	26,85 ± 0,32	25,88 ± 0,31
100	2,18 ± 0,06	34,98 ± 0,96	32,12 ± 0,88	2,35 ± 0,10	37,69 ± 1,60	31,63 ± 1,51

L'examen des résultats du dosage des composés phénoliques dans les extraits obtenus en milieu basique montre que leur teneur, en mg EAG, est plus élevée dans les extraits obtenus à 100°C, avec et sans prétraitement de la matière végétale par le tensioactif. Ceci pourrait être attribué, à notre avis, à la solubilité dans l'eau des composés phénoliques, plus élevée à

100°C. Ceci témoigne, en outre, de leur stabilité à cette température, la présence de ces composés dans les eaux de distillation en est la preuve.

En revanche, le prétraitement de la matière végétale par le tensioactif, semble ne pas affecter la teneur en composés phénoliques des extraits des deux plantes de la même manière. En effet, si l'on se réfère à l'action du tensioactif sur les membranes cellulaires, à son pouvoir de micellisation et la localisation endogène des composés phénoliques (Bravo, 1998 ; Munné-Bosch, Alegre, 2001), les extraits obtenus en sa présence devraient être plus riches en composés phénoliques. Or, on remarque que ce n'est pas le cas, en ce qui concerne les extraits de *Salvia officinalis* L., obtenus à 100°C et ceux de *Rosmarinus officinalis* L., obtenus à 60°C. Par ailleurs, nous avons constaté lors des essais d'extraction en milieu basique, une différence des valeurs de pH des extraits : 8,5 pour ceux, obtenus à 60°C et 11, pour les extraits obtenus à 100°C. Aussi, nous avons réalisé deux expériences à 100°C, dans les mêmes conditions opératoires, avec et sans ajout de tensioactif, en substituant la matière végétale par l'acide gallique. Dans les deux cas une augmentation de pH, de 8,5 à 11 a été observée. Le dosage par la méthode de Folin-Denis des solutions obtenues, a donné deux valeurs différentes pour la teneur en acide gallique : 0,18 mg/mL, pour l'essai réalisé sans tensioactif et 0,31 mg/mL, pour celui réalisé avec tensioactif, alors que la même quantité d'acide gallique, 0,15mg/mL, a été utilisée lors des deux expériences. Il est clair que le pH fortement basique et la présence de tensioactif ont pour conséquence une surestimation des concentrations.

Aussi, nous avons déterminé la concentration des composés phénoliques dans un échantillon des eaux de distillation, en doublant le volume du carbonate de sodium, préconisé par le protocole du dosage. La concentration en composés phénoliques, ainsi déterminée, s'est avérée être le double de celle obtenue en respectant strictement le mode opératoire.

A ce stade de l'étude, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses relatives à l'interférence du tensioactif et du pH de l'échantillon à doser. Par exemple, l'augmentation du pH, pourrait être attribuée aux réactions de décarboxylation, en milieu basique de l'acide gallique et, par conséquent, des acides phénoliques, lors de l'extraction de la matière végétale, ou encore, des réactions de trans-estérification qui pourraient se produire entre le tensioactif, un ester de l'acide laurique, et les acides phénoliques extraits.

III.5. Evaluation du potentiel antioxydant des eaux de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L.

Nous avons procédé à l'évaluation de la capacité de piégeage du radical libre DPPH, de l'ensemble des échantillons des eaux de distillation récupérées lors de l'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L.

III.5.1. Détermination de la concentration inhibitrice IC₅₀

Afin de déterminer la concentration, en µg EAG/mL, des eaux de distillation nécessaire à la diminution de l'absorbance du DPPH de 50%, nous avons préparé des solutions aqueuses des échantillons des eaux de distillation, de concentrations 10, 20, 30, 40 et 50 µg/mL. Les mesures de l'absorbance de la solution méthanolique du DPPH pur et en présence de l'échantillon à tester ont été effectuées pendant le temps nécessaire à la stabilisation de la

valeur de l'absorbance. Nous avons calculé les pourcentages d'inhibition $I, \%$, correspondant aux différentes concentrations. Ces données expérimentales nous ont permis de tracer les courbes, donnant l'évolution de l'absorbance, A , du DPPH et du pourcentage d'inhibition, I , en fonction de la concentration de l'échantillon. A titre d'exemple, la figure III.7 présente l'allure générale des courbes $A=f(C)$ et $I=f(C)$, obtenues pour chacun des échantillons des eaux de distillation, où C est la concentration en extrait au moment de la mesure.

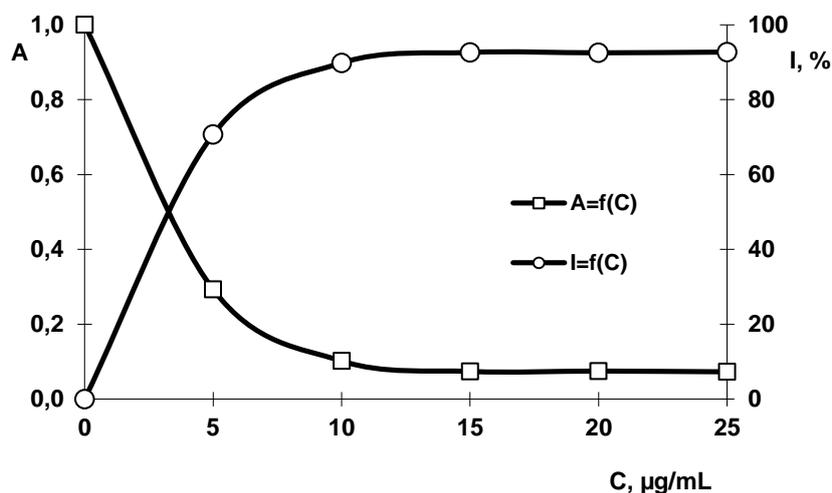


Figure III. 7 : Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'échantillon testé

La reproductibilité des mesures de l'absorbance, en fonction du temps, a été appréciée par les résultats de deux essais répétitifs, présentés à la figure III.8.

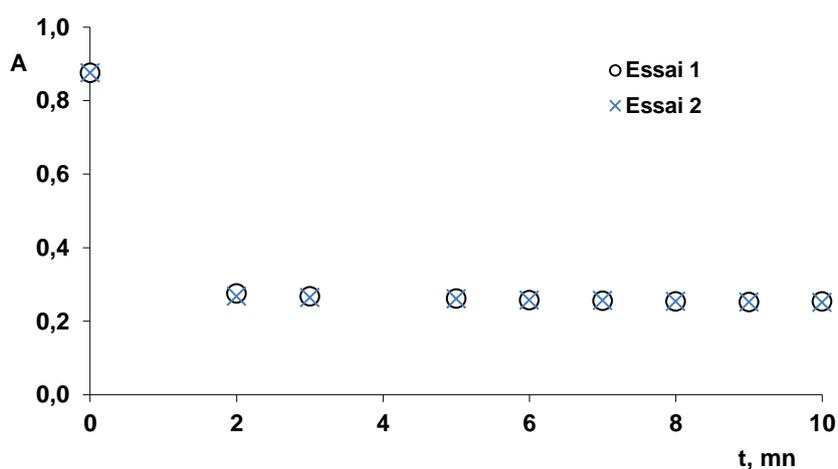


Figure III. 8 : Evolution de l'absorbance de la solution DPPH en présence de l'échantillon, en fonction du temps

Sur cette figure III.8, les valeurs de l'absorbance de l'essai 1, présentées par des ronds, et celles de l'essai 2, par des croix, sont pratiquement identiques et mettent en évidence l'excellente reproductibilité des mesures. Par ailleurs, on constate que la réaction d'inhibition des radicaux du DPPH est très rapide, pour cet échantillon, car les valeurs de l'absorbance convergent vers une valeur constante au terme de deux minutes.

Les valeurs des concentrations IC_{50} des échantillons des eaux de distillation des deux plantes, ont été déterminées, à partir des courbes $I=f(C)$, en posant $I=50$. Ces valeurs sont réunies dans les tableaux III.5 et III.6. ci-après.

III.5.2. Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire

Pour la détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire (IAA), nous avons utilisé une courbe d'étalonnage, établie au préalable, donnant l'évolution de l'absorbance des solutions méthanoliques du DPPH, en fonction de sa concentration. Dans le domaine des concentrations allant de 5 à 40 $\mu\text{g/mL}$, la courbe d'étalonnage est une droite, passant par l'origine, de pente, égale à 0,032 de coefficient de corrélation $R^2=1$.

$$A = 0,032.C \quad (\text{III.2})$$

Nous avons eu recours à la courbe d'étalonnage, afin d'estimer la concentration exacte de la solution du DPPH dans la cellule, au moment de la mesure de l'absorbance.

