

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

Optimisation de l'extraction des antioxydants
hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.

Proposé et dirigé par :

Pr. S. CHARCHARI

Etudié par :

Mlle Hadjer DJEDIAT

Soutenu le 17 Juin 2014 devant le jury composé de :

| | | |
|------------------------------|--------------------|--------------|
| M. T. AHMED ZAID | Professeur à l'ENP | Président |
| M. E-H. BENYOUSSEF | Professeur à l'ENP | Examineur |
| M ^{me} F. KIES | Docteur à l'ENP | Examinatrice |
| M ^{me} S. CHARCHARI | Professeur à l'ENP | Rapporteur |

Promotion : Juin 2014

*À la lumière de la connaissance, l'heureux résultat semble presque aller de soi; tout
Étudiant (...) peut l'appréhender sans trop de difficulté. Mais les longues années
De tâtonnements, de recherches dans le noir, avec leur lancinante tension,
L'alternance des périodes de confiance et de découragement, puis
Finalement la sortie vers la lumière, seuls ceux qui
Ont prouvé cela peuvent le comprendre.*

A. Einstein (1934).

*« On ne peut pas croire à la moitié de ce qu'on entend raconter,
On ne peut pas croire à la plupart des choses qu'on lit,
Mais on peut croire à tout ce que l'on fait... »*

Ellen Macarthur (2002), *Du vent dans les rêves.*

« Tout vient à point à qui sait attendre. »

Adage populaire.

A l'Algérie,

Ma terre natale, mon pays d'origine.

A la mémoire de mes grands-parents et de 3amtou Fatiha,
Que Dieu le Miséricordieux les accueille dans Son Paradis.

A mes parents,

Pour vos mains qui ont tant travaillées,

Pour votre cœur qui m'a tant donné,

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

Que DIEU vous protège et vous accorde Bénédiction et Grâce.

A mes merveilleux et très chers deux frères Islem et Adilou,
Que Dieu vous garde toujours auprès de moi.

A ma belle-sœur Ferial,

Envers Laquelle j'ai une grande estime et un profond respect.

A mes grands-mères que j'aime tendrement,

Que Dieu les protèges et les prête bonnes santés et longue vie.

A 3amtou FIFI et ses enfants Yasmine, Rayan et Zaki,
Qui ne peuvent être présents en ce jour.

A toute mes tantes, et tous mes oncles,

En témoignage de mon amour et mon profond respect.

A mes cousins et cousines,

En leurs souhaitant plein de bonheur et de réussites.

A ma grande famille, la source de ma fierté.

A tous les enseignants,

Qui m'ont formé depuis le premier Jour de ma scolarité.

A ma formidable promotrice M^{me} Charchari.

A tous mes ami(e)s et collègues tout spécialement Asma et Djidji.

A tous ceux qui me sont très chers.

Et enfin tout particulièrement à Amine qui m'a toujours soutenu et encouragé, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde affection.

Je dédie ce modeste travail ...

En signe de reconnaissance et de profonde affection,

Hadjer

Remerciements

Louange à Allah, nous Le glorifions, Lui demandons aide et invoquons Son pardon contre le mal de nos péchés, celui qui fut guidé personne ne peut l'égarer et celui qui est égaré personne ne peut le guider. Je témoigne qu'il n'y a point de divinité digne d'adoration sauf Allah, l'Unique, qui n'a point d'associé et je témoigne aussi que Mohammed est Son Serviteur et Son Messager, que la bénédiction d'Allah soit sur Lui, sa famille, ses compagnons, et tous ceux qui le suivent sur le droit chemin jusqu'au Jour Dernier. Ensuite...

Bien que ne faisant apparaître qu'un seul nom en première page, une thèse n'est pas le fruit d'un travail individuel.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitudes à tous ceux qui, par leur aide, leur compétence et leur disponibilité, ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. L'expérience acquise, tant sur le plan technique que sur le plan humain, m'a été précieuse.

Je témoigne ma reconnaissance à ma promotrice Madame S. CHARCHARI, Professeur au département de Génie Chimique à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, qui a su toujours trouver les mots pour m'amener à exprimer mon rêve, faire de la recherche et transmettre les connaissances. Je la remercie de m'avoir dirigée, conseillée et encouragée, ainsi pour sa bonne volonté, sa patience et ses précieux conseils qu'elle m'a prodigués tout au long de ce projet. Ce travail n'a pu être mené à bonne fin que grâce à sa collaboration de tout instant.