Les indices d'activité anti-radicalaire de l'ensemble des échantillons des eaux de distillation, calculés par le rapport de cette concentration et la concentration IC_{50} , déterminée précédemment, sont rapportés dans les tableaux III.5 III.6. ci-après.

III.5.3. Détermination de l'indice d'efficacité anti-radicalaire

Les indices d'efficacité anti-radicalaire, IEAR, de l'ensemble des échantillons des eaux de distillation, calculés par la procédure décrite dans le paragraphe II.5.6. du chapitre II, sont regroupés dans les tableaux III.4 et III.5. suivants.

Tableau III. 5 : Valeurs des IC_{50} , IAA et IEAR des échantillons des eaux de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. de différents taux d'humidité (H), sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA)

H, %	HD			HDTA		
	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	IAA	$IEAR.10^4$ gDPPH/mgES.mn	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	IAA	$IEAR.10^4$ gDPPH/mgES.mn
12,9	3,86	4,08	2,98	4,01	4,07	2,97
32,7	3,71	3,94	3,62	3,99	3,86	4,89
72,6	3,93	4,32	4,56	3,58	4,50	5,20

Tableau III. 6 : Valeurs des IC₅₀, IAA et IEAR des échantillons des eaux de l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. de différents taux d'humidité (H), sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA)

H, %	HD			HDTA		
	IC ₅₀ µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgES.mn	IC ₅₀ µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgES.mn
9,3	4,03	3,92	3,60	3,81	4,10	2,97
22,0	3,54	4,41	2,85	3,91	4,03	3,68
69,2	3,34	4,82	3,55	3,78	4,30	3,78

De la même façon ont été déterminées les valeurs IC₅₀, IAA et IEAR des acides ascorbique (AA), gallique (AG) et tannique (AT), utilisés comme composés de référence. Ces valeurs figurent dans le tableau III.7 suivant.

Tableau III. 7 : Valeurs des IC₅₀, IAA et IEAR des composés de référence

Echantillon	IC ₅₀ µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgES.mn	IEAR.10 ⁴ Sanchez-Moreno et al.(1999)
AA	2,58	5,97	11,67	11,44
AG	3,96	5,81	2,54	2,62
AT	4,96	4,64	0,57	0,57

L'examen des valeurs des tableaux III.5, III.6 et III.7, nous permet de formuler les remarques suivantes :

- ✓ Les valeurs des concentrations IC₅₀ des eaux de distillation augmentent, de manière générale, lorsque le taux d'humidité de la matière végétale diminue, à l'exception de celle des eaux obtenues lors de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. fraîche. Ces valeurs, variant entre 3,34 et 4,50µg/mL, sont inférieures à IC₅₀ de l'acide tannique (antioxydant faible) et proches de celle de l'acide gallique, considéré comme étant un antioxydant de potentiel intermédiaire (Popovici et al, 2010).
- ✓ L'ensemble des échantillons des eaux de distillation présentent une forte activité anti-oxydante car leurs indices IAA sont supérieurs à 2 (Scherer et al., 2009)..
- ✓ Les indices d'efficacité anti-radicalaire, IEAR, de l'ensemble des échantillons des eaux de distillation, variant entre 2,85 et 5,20, sont supérieurs à celui de l'acide gallique. Ces résultats ne sont pas en contradiction avec les conclusions relatives aux valeurs des concentrations IC₅₀, permettant de considérer les eaux de distillation comme étant des antioxydants de potentiel intermédiaire, comme l'acide gallique. Rappelons que l'indice d'efficacité anti-radicalaire tient compte, aussi bien de la concentration en antioxydants, que du temps de la réaction entre l'antioxydant et le radical DPPH. Or, nous avons observé que les échantillons des eaux de distillation réagissaient rapidement avec les radicaux du DPPH.

Enfin, on note que les valeurs des indices de l'efficacité anti-radicalaire des composés de référence sont très proches de ceux rapportés par Sanchez-Moreno et al, (1999)

III.6. Evaluation des capacités anti-oxydantes des extraits de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L., obtenus en milieu basique

Le potentiel de piégeage du radical libre DPPH de l'ensemble des extraits, obtenus par extraction de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L. en milieu basique, a été évalué par les valeurs de la concentration en extrait, nécessaire à la diminution de l'absorbance du DPPH de 50%, IC_{50} , et par les indices d'activité anti-oxydante, IAA, et d'efficacité anti-radicalaire, IEAR.

Comme précédemment, nous avons tracé les courbes donnant l'évolution de l'absorbance, A, du DPPH et du pourcentage d'inhibition, I, en fonction de la concentration de chaque extrait. L'allure générale des courbes $A=f(C)$ et $I=f(C)$ des extraits, obtenus en milieu basique, est illustrée à la figure III.9.

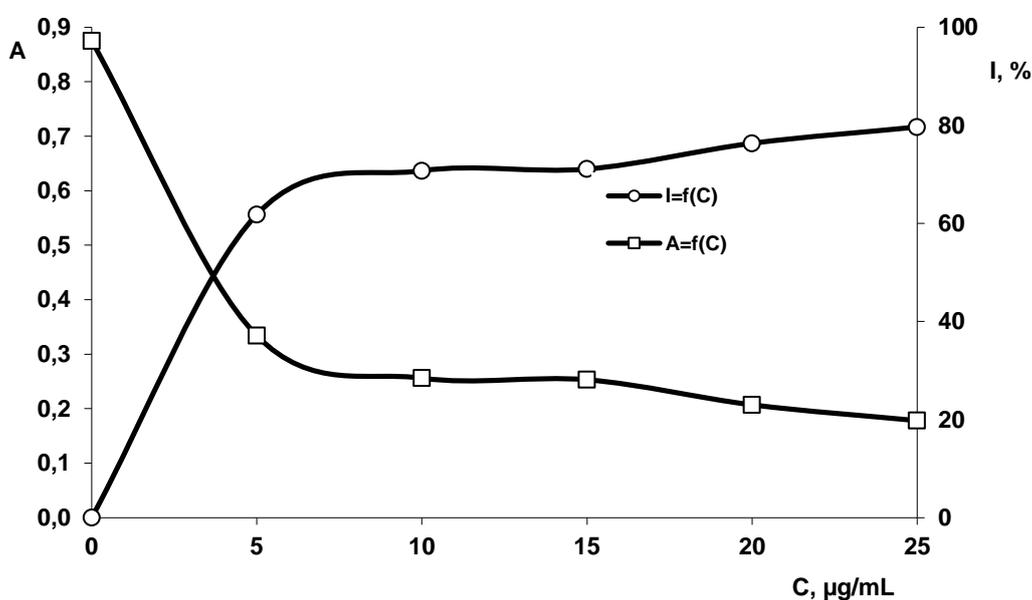


Figure III. 9 : Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'extrait testé

Pour les faibles concentrations, allant jusqu'à $10\mu\text{g/mL}$, on note une similitude des allures de ces courbes et celles obtenues avec les échantillons des eaux distillation (figure III.8). Au-delà de $10\mu\text{g/mL}$, ces dernières tendent vers un palier, tandis que, sur la figure III.9, on observe une forte diminution de l'absorbance du DPPH provoquant l'augmentation du pourcentage d'inhibition.

A notre avis, cette diminution de l'absorbance du DPPH peut être due, entre autres, à la formation, par les réactions de piégeage du DPPH, des produits qui sont eux-mêmes des antioxydants et réagissent avec les radicaux DPPH résiduels, ou encore, une interférence provoquée par la couleur jaune foncé des solutions concentrées des extraits. Nous avons

constaté, en effet, après avoir effectué des mesures, une absorbance non négligeable des solutions des extraits de concentrations supérieures à 20 µg/mL à la longueur d'onde 517nm. Néanmoins, nous avons pu utiliser les courbes, $I=f(C)$, pour la détermination des concentrations inhibitrices IC_{50} , et des indices IAA et IEAR, étant donné que le point de la courbe correspondant au pourcentage d'inhibition égal à 50% est situé, pour l'ensemble des extraits, sur la partie linéaire de celle-ci.

Les valeurs des concentrations IC_{50} et des indices d'activité anti-oxydante, IAA, et d'efficacité anti-radicalaire, IEAR, des extraits obtenus en milieu basique, sont présentés dans les tableaux III.8 et III.9 suivants.

Tableau III. 8: Valeurs des IC_{50} , IAA et IEAR des extraits en milieu basique de *Salvia officinalis* L. à différentes températures, sans et avec prétraitement par tensioactif (TA)

T, °C	Sans TA			Avec TA		
	IC_{50} µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgES.mn	IC_{50} µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgES.mn
60	4,74	3,23	3,1	4,97	3,06	2,1
100	4,04	3,38	5,2	5,00	3,06	6,1

Tableau III. 9: Valeurs des IC_{50} , IAA et IEAR des extraits en milieu basique de *Rosmarinus officinalis* L. à différentes températures, sans et avec prétraitement par tensioactif

T, °C	Sans TA			Avec TA		
	IC_{50} µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgES.mn	IC_{50} µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgES.mn
60	4,70	3,33	2,8	4,72	3,33	2,3
100	4,57	3,46	3,2	4,74	3,28	2,5

L'examen des valeurs des tableaux III.8 et III.9, suscite les remarques suivantes :

- ✓ Les extraits de *Rosmarinus officinalis* L. possèdent un meilleur potentiel anti-radicalaire, car les valeurs de leurs concentrations IC_{50} sont inférieures et leurs indices IAA et IEAR, supérieurs à ceux des extraits obtenus de *Salvia officinalis* L., à l'exception de celui, obtenu de cette dernière à 100°C, sans tensioactif.

Ce résultat est en accord avec les travaux publiés à ce sujet (Pokorny et al, 1997, Pokorny et al, 1998).

Pour les mêmes raisons :

- ✓ Les extraits des deux plantes, obtenus à 100°C avec et sans tensioactif, possèdent, pour la plupart, un potentiel anti-radicalaire supérieur à celui des extraits obtenus à 60°C.

Ceci pourrait être attribué, à notre avis, à l'augmentation de la solubilité des composés phénoliques à 100°C.

- ✓ Les extraits des deux plantes obtenus sans prétraitement par tensioactif, quelle que soit la température d'extraction, possèdent, à une exception près, des indices d'efficacité anti-radicalaires supérieurs à ceux des extraits obtenus en présence de tensioactif.

Ceci est en contradiction avec certains résultats du dosage des composés phénoliques des extraits. A titre d'exemple, l'extrait de *Salvia officinalis* L., obtenu à 100°C sans tensioactif a un IEAR égal à $5,2 \cdot 10^{-4}$, inférieur à celui, $6,1 \cdot 10^{-4}$, de l'extrait obtenu à 100°C en présence de tensioactif, alors que la teneur des composés phénoliques dans ce dernier est plus faible. La même contradiction est observée pour les extraits de *Rosmarinus officinalis* L. obtenus à 60°C, avec et sans prétraitement par tensioactif.

À notre avis, ces résultats doivent être considérés avec beaucoup de réserve, étant donné la surestimation des concentrations des composés phénoliques obtenus à 100°C, due aux valeurs élevées du pH de ces échantillons.

III.7. Potentiel antioxydant des huiles essentielles

Nous avons procédé à l'évaluation de la concentration inhibitrice IC₅₀ et des indices d'activité anti-oxydante, IAA, et d'efficacité anti-radicalaire, IEAR, des huiles essentielles, par la méthode du DPPH. A cet effet, des solutions méthanoliques des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L., obtenues par hydrodistillation, sans et avec prétraitement de la matière végétale par tensioactif, ont été testées.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.10 suivant.

Tableau III. 10: Valeurs des concentrations d'inhibition IC₅₀, IAA et IEAR des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L.

Matière végétale	H, %	HD			HDTA		
		IC ₅₀ µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgHE.mn	IC ₅₀ µg/mL	IAA	IEAR.10 ⁴ gDPPH/mgHE.mn
<i>R.officinalis</i> L.	22,0	21,80	0,71	0,026	23,94	0,65	0,017
<i>S. officinalis</i> L.	12,9	24,70	0,62	0,014	-	-	-

L'huile essentielle de *Salvia officinalis* L. obtenue en présence de tensioactif, de couleur jaune foncée, n'a pas pu être analysée, car elle-même a une absorbance appréciable à la longueur d'onde de l'analyse de 517nm.

Les huiles essentielles de *Salvia officinalis* L et de *Rosmarinus officinalis* L présentent un faible potentiel antioxydant, comparé à celui des eaux de distillation, qui se traduit par une valeur relativement élevée de la concentration IC₅₀, un indice d'activité anti-oxydante inférieur à 1 et un indice d'efficacité anti-radicalaire inférieur à 10⁻⁴. Toutefois, les valeurs

d'IC₅₀ de nos huiles sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature (Bozic et al.,2007).

Le potentiel antioxydant des huiles essentielles pourrait être attribué à la présence de certains constituants majoritaires, à potentiel antioxydant élevé, ou à l'effet de synergie entre les composés présents en faibles proportions (Abdalla et al., 1999). C'est le cas de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L, contenant du thymol à l'état de traces. Par contre, la teneur en composés phénoliques dans l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L est nettement plus élevée. (Annexe I).

Nous observons, en outre, que les valeurs d'IC₅₀, IAA et IEAR indiquent un meilleur potentiel antioxydant de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L, obtenue sans prétraitement de la matière végétale par tensioactif. Ce résultat est en accord avec les teneurs en composés phénoliques, estimées à 5,88% et à 3,14%, respectivement, dans les huiles obtenues sans et avec prétraitement de la matière végétale par tensioactif.

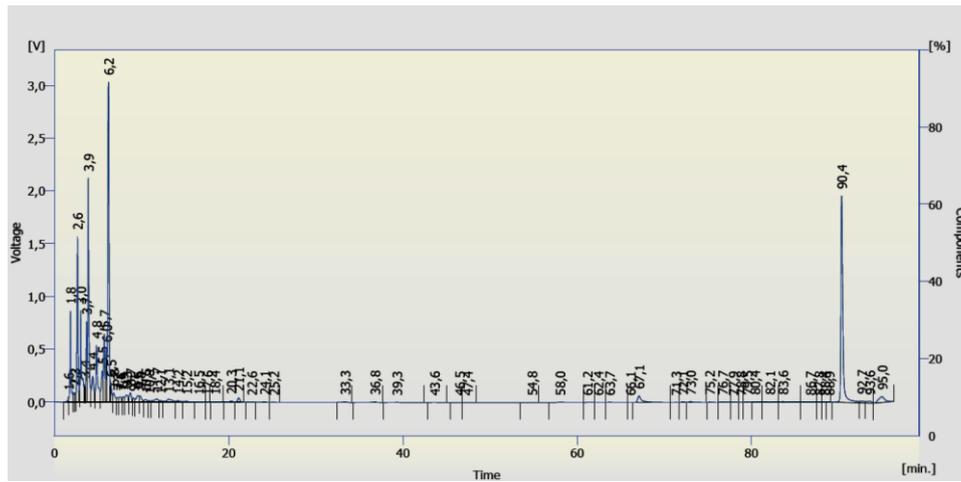
III. 8. Analyse par chromatographie en phase liquide

Nous avons analysé par chromatographie en phase liquide (HPLC) les échantillons des eaux de distillation recueillies lors des essais de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. fraîche, sans et avec prétraitement par tensioactif, et l'échantillon de l'extrait obtenu en milieu basique à 100°C, de la matière végétale non traitée par tensioactif.

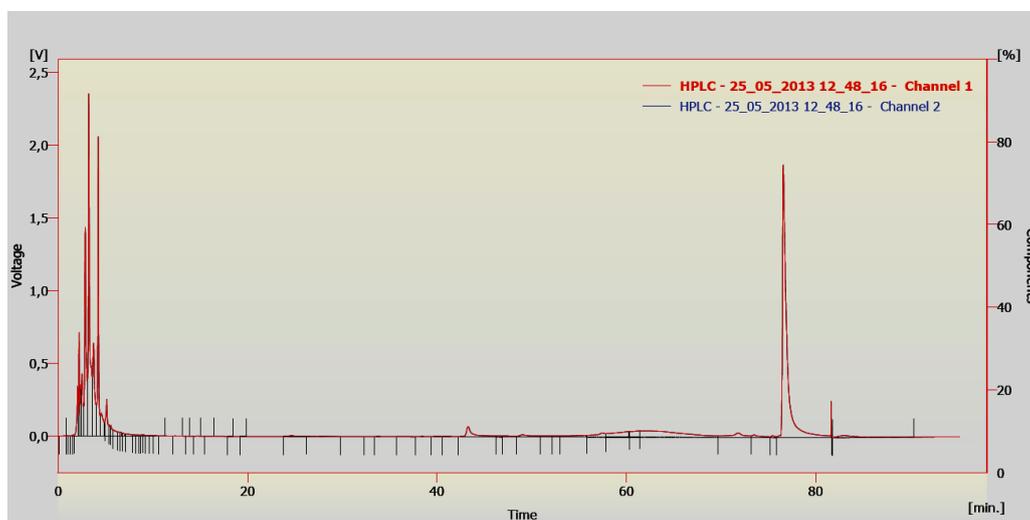
Les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la figure III.10. Sur cette figure, le chromatogramme A est celui des eaux d'hydrodistillation de la matière végétale, non traitée par tensioactif, le chromatogramme B correspond à l'échantillon des eaux d'hydrodistillation de la matière végétale fraîche, prétraitée avec tensioactif et par C est désigné le chromatogramme de l'extrait, obtenu en milieu basique à 100°C, sans prétraitement avec tensioactif.