Je tiens à remercier Monsieur T. AHMED ZAÏD, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, de m'avoir fait honneur de sa présence en qualité de président de jury d'évaluation de mon travail.

J'exprime mes plus sincères remerciements aux membres de jury, Monsieur E.-H. BENYOUSSEF, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger et Madame F. KIES, Docteur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger, qu'ils ont accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de ma soutenance. Aussi je leur suis reconnaissante de m'avoir accordé de leurs temps.

Que tous les enseignants du département du Génie Chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique trouvent ici l'expression de mes sincères gratitudes pour les efforts qu'ils n'ont cessé de prodiguer pour ma bonne formation.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Madame R. Benoughlis, technicienne au Département de Génie chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique.

Je ne saurai jamais assez remercier toute ma famille, en particulier papa, maman et mes deux frères Islem et Adel pour les sacrifices et l'amour qu'ils ont témoigné à mon égard.

Ma gratitude va également à tous mes ami(e)s qui m'ont aidé par leur présence et leur amitié, particulièrement Asma, Djidji, Mira, Soussou, Mimi, Sidou, Moncef, Zahir, Fayçal, Yahia, Sofiane, Hamza et vivement une personne que j'apprécie beaucoup, Amine.

Enfin, ne pouvant citer tous ceux et celles qui m'ont été d'un apport petit ou grand, je leur adresse mes remerciements les plus sincères.

استمثال استخراج مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء من نبتة إكليل الجبل

ملخص: الهدف من هذه الدراسة هو استمثال، من خلال تخطيط التجارب، استخراج مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء من نبتة إكليل الجبل. تم البحث عن القيم المثلى لإثنين من المعالم الرئيسية لعملية الاستخلاص صلب - سائل، وهما درجة الحرارة ومدة الاستخلاص، بالاعتماد على مخطط تجارب بثلاثة مستويات ذات معاملين، المعايير الأمثل هي العائد من استخراج المواد الجافة، المحتوى الفينولي والقدرة المضادة للأكسدة من المستخلصات. تم إجراء تحديد محتوى المركبات الفينولية في المستخلصات المائية بالاعتماد على طريقة معايرة فولين دوني. تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة باستخدام طريقة محاصرة الجذور الحرة DPPH. تم استخدام نموذج متعدد الحدود من الدرجة الثانية لوصف كل استجابة للنظام صلب - سائل. أظهر التحليل الإحصائي للنماذج المعمول بها، والذي أجري باستخدام برنامج ستات غرافيكس سانتوريون 16، أنها تصف بدقة سلوك النظام. شروط العمل المثلى تم تحديدها من النماذج الرياضية وتمثيلها بمساحات إجابة.

كلمات البحث: نبتة إكليل الجبل، استخلاص صلب - سائل، الاستمثال، التصميم التجريبي، مضادات الأكسدة القابلة للذوبان في الماء، البوليفينول، مساحة إجابة.

Optimisation de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.

Résumé : L'objectif de cette étude est l'optimisation, par planification des expériences, de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L. La recherche des valeurs optimales des deux principaux paramètres du procédé d'extraction solide-liquide, en l'occurrence, la température et la durée de l'extraction, est menée en adoptant un plan factoriel à trois niveaux des deux paramètres, les critères d'optimisation étant le rendement en extrait sec, la teneur en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant des extraits. La détermination de la teneur en composés phénoliques des extraits aqueux a été effectuée par la méthode de dosage de Folin-Denis. L'évaluation du pouvoir antioxydant a été réalisée en utilisant la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Un modèle polynomial du second ordre a été utilisé pour décrire chacune des réponses du système solide-liquide. L'analyse statistique des modèles établis, menée à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVI, a montré qu'ils décrivent correctement le comportement du système étudié. Les conditions opératoires optimales ont été déterminées à partir des équations des modèles mathématiques et illustrées par les surfaces de réponse.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L., extraction solide-liquide, optimisation, plan d'expériences 3^2 , antioxydants hydrosolubles, composés phénoliques, surface de réponse.

Optimization of the extraction of *Rosmarinus officinalis* L. water soluble antioxidants

Abstract: The aim of this study is the optimization, by experimental design, of *Rosmarinus officinalis* L. water soluble antioxidants extraction. The research on the optimal values of the two main solid-liquid extraction process parameters, namely, the temperature and the duration of the extraction is carried out by three-level factorial design of these two parameters, the optimization criteria being the yield of dry extract, the total phenolic content and antioxidant power of the extracts. The Folin-Denis assay was used for the determination of the total phenolic content of the aqueous extracts. The antiradical potential of these ones was evaluated by DPPH free radical scavenging. A second order polynomial model was used to describe each of the responses of the solid-liquid system. The statistical analysis of the established models, carried out using the software Statgraphics Centurion XVI, showed that they correctly describe the behavior of the studied system. The optimal operating conditions were determined from the equations of mathematical models and illustrated by the response surfaces.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., solid-liquid extraction, optimization, experimental design 3^2 , water soluble antioxidants, phenolic compounds, response surface.

Tables de matières

| | |
|--------------------------|-----|
| Table des matières | VII |
| Liste des figures | X |
| Liste des tableaux..... | IX |
| Introduction | 1 |

Chapitre I. Etude bibliographique

| | |
|---|-----------|
| I.1. La matière végétale : <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 3 |
| I.1.1. Présentation | 3 |
| I.1.2. Classification botanique | 4 |
| I.1.3. Description botanique..... | 5 |
| I.1.4. Répartition géographique | 6 |
| I.1.5. Composition chimique..... | 7 |
| I.1.6. Utilisations..... | 12 |
| I.2. Les radicaux libres..... | 13 |
| I.2.1. Définition d'un radical libre | 13 |
| I.2.2. Les sources de production des radicaux libres | 14 |
| I.2.3. Dommages oxydatives des radicaux libres..... | 14 |
| I.3. Les antioxydants | 15 |
| I.3.1. Définition et classification..... | 15 |
| I.3.1.1. Les antioxydants primaires | 16 |
| I.3.1.2. Des antioxydants secondaires | 17 |
| I.3.1.2.1. Les antioxydants naturels | 17 |
| I.3.1.2.2. Les antioxydants synthétiques..... | 19 |
| I.3.2. Les antioxydants du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 20 |
| I.3.3. Evaluation des propriétés anti-oxydantes | 22 |
| I.3.4. Applications des antioxydants | 25 |
| I.4. Le procédé d'extraction solide-liquide..... | 26 |
| I.4.1. Mécanisme de l'extraction Solide-Liquide..... | 27 |
| I.4.2. Facteurs intervenant dans l'extraction Solide-Liquide..... | 27 |
| I.4.2.1. La nature et l'état du solide et du soluté | 27 |
| I.4.2.2. Le taux de l'humidité du solide | 27 |
| I.4.2.3. La nature du solvant..... | 28 |
| I.4.2.4. La température | 28 |
| I.4.2.5. L'agitation du fluide | 28 |

| | |
|---|-----------|
| I.4.2.6. La durée d'extraction | 28 |
| I.4.3. Les méthodes d'extraction solide-liquide..... | 28 |
| I.4.4. Technologies des extracteurs solide-liquide..... | 29 |
| 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. Extraction des antioxydants hydrosolubles du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 32 |
| II.2.1. Dispositif expérimental | 32 |
| II.2.2. Protocole expérimental..... | 33 |
| II.3. Mesure du pH..... | 34 |
| II.4. Dosage des composés phénoliques | 34 |
| II.4.1. Principe de la méthode de Folin-Denis..... | 34 |
| II.4.2. Protocole expérimental..... | 34 |
| II.5. Evaluation des propriétés anti-oxydantes des extraits | 35 |
| II.5.1. Protocole expérimental..... | 35 |
| II.5.2. Détermination du pourcentage d'inhibition..... | 36 |
| II.5.3. Détermination de la concentration inhibitrice IC ₅₀ | 36 |
| II.5.4. Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire..... | 36 |
| II.6. Plan d'expériences et modélisation mathématique..... | 37 |
| II.6.1. Terminologie | 37 |
| II.6.2. Coordonnées centrées réduites | 41 |
| II.6.3. Notion de modèle mathématique..... | 41 |
| II.6.4. Plan factoriel complet à trois niveaux de deux paramètres | 42 |
| II.6.5. Logiciel Statgraphics Centurion XVI..... | 42 |
| II.7. Réactifs utilisés | 43 |