On observe, dans l'ensemble des chromatogrammes, deux parties distinctes, comprises entre 0 et 13 minutes, pour la première, et entre 55 et 95 minutes, pour la seconde. A défaut des étalons, nous n'avons pas pu réaliser l'identification des constituants des échantillons analysés. Cependant, les chromatogrammes des extraits de *Salvia officinalis* L., présentés en annexe II, nous ont fournis des informations relatives à l'ordre d'éluion des constituants identifiés.

A



B



C

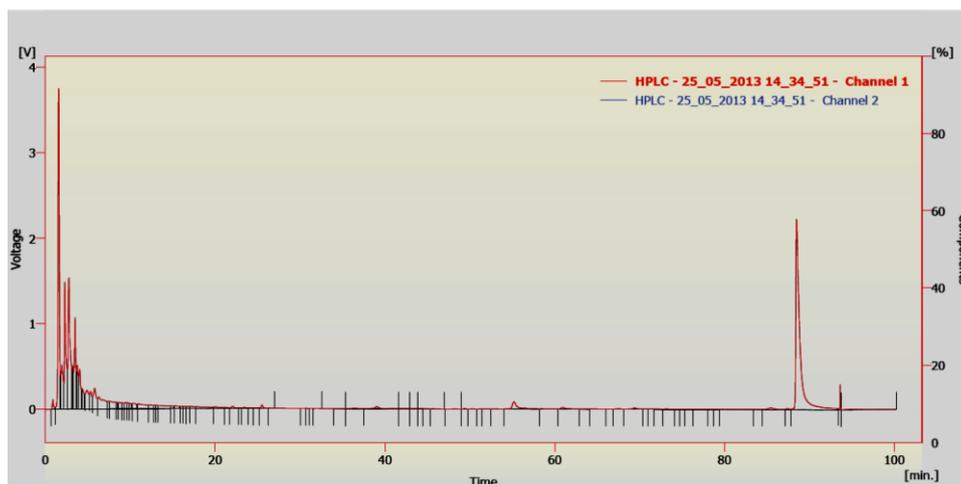


Figure III.10 : Chromatogrammes des échantillons des eaux de distillation, issues de l'hydrodistillation *Salvia officinalis* L. sans (A) et avec (B) prétraitement par tensioactif et de l'extrait obtenu en milieu basique (C)

On remarque qu'au début des chromatogrammes, les composés élués appartiennent à la classe chimique des acides phénoliques, tels que les acides rosmarinique, caféïque, férulique. D'autre part, tous les pics, ayant des temps de rétention supérieurs à 50 minutes, ont été identifiés comme étant ceux des diterpènes phénoliques et leurs dérivés, notamment, dans ordre croissant des temps de rétention, le carnosol, le rosmadial, l'acide carnosique et le méthyl-carnosate.

En examinant les chromatogrammes des échantillons analysés, nous observons que leurs allures sont différentes, ce qui suggère des différences de composition, aussi bien du point de vue qualitatif, que quantitatif. Aussi, pour apprécier ces différences, nous avons estimé les sommes des surfaces des pics, élués en début et à la fin des chromatogrammes, en les attribuant respectivement aux teneurs totales en acides phénoliques et en dérivés des diterpènes phénoliques. Le tableau III.11 regroupe les résultats obtenus.

Tableau III.11 : Teneurs relatives en acides phénoliques en diterpènes phénoliques dans les eaux de distillation et dans l'extrait en milieu basique de *Salvia officinalis* L.

Teneur relative, %	Echantillon		
	HD	HDTA	Extrait
Acides phénoliques	62,1	43,9	57,9
Diterpènes phénoliques	21,0	47,4	26,6

Nous constatons que la teneur en diterpènes phénoliques est la plus élevée dans les eaux de distillation issues de l'hydrodistillation de la plante ayant subi un prétraitement avec tensioactif. Cette teneur est la plus faible dans l'échantillon des eaux de l'hydrodistillation en absence de tensioactif, par contre, la teneur en acides phénoliques y est la plus élevée.

Dans un souci d'établir un lien entre le potentiel anti-radicalaire de ces échantillons et les teneurs de ces deux classes de composés phénoliques qu'ils renferment, nous avons présenté, sur la figure III.11, leurs concentrations inhibitrices IC_{50} et leurs indices IAA et IEAR.

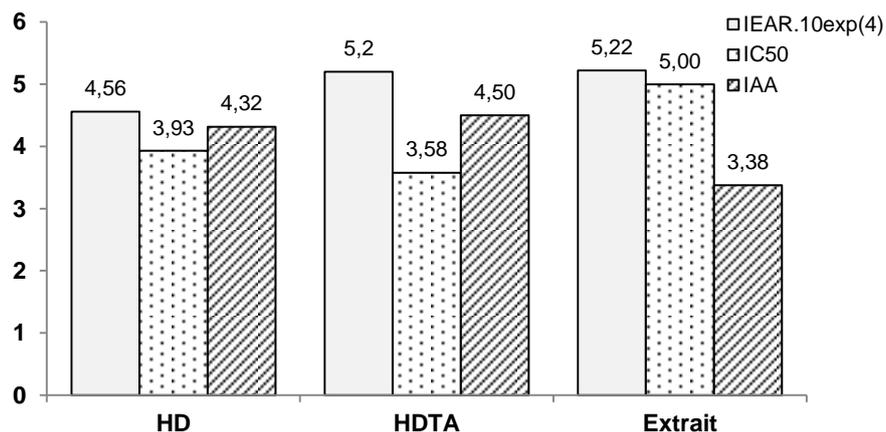


Figure III.11 : Valeurs des IC_{50} , IAA et IEAR des échantillons des eaux de distillation sans (HD) et avec prétraitement par tensioactif (HDTA) et de l'extrait en milieu basique de *Salvia officinalis* L.

On observe que l'échantillon HDTA, le plus riche en diterpènes phénoliques, a la concentration inhibitrice IC_{50} la plus faible et les indices d'activité anti-oxydante, IAA, et d'efficacité anti-radicalaire, IEAR, les plus élevés. Ce résultat laisse penser que les diterpènes phénoliques seraient meilleurs antioxydants que les acides phénoliques et est en accord avec les résultats de travaux antérieurs (Aruoma et al, 1993, Cuvelier et al, 1996, Lo et al, 2002).

Conclusion

Cette étude traite de l'extraction, par hydrodistillation, des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L., provenant des lots cultivés à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la durée de stockage et du prétraitement, avec tensioactif non ionique, de la matière végétale sur le rendement en huile. Par la suite, nous avons évalué le potentiel antioxydant des eaux de distillation, recueillies lors de l'hydrodistillation, afin d'envisager leur valorisation, ainsi que celui des extraits obtenus par extraction en milieu basique des composés phénoliques, selon le protocole expérimental d'un brevet US, et des huiles essentielles de ces deux plantes.

L'étude de l'évolution du rendement en huile essentielle, en fonction du taux d'humidité de la plante, a montré que ce dernier atteint un maximum de 0,99% au terme de la deuxième semaine de stockage de *Salvia officinalis* L. et de 2,23% après une semaine de stockage du *Rosmarinus officinalis* L. A notre avis, deux processus compétitifs et contradictoires sont à l'origine de cette évolution, en l'occurrence, la formation de métabolites secondaires issus de la respiration terpénique de la plante et l'évaporation de l'huile pendant le stockage.

Par ailleurs, nous avons constaté une augmentation du rendement en huile essentielle, lors du prétraitement de la matière végétale par une solution de tensioactif, allant jusqu'à 131% pour la sauge et 20,5% pour le romarin. Nous avons attribué ceci à la solubilisation sélective, par le tensioactif, des membranes cellulaires, favorisant les échanges de matière, et d'autre part, à la micellisation de l'huile essentielle, facilitant son hydrodiffusion. Quant à la diminution de l'efficacité du tensioactif, constatée lors de l'hydrodistillation des plantes séchées, elle pourrait être expliquée, à notre avis, par la déshydratation des tissus végétaux les rendant plus perméables et minimisant ainsi l'impact positif du rôle solubilisant du tensioactif. Aussi, l'amélioration du rendement observée, serait due, essentiellement, à la formation de micelles en sa présence.