Chapitre III. Résultats et discussions

| | |
|---|-----------|
| III.1. Elaboration du plan des expériences de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 44 |
| III.1.1. Choix des paramètres et des critères d'optimisation | 44 |
| III.1.2. Choix du plan des expériences et du modèle mathématique..... | 44 |
| III.1.3. Définition du domaine d'étude | 44 |

| | |
|---|-----------|
| III.2. Modélisation | 45 |
| III.2.1. Modélisation du rendement en extrait sec | 45 |
| III.2.2. Modélisation de la teneur en composés phénoliques de l'extrait aqueux du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 46 |
| III.2.3. Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire..... | 48 |
| III.2.3.1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits aqueux du <i>Rosmarinus officinalis</i> L..... | 48 |
| III.2.3.1.1. Détermination de la concentration IC ₅₀ | 48 |
| III.2.3.1.2. Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire..... | 49 |
| III.2.3.2. Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire | 49 |
| III.3. Evaluation statistique des modèles mathématiques établis | 50 |
| III.3.1. Analyse de la variance | 51 |
| III.3.2. Surfaces de réponse | 54 |
| III.4. Optimisation | 56 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| Conclusion | 57 |
|-------------------------|-----------|

Références bibliographiques

Webographie

Listes des figures

| | |
|---|----|
| Figure I. 1 : Le romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)..... | 5 |
| Figure I. 2 : Les structures des mono-terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) d'Algérie..... | 8 |
| Figure I. 3 : Structures des acides phénoliques dans le romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) | 9 |
| Figure I. 4 : Structures des différents diterpènes phénoliques du romarin..... | 10 |
| Figure I. 5 : Structures des flavones de romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) | 11 |
| Figure I. 6 : Structures moléculaires des antioxydants de synthèse | 20 |
| Figure I. 7 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)..... | 24 |
| | |
| Figure II. 1 : Echantillonnage de la matière végétale | 30 |
| Figure II. 2 : Dispositif de Dean et Stark pour la mesure du taux d'humidité..... | 31 |
| Figure II. 3 : Dispositif expérimental de l'extraction | 33 |
| Figure II. 4 : Espace expérimental | 38 |
| Figure II. 5 : Domaine d'étude pour un plan à deux facteurs | 39 |
| Figure II. 6 : Surface de réponse pour un plan à deux facteurs..... | 40 |
| Figure II. 7 : Projection de la surface de réponse sur un plan horizontal..... | 40 |
| | |
| Figure III. 1 : Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'échantillon testé | 48 |
| Figure III. 2 : Diagramme de Pareto pour le rendement en extrait sec ($\alpha=0,05$)..... | 53 |
| Figure III. 3 : Diagramme de Pareto pour la teneur en composés phénoliques ($\alpha=0,28$)..... | 53 |
| Figure III. 4 : Diagramme de Pareto pour l'indice d'activité antiradicalaire ($\alpha=0,05$) | 54 |
| Figure III. 5 : Surface réponse pour le rendement en extrait sec (R_{ES})..... | 54 |
| Figure III. 6 : Surface de réponse pour la teneur en composés phénoliques (EAG) | 55 |
| Figure III. 7 : Surface de réponse pour l'indice d'activité antiradicalaire (IAA) | 55 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I. 1 : Chémotypes de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L..... | 8 |
| Tableau III. 1 : Niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser | 45 |
| Tableau III. 2 : Conditions opératoires des essais programmés par le plan factoriel des expériences 3^2 et les rendements R_{ES} en extraits sec obtenus | 45 |
| Tableau III. 3 : Résultats du dosage des composés phénoliques dans les extraits aqueux du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 47 |
| Tableau III. 4 : Valeurs des IAA des échantillons des extraits aqueux de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 49 |
| Tableau III. 5 : Résultats de l'analyse de la variance | 51 |

Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales, avec pour objectif, de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes. Aujourd'hui encore les deux tiers de la pharmacopée ont recours aux propriétés curatives des plantes et les traitements à base de ces dernières reviennent au premier plan, car l'utilisation des médicaments de synthèse décroît, vu leurs effets secondaires sur la santé.