Le dosage, par la méthode de Folin-Denis, des composés phénoliques des eaux de distillation obtenues lors de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. et *Rosmarinus officinalis* L., a permis de constater et de suivre l'évolution de leur teneur en fonction du taux d'humidité de la matière végétale. Pour la sauge, un maximum de 101,06mgEAG/gES a été observé au terme de deux semaines de stockage, période pendant laquelle les réactions du métabolisme secondaire, engendrant des composés phénoliques, seraient prédominantes. Dans le cas du romarin, cette évolution a une allure décroissante, de 131,06 à 86,73mgEAG/gES, respectivement, lors de l'hydrodistillation des échantillons de la plante fraîche et sèche. Ceci est probablement dû à la prépondérance des réactions d'oxydation des composés phénoliques sous l'effet du stress oxydatif, hydrique et lumineux aux quels est exposée la matière végétale pendant le stockage.

La teneur en composés phénoliques des eaux, issues de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. et *Rosmarinus officinalis* L., ayant subi un prétraitement par tensioactif, suit la même évolution en fonction du taux d'humidité de la matière végétale. Cependant, ces teneurs ce sont avérées plus élevées lorsque la plante subit un prétraitement par tensioactif, en début et en fin de stockage. Ceci laisse penser que les métabolites secondaires, produits au cours du

stockage de la plante ou issus du stress oxydatif, pourraient avoir différentes affinités avec le tensioactif.

L'extraction des antioxydants de *Salvia officinalis* L et de *Rosmarinus officinalis* L en milieu basique, a montré que la teneur en composés phénoliques est plus importante lorsque celle-ci est réalisée à 100°C. Ceci pourrait être attribué à l'augmentation de la solubilité dans l'eau de ces composés à une température de 100°C. Cependant, nous soupçonnons une surestimation des résultats du dosage de ces extraits à cause de leur pH élevé, conséquence, probablement, des réactions de décarboxylation des acides phénoliques en milieu basique. Par ailleurs, nous avons constaté expérimentalement que la méthode du dosage est très sensible au pH du milieu. Comme dans le cas des eaux de distillation, il semble que l'effet du tensioactif sur la teneur en composés phénoliques dépend de la nature de ceux-ci.

Les résultats de l'analyse, par HPLC, des échantillons des eaux collectées lors de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L., avec et sans prétraitement par tensioactif, et de l'extrait de cette plante obtenu à 100°C en milieu basique, ont confirmé cette hypothèse. Ne disposant pas des étalons de composés susceptibles de se trouver dans les échantillons analysés, nous avons pu, toutefois, distinguer, en se basant sur des travaux antérieurs, la présence des composés phénoliques appartenant à deux classes chimiques différentes, en l'occurrence, des acides phénoliques et des diterpènes phénoliques. Il s'est avéré que ces deux classes sont présentes en différentes proportions dans chacun des échantillons, mettant en évidence des différences de leur composition, aussi bien sur le plan qualitatif, que quantitatif. La teneur relative en diterpènes phénoliques, signalés dans la littérature comme étant des antioxydants très puissants, se révèle être plus importante dans les eaux de l'hydrodistillation de la plante prétraitée avec tensioactif, alors que les acides phénoliques prédominent dans les eaux de distillation issues de l'hydrodistillation de la matière végétale non traitée par tensioactif.

L'évaluation, par le test d'inhibition du radical DPPH, du potentiel antioxydant des échantillons analysés a corroboré les résultats de l'analyse par HPLC. En effet, l'échantillon des eaux de l'hydrodistillation de la plante prétraitée avec tensioactif, le plus riche en diterpènes phénoliques, a la concentration inhibitrice IC₅₀ la plus faible et les indices d'activité anti-oxydante et d'efficacité anti-radicalaire les plus élevés.

La comparaison des concentrations inhibitrices IC₅₀ et des indices d'activité anti-oxydante et d'efficacité anti-radicalaire de l'ensemble des échantillons à ceux des antioxydants de référence, en l'occurrence, les acides ascorbique, gallique et tannique, a montré que leur potentiel antioxydant est proche, voire supérieur pour certains, de celui de l'acide gallique.

Cette étude, loin d'être achevée, a permis, néanmoins, de mettre en évidence la présence des antioxydants hydrosolubles dans les eaux issues de l'hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. et de *Rosmarinus officinalis* L., d'élucider leur nature chimique, d'évaluer leur potentiel antioxydant et d'envisager leur éventuelle récupération. La valorisation de ce sous-produit de l'extraction des huiles essentielles présente des intérêts économiques et environnementaux évidents.

Bibliographie

- **Abdalla A. E. and. Roozen J. P.(1999)** Food Chem.64p 323–329.
- **Abdelli M. (2010)** Extraction des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L., de *Rosmarinus officinalis* L. et de *Coriandrum Sativum* L. par hydrodistillation en présence de tensioactifs, Mémoire de magister, ENP, Département de Génie chimique, Alger.
- **Alaux S (2005)** Fiche technique huile essentielle biologique romarin cinéole, *Rosmarinus officinalis* L., laboratoire Florame aromathérapie.
- **Alaux S (2005)** Fiche technique huile essentielle biologique romarin verbénone, *Rosmarinus officinalis* L., laboratoire Florame aromathérapie.
- **Alaux S (2006)** Fiche technique huile essentielle biologique romarin camphré, *Rosmarinus officinalis* L., laboratoire Florame aromathérapie.
- **Arab S., Beddar B. (2011)** Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.: extraction, composition chimique, propriétés physiques et antimicrobiennes. Projet de fin d'études, ENP, Département Génie Chimique, Alger.
- **Aruoma O. I., Halliwell B, Aeschbah R and Loliger J, (1992)** Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid, *Xenobiotica*, 22, 257–68.
- **Baudrand-Alzieu V. (1995)** Synthèse des monoesters et diesters de tetraethyleneglycol, et des acides gras du ricin par estérification auto catalytique en milieu concentré. Thèse de l'INP Toulouse.
- **Baydar H., Baydar N. (2005)** *Industrial Crops and Products*, vol. 21, p.p. 251- 255.
- **Beauquesne B, Pinkas L, Tork M (1980)** *Plantes médicinales des régions tempérées*, Edition Masson.
- **Belkhiri F. (2009).** Activité antimicrobienne et anti-oxydante des extraits du *Tymus communis* L. et *Carthamus caerleus* L. Mémoire de Magister, Université de SETIF. P 26-27 47.
- **Bensebia O., Barth D., Bensebia B., Dahmani A. (2009)** Supercritical CO2 extraction of rosemary: effect of extraction parameters and modeling. *The Journal of supercritical fluids*, Vol. 49, p.p. 161-166.
- **Bloor S. J., (2001)** *Method. Enzymol*,335, 3-14.
- **Boelens M.H. (1985)** The essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. perfumes *Flavors*, Vol. 5, N°.10, p.p. 21-37.
- **Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C. 1997.** Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology*, 30: 609-615.

- **Boutekdjiret C. (1999)** Etude des procédés d'extraction appliqués à la récupération des essences du romarin: transfert de matière et modélisation, Thèse de Doctorat d'état, Département de génie chimique, ENP.
- **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojlik I., Jovin E. (2007)**, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils, *J. Agric. Food Chem.*, 55 (19), pp 7879–7885.
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.(1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology*, 28:25-30.
- **Bravo L. (1998)** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr Rev* 56:317-333.
- **Burton G.W., Ingold K.U. (1984)**. p-carotene an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224:569-573.
- **Campanella L, Bonanni A, Favero G et al (2003)** Determination of antioxidant properties of aromatic herbs, olives and fresh fruit using an enzymatic sensor. *Anal Bioanal Chem*.
- **Can Vet J, 1989**. Les antioxydants: rôles, types et nécessités dans les aliments pour animaux de compagnie.
- **Carron C.-A., Previdoli S., Cottagnoud A., Rey C., Carlen C. (2005)** AgroscopeRAC Changins Sauge officinale: productivité et qualité de la nouvelle variété Regula , *Vitic. Arboric. Hortic. Vol. 37 (4)*, Suisse, 235-239.
- **Chamel A., Gaillardon P., Gauvrit C. (1991)** Les herbicides: modes d'action et principes d'utilisation. *Rene Scalla INRA*. 7 - 31.
- **Charchari S., Boudina N., Benhalla A. (2011)** 4ème Symposium International sur les plantes aromatiques et médicinales, Mohammedia, Maroc, 12-13 Mai 2011
- **Charchari S., Chafaa I., Kassoussi K., Zekri M. M., Benhalla A., Boudina N., (2010)** Glandular Trichomes, Secretory Cavities and Essential Oil of Sage (*Salvia officinalis* L.) *JEOBP*, 13(3), 267-274.
- **Chen J., Dickinson E. (1995)** *Food Hydrocolloids*, 9, p. 35.
- **Cillard J., Cillard P. et Cormier M.(1980)**Effect of Experimental Factors on the Prooxidant Behavior of oc-Tocopherol. *J. Am. OU. Chem. Soc*, 1980, 57, 255-261.
- **Cuvelier M-E, Berset C. and Richard H.(1994)**, 'Separation of major antioxidants in sage by high performance liquid chromatography', *Sci Aliments*, 14 811–15.

- **Cuvelier M-E, Richard H. and Berset C.(1996)**, Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary, J Amer Oil Chem Soc, 73 645–52.
- **Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M. and Garcia-Parrilla M.C. (2007)** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, Talanta, 71: 230–235.
- **Dagnelle J.P. (1981)** Principe d'expérimentation, Ed. Presses agronomiques de Gembloux, Belgique.
- **Dobrev A., Kovatcheva N. (2007)** Travaux scientifiques de l'Université des Technologies Alimentaires, vol. LV, N°1, p.p. 303 -307, Polvdiv, Bulgarie.
- **Ducerf G. (2007)** L'encyclopédie des plantes bio-indicatrices, Alimentaire et médicinales, Guides de diagnostic des sols, Volume 2, édition promonature Fiche n° 454 « Romarin », 251p.
- **El Kalamouni Ch., (2010)** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France, p. 47.
- **Escuder O. (2007)** Plantes médicinales mode d'emploi, Les reconnaître dans la nature, les utiliser, les cultiver au jardin, Ed Eugen Ulmer, Romarin, p 210.
- **Favier A. (2003)** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique, p.p. 108- 115.
- **Fellah S., Romdhane M., Abderraba M.(2006)** Extraction et étude des huiles essentielles de *Salvia officinalis* L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie, Journal de la Société Algérienne de Chimie, p.193-202.
- **Gantchev G., Petkov L., Koupenov L. (1978)** Travaux scientifiques de l'Université des Technologies Alimentaires, vol. 25, N3, pp. 193- 196, Polvdiv, Bulgarie.
- **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., (2003)** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique,- novembre-décembre: 91-96.
- **Gilly G. (2005)** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse : botanique, culture, chimie, production et marché. Ed l'Harmattan, Paris, 405 p.
- **Guenther C. (1972)** The Essential Oils, Tome 1, Ed. Krifger.
- **Haddou F., Hammouche I. (2012).** Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation. Projet de fin d'études, ENP, Département de Génie Chimique, Alger.

- **Handa S. S., Suman P., Singh K., Gennaro L., Dutt R.(2008)** Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, ICS, Trieste, p37.
- **Ivanov D. (1967)**, Cours de chimie organique, Ed. Art et Science, Sofia, p.509.
- **ISO 1897-2 (1977)**, Part 2: Determination of water - Dean and Stark method
- **Jiao Z., Liu J., Wang S., (2005)** Antioxidant Activities of Blackberry Pigment Extract. Food Technology and Biotechnology, Zhengzhou, v. 43, n. 1, p. 97-102.
- **Kenoche M. (1994)**, Organosilicone surfactant performance in agricultural spray applications, Weed Research, 34 (3), p. 221-239.
- **Kim, J.-K., Noh, J.H., Lee, S., Choi, J.S., Suh, H., Chung, H.Y., Song, Y.-O. and Choi, W.C. (2002)** The first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity, Bull. Korean Chem. Soc., 23(5): 661-662.
- **Koehler-Ramonatxo, C. (2006)** Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or another way for nutrition in respiratory diseases. Nutrition clinique et métabolique. 20:165-177.
- **Krägel J., Wüstneck R., Husband F., Wilde P., Makievski A., Grigoriev D., Li J. (1999)** Colloids and Surfaces B, 12, p. 399.
- **Pelli K. et LylyM. (2003)** Les antioxydants dans l'alimentation: Les antioxydants naturels et synthétiques dans les aliments, p 9.
- **Lagunez Rivera L.(2006)** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, p. 29.
- **Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J.-L., Duriez, P., Teissier, E. and Cotelte, N. (2000)** Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids, Free Radic. Biol. Med., 29(9): 900-912.
- **Leguet G. (1993)** Contribution à l'étude de mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles, Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, p. 16.
- **Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M. (2001)** Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale. 30: 1076-1081.
- **Leitao et al., S.G. and Vilegas, W. (2002)** Quick preparative separation of natural naphthoquinones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography, Z.Naturforsch., 57c: 1051-1055.
- **Lo A-H., Yu-Chih Liang Y-C., Lin-Shiau S-Y., Chi-Tang HoC-T. and Jen-Kun L. (2002)**, Carcinogenesis, Vol. 23, No. 6, 983-991.

- **Longaray Delmare A.P., Ivete T.M.P., Liane A., Luciana A.S., et Sergio E. (2007)** Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* cultivated in south brazil. Food chemistry, 100 : 603-608.
- **Lu, Y. and Foo, L.Y. (2000)** Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace, Food Chemistry, 68: 81-85.
- **Lucchesi E.M. (2005)** Extraction sans solvant Assistée par Micro-ondes: Conception et Application à l'extraction des huiles essentielle. Thèse de doctorat, Université de la Réunion. 143 p.
- **Maksimovic M., Anijela V., Mladen M., Marija E.S., Sabaheta A., et Sonja S.Y. (2007)** Effet of the environmental condition on essential oil profile in two dinaric *Salvia* species : *Salvia brachydon vandas* and *Salvia officinalis* L. Biochemical Systematics and Ecology. 35 : 473-478.
- **Marin M., Koko V., Duletic-Lausevic S. (2006)** Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry, South African Journal of Botany, 72: 378–382.
- **Martínez-Cayuela, M. (1995)** Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 77: 147-161.
- **Mateus E.M, Lopes C., Nogueira T. (2006)** Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal, Silva Lusitana 14(2): 203 - 217, Portugal.
- **Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. pp : 13-36.
- **Minkov E., Mihailova D., Trandafilov T. (1967)** Die Pharmazie, vol. 22, pp 213-215.
- **Molyneux P. (2004)** The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol, 26 (2), p.p. 211-219.
- **Munné-Bosch S., Alergre L. (2001)**, Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary, Plant physiology, vol. 125, pp. 1094-1110.
- **National Cancer Institute Bioassay of Butylated Hydroxitoluene (BHT) for possible carcinogenicity (1979)** National Institute of Health Publications NIH; 79-1706.
- **Ninfali P., Mea G., Giorgini S. (2005)** Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. Br. J. Nutr., 93(2):257-66.

- **Onesippe C. (2005)** Étude des systèmes polyélectrolyte /tensioactif en phase aqueuse et a l'interface liquide/gaz application a l'élaboration de microcapsules, Thèse de doctorat, Université Montpellier II, p.19.
- **Paume M-C. (2008)** Sauvages et médicinales Plante remèdes pour nos petits maux, Éd Édisud, Romarin, p 212.
- **Pokorny J, Nguyen H T T and Korczak J, (1997)** Antioxidant activities of rosemary and sage extracts in sunflower oil', *Nahrung*, 41 176–7.
- **Pokorny J, Reblova Z, Troiakova L, Nguyen H T T, Korczak J and Janitz W (1998)**, Antioxidant activities of spices and herbs in rapeseed oil', *Proceedings of the World Conference on Oil Seed and Edible Oils Processing*, 6–10. October 1996, Istanbul, Turkey, Eds Koseoglu S S, Rhee K C and Wilson R F, Champaign, Illinois, Vol. II, pp. 265–269.
- **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2000)** Antioxidant in food: practical applications. Ed. Woodhead, , pp 17, 43-44, 388
- **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2010)** e-Revue de Génie Industriel, Revue électronique internationale pour la science et la technologie, N°4.
- **Porter WL, 1980.** Autoxidation in foods and biological systems, eds. Simic MG, an Karel M. Plenum Press, New York, 1980;295 chapter 19.
- **Qiu hui-xia (2005)** Seasonal analyses of the essential oil of *Salvia officinalis* L. cultivated in Shanghai of China, *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, vol. 23 No.3.
- **Quezel P., Santa S. (1963)** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris, CNRS, Tome 1 et 2, 1170 p.
- **Rameau J.C et al. (2008)**, Flore forestière française: Région méditerranéenne.
- **Raskin (2003)** Chémotype ou race chimique, Edition du Laboratoire Orau Honnelles, Belgique.
- **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice- Evans C. (1999)** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, p.p. 1231-1237.
- **Reverts R.F. (2006)** Esau's Plant Anatomy, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- **Ribeiro M.A. Bernardo-Gil M.G. and Esquivel M.M.,(2001)**, *Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, *Journal of Supercritical Fluids*, 21 51 – 60.
- **Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S. (1991)** Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, p.p. 549-1552.

- **Rombi M., Robert D. (2007)** 120 Plantes Médicinales : Compositions, Mode d'action et intérêt thérapeutique de l'ail à la vigne rouge : romarin, Ed Alpen. p 398.
- **Rougou N. (2012)** Hydrodistillation de *Salvia officinalis* L. : Influence de quelques paramètres sur le rendement et la composition de l'huile essentielle. Mémoire de Magister, ENP, Département de Génie Chimique, Alger.
- **Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A., Saura-Calixto F. (1998)** A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, 76(2), p.p. 270-276.
- **Sanchez-Moreno, C. (2002)** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. International Journal of Food Science and Technology. 8: 121-137.
- **Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. 1998.** New parameter for evaluation of free radical scavenging capacity of polyphenols, 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ESCOC-2).
- **Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. 1999.** Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, Food Res. Int., 32: 407-412.
- **Scheler A. (1862)**, Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne.
- **Scherer R., Godoy H.T. (2009)** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method, Food Chemistry, 112, p.p. 654-658.
- **Sharma Om P., Bhat T.K. (2009)** DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, 113 (4), p 1202.
- **Silou T., Taty-Loumbou F., Chalchat J.C. (2002)** Etude de l'effet du séchage solaire sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus citriodora*. Ann. Fals. Exp. Chim. Toxi., Vol. 95 n° 960. p.p. 287-301.
- **Staikov V., Zotovitch G. (1963)** Rivista Italiana, N° 12, p.p. 547-549.
- **Stevens P.J.G, Baker E.A (1987)** Pest. Sci. 19, 265-281.
- **Stolzenberg G.E (1989)** Adjuvants and Agrochemicals. Ed. Chow P.N.P, Boca Raton, Floride, USA, Vol.1, p.p. 17-25.
- **Tadros T. F. (1994)** Surfactant in Agrochemicals, Vol. 54, Ed. Marcel Dekker, New York, p.p. 101-102.

- **Tamura H., Yamasaki K., Isomoto K., Yoshikawa H. (2002)** Effect of the polyoxyethylene chain length of Triton X surfactants on the adsorption of reconstituted wax model compound, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(2), p.p. 293-297.
- **Teuscher, Anton R., Lobstein A. (2005)** *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Ed. Lavoisier, Paris, 522p.
- **Trandafilov T., Minkov E. (1969)** *Die Pharmazie*, vol.24, p.p. 327-328.
- **Viani R. (1974)** Process for extracting antioxidants, Brevet US 4,012,531, Switzerland.
- **Wayner D. D. et Febs L. (1985)**, 187, 33-37.
- **Willem J.P. (2002)** *Les huiles essentielles: médecine d'avenir*. Ed. Dauphin, Paris, 311 p.
- **Witschi H, 1981**. Enhancement of tumor formation in mouse lung by dietary butylated hydroxytoluene. *Toxicology* 1981; 21 : 95-101.
- **Zheng W, Wang SY. (2001)** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem.*

Webographie

- [1] **Site web:** <http://www.foodavenue.fr/lexique/sauge.html> (Consulté le 29.05.2013).
- [2] **Site web:** www.abcdelanature.com/huiles-essentielles-qz.html (Consulté le 29.05.2012).
- [3] **Site web :** <http://s.martinez.free.fr/V2/biologie/notions/1030-cellules-differenciees.html> (Consulté le 29.05.2013).
- [4] **Site web:** <http://fr.academic.ru/dic.nsf/frwiki/469097> (Consulté le 29.05.2013).
- [5] **Site web:** <http://www.oleosea.com/huile-krill/complements-antioxydants> (Consulté le 29.05.2013).
- [6] **Site web :** <https://fr.wikipedia.org/wiki/Antioxydant> (consulté le 29.05.2013)
- [7] **Site web:** <https://fr.wikipedia.org/wiki/Antioxydant> (consulté le 20.05.2013).
- [8] **Site web:**
http://isotc.iso.org/livelink/livelink/fetch/8802251/8802269/8803087/946301/Withdrawn_standards_-_Detailed_list_%28PDF_format%29.pdf?nodeid=1845704&vernum=-2 (consulté le 28.06.2013)

Annexes

ANNEXE I

Tableau 1: Composition chimique de l'huile essentielle du *Salvia officinalis* L.

(Abdelli, 2010)

N°	Nom du composé	Teneur relative, %	
		HD	HDTA
1	salvène	0,13	0,11
2	tricyclène	0,08	0,07
3	alpha thuyène	0,48	0,38
4	alpha pinène	1,74	1,45
5	camphène	3,38	2,79
6	sabinène	0,36	0,26
7	beta-pinène	3,50	2,81
8	beta-myrcène	2,62	1,93
9	alpha-terpinéne	0,42	0,08
10	1,8-cinéol	12,10	11,01
11	gamma-terpinéne	0,82	0,65
12	cis-hydrate de sabinène	0,20	0,24
13	terpinolène	0,59	0,56
14	alpha thuyone	17,06	15,47
15	beta-thuyone	6,16	5,60
16	camphre	12,81	13,89
17	cis-pinocamphone	0,46	0,62
18	bornéol	1,12	1,26
19	terpinen-4-ol	0,51	0,62
20	myrténal	tr	0,04
21	alpha-terpinéol	0,21	0,26
22	myrténol	0,19	0,22
23	acide caprylique (C8)	-	0,15
24	acétate de bornyle	0,22	0,18
25	thymol	tr	tr
26	alpha-cubébène	0,06	0,06
27	alpha-copaène	tr	0,05
28	beta-bourbonène	tr	0,04
29	beta-cubébène	tr	tr
30	gamma-caryophyllène	-	0,80
31	beta-caryophyllène	5,57	5,98
32	aromandendrène	0,05	0,03
33	alpha-humulène	4,72	5,03
34	γ -muurolène	0,13	0,17

Tableau 1 (suite)			
35	germacrène-D	0,08	tr
36	β -sélinène	0,05	0,05
37	viridiflorène	0,10	0,12
38	α -muurolène	0,06	0,07
39	γ -cadinène	0,06	0,08
40	δ -cadinène	0,19	0,24
41	1,4-cadinadiène	0,01	tr
42	α -cadinène	0,02	tr
43	α -calacorène	0,14	0,14
44	oxyde de caryophyllène	0,65	0,59
45	viridiflorol	10,33	10,69
46	acide laurique (C12)		4,4
47	cadina-1,4- diène	0,12	0,09
48	gamma-cadinène	0,08	tr
49	acide myristique (C14)	-	1,28
50	acide palmitique (C16)	0,06	0,30
51	manool	8,32	7,24
52	(E)-acide élaïdique (9-octadécénoïque)	-	0,06

Total identifiés, %	95,96	98,16
Hydrocarbures monoterpéniques	14,12	11,09
Hydrocarbures sesquiterpéniques	11,44	12,95
Monoterpènes oxygénés	51,04	49,41
Dérivés phénoliques	tr	tr
Acides carboxyliques	0,06	6,36

Tableau 2: Composition chimique de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.
(Charchari, Abdelli, 2010)

N°	Nom du composé	IK	Teneur relative, %	
			HD	HDTA
1	tricyclène	919	0,34	0,27
2	alpha-pinène	934	37,74	36,76
3	camphène	948	5,82	5,95
4	1-octen-3-ol	951	0,77	0,59
5	sabinène	969	0,10	-
6	beta-pinène	975	3,38	3,35
7	beta-myrcène	988	1,34	1,38
8	alpha-phellandrène	1004	0,32	0,29
9	β-carène	1008	0,08	0,08
10	alpha-terpinène	1015	0,77	0,76
11	p-cymène	1027	0,55	0,78
12	D-limonène	1029	3,47	3,83
13	beta-ocimène	1035	0,33	0,34
14	gamma-terpinène	1057	2,59	2,67
15	beta-terpinene	1071	0,23	0,25
16	alpha-terpinolène	1087	1,38	1,52
17	linalol	1101	2,64	3,15
18	campholenal	1128	1,19	1,17
19	camphre	1150	9,26	10,82
20	pinocarvone	1163	1,23	1,38
21	bornéol	1175	3,01	3,59
22	terpinen-4-ol	1185	1,20	1,49
23	trans-verbenol	1193	0,70	0,86
24	alpha-terpinéol	1201	0,16	0,16
25	D-verbénone	1212	2,15	2,46
26	isobornéol	1215	6,35	6,44
27	E-carvéol	1230	0,36	0,49
28	D-carvone	1242	0,48	0,57
29	acétate de bornyle	1279	2,22	2,36
30	2-undécanone	1289	0,08	0,10
31	thymol	1290	0,07	0,08
32	carvacrol	1298	0,23	0,25
33	copaène	1369	0,06	0,06
34	γ-caryophyllène	1389	0,07	0,08
35	méthyl-eugénol	1408	4,45	2,20
36	butyrate de linalyle	1422	0,08	-

Tableau 2 (suite)				
37	aromandendrène	1436	0,09	0,09
38	humulène	1451	1,69	0,94
39	2-dodécénal	1467	0,09	-
40	germacrène-D	1480	0,09	0,14
41	trans-méthyl-	1491	1,13	0,61
42	α -muurolène	1498	0,12	-
43	beta-bisabolène	1506	0,28	0,15
44	germacrène-B	1556	-	0,14
45	acide laurique (C ₁₂)	1571	-	0,28
46	cubenol	1632	0,08	0,10
47	acide myristique	1720	0,06	0,08
Total identifiés, %			98,83	99,06
Hydrocarbures monoterpéniques			57,89	57,45
Hydrocarbures sesquiterpéniques			2,40	1,60
Monoterpènes oxygénés			30,95	34,94
Dérivés phénoliques			5,88	3,14
Acides carboxyliques			0,06	0,36

ANNEXE II

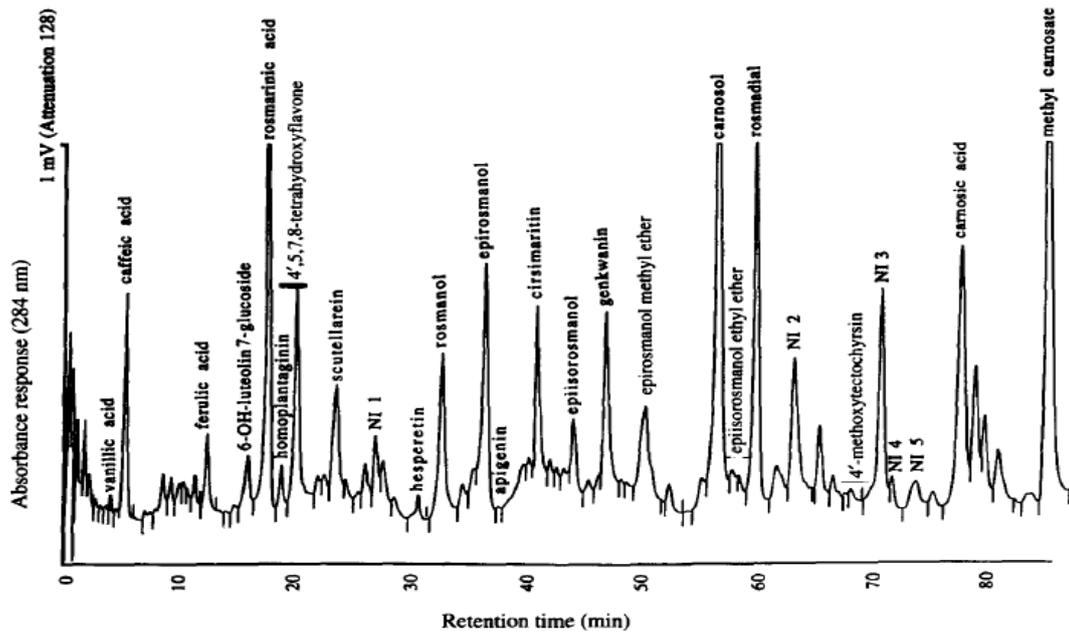


Figure 1: High-performance liquid chromatography profile of an experimental solution obtained by mixing two pilot-plant extracts of sage (Cuvelier et al., 1999)

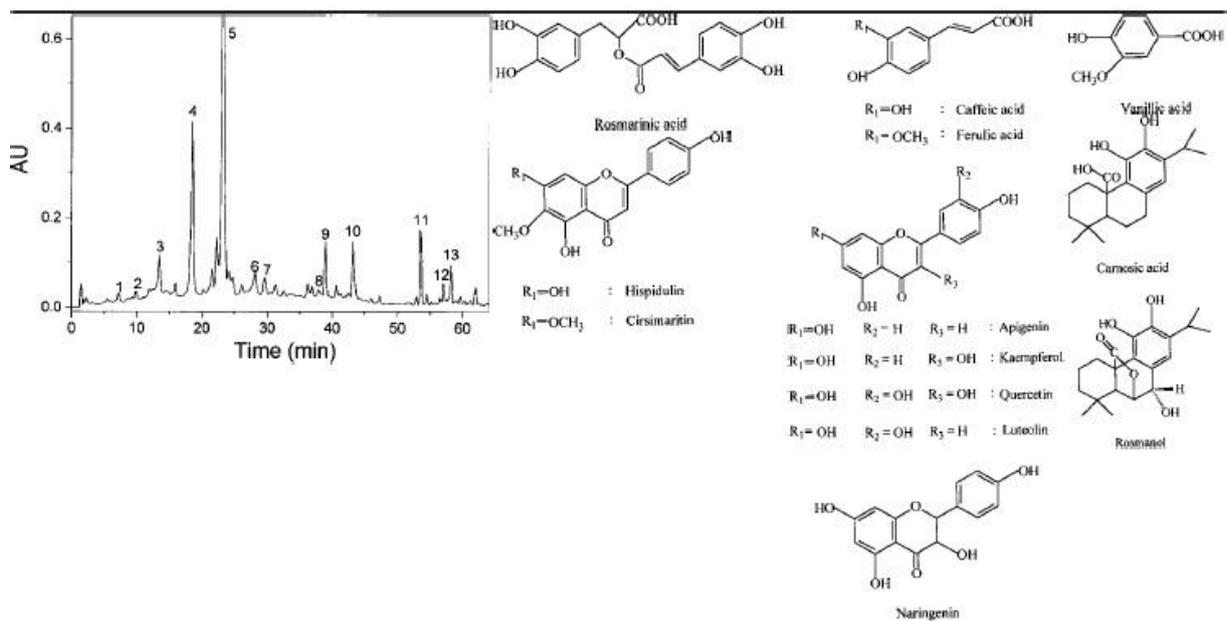


Figure 2: HPLC profile of *S. officinalis* L. herbal extract (Zheng and Wang, 2001)

(1) Vanillic acid; (2) caffeic acid; (3) ferulic acid; (4) luteolin 7-*O*-glucoside; (5) rosmarinic acid; (6) 4',5,7,8-tetrahydroxyflavone; (7) scutellarein; (8) apigenin; (9) hispidulin; (10) cirsimaritin; (11) carnosol; (12) carnosic acid; (13) methyl carnosate

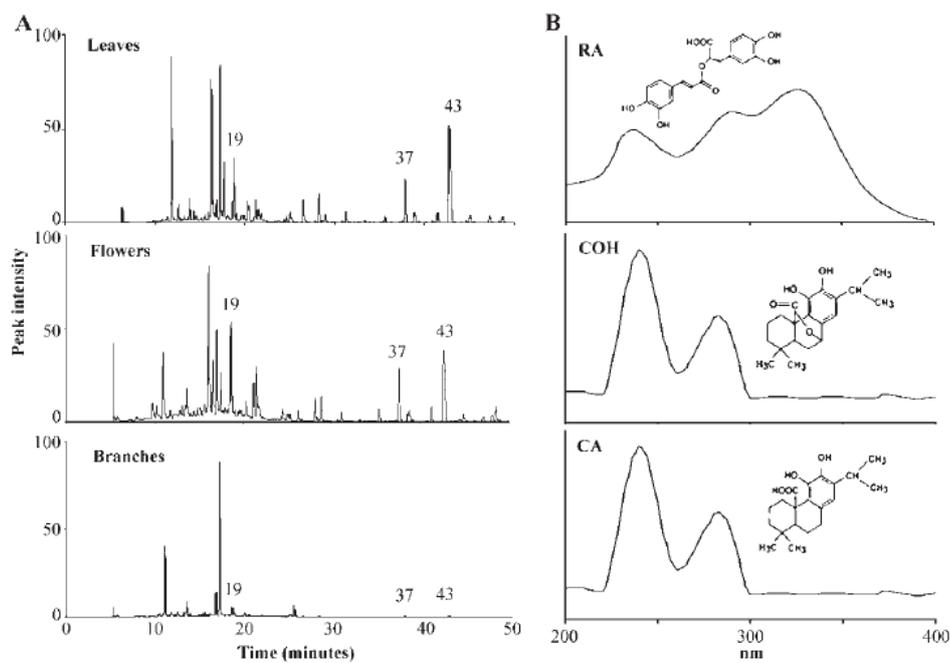


Figure 1. Characteristic chromatogram of leaves, flowers and branches extracts obtained from rosemary plants (A). Peaks with an R_{time} of 19, 37 and of 43 min corresponding to rosmarinic acid (RA), carnosol (COH) and carnosic acid (CA), respectively. Spectrum of rosmarinic acid, carnosol and carnosic acid (B).

Moreno et al. (2006)