Actuellement, la société scientifique, biologistes et chimistes, met en évidence l'impact néfaste du processus oxydatif incontrôlable induit par les espèces réactives oxygénées (ERO). Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques, tels que le vieillissement et le cancer, et indirecte, sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces molécules dans l'organisme, en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules vitales biologiques, à savoir, l'ADN, les lipides, les protéines et les glucides. En s'appuyant sur cette vision, un renouveau de la phytothérapie s'opère vers cette vague verte qui produit une foule des antioxydants, afin de contrer et piéger ces oxydants.

En effet, les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires, en général, et des polyphénols, en particulier, tant dans le domaine de la santé et vis-à-vis des maladies pernicieuses (cancer) que dans l'industrie agro-alimentaire. Ces composés sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques : anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes. Il a été mis en évidence que l'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires, en neutralisant les radicaux libres, est due, pour la plupart, à leurs structures phénoliques.

Le fort pouvoir antioxydant et antimicrobien des plantes de la famille des Lamiacées, à laquelle appartient le *Rosmarinus officinalis* L., a fait d'elle l'une des familles botaniques les plus fréquemment utilisées au niveau mondial. Le romarin représente, donc, une source inépuisable de substances ayant des activités anti-oxydantes et biologiques très variées et dont la connaissance constituerait une raison de plus pour la préservation et la valorisation de cette richesse naturelle, par l'extraction

des produits à haute valeur ajoutée qu'elle contient, en utilisant des procédés de plus en plus performants.

L'objectif de notre étude est l'optimisation de l'extraction des antioxydants hydrosolubles de cette espèce végétale. La recherche des valeurs optimales des deux principaux paramètres du procédé d'extraction solide-liquide, en l'occurrence, la température et la durée de l'extraction, est menée par planification des expériences, les critères d'optimisation étant le rendement en extrait, la teneur en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant des extraits.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique relative à la matière végétale, objet de cette étude, aux antioxydants, en général, et ceux du *Rosmarinus officinalis* L., en particulier, ainsi qu'au procédé d'extraction solide-liquide.

La préparation de la matière végétale, préalable à l'extraction de ses antioxydants hydrosolubles, l'installation d'extraction, la démarche expérimentale adoptée, ainsi que les différentes méthodes d'analyse, les réactifs et les outils utilisés, font l'objet du second chapitre.

Le troisième et dernier chapitre, quant à lui, regroupe les résultats des essais d'extraction, réalisés dans le cadre de l'optimisation par le plan factoriel à trois niveaux de deux paramètres. Les modèles mathématiques élaborés pour chacun des trois critères d'optimisation, leur validation statistique, à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion, et les valeurs optimales des paramètres étudiés y sont également présentés.

Chapitre I

Etude bibliographique

I.1. La matière végétale : *Rosmarinus officinalis* L.

I.1.1. Présentation

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 fait l'objet de très nombreuses mentions historiques et légendaires. Les anciens lui vouaient une grande vénération. Symbole des fêtes, nuptiales ou funéraires, il était abondamment utilisé pour confectionner des couronnes. Tout d'abord destinées à parer les jeunes épouses lors de la cérémonie étant synonyme d'amour, de fidélité et de bonheur éternel, ces feuilles ont par la suite orné les têtes des étudiants en Grèce, car le romarin était reconnu pour avoir une action stimulante sur les fonctions mentales et de récentes recherches scientifiques tendent d'ailleurs à accréditer ces effets bénéfiques sur l'intellect. Des rameaux ont été trouvés dans les tombes des premières dynasties égyptiennes, on mettait, aussi, des brins de romarin sous les oreillers pour chasser les mauvais esprits et les cauchemars et au temps des grandes épidémies, on en mettait un petit sac autour du cou pour s'en protéger. Mais l'histoire la plus célèbre à propos de cette plante est certainement celle de l'eau de la reine de Hongrie. Celle-ci âgée de 72 ans et paralysée, retrouva la santé et la jeunesse grâce à une cure d'alcoolat à base de romarin (Teuscher et *al.*, 2005).

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 », « Rose-marine », « Romarin des troubadours » et, en provençal, « Encensier » (Paume, 2008).

En Algérie les appellations régionales suivantes lui sont attribuées :

- Région de l'Est : *Eklil*
- Région de l'Ouest : *Helhal*
- Région du Centre : *Yazir*

Le romarin, *Rosmarinus officinalis* L., plante commune à l'état sauvage ou cultivée, est, sans doute, l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on la trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante.

I.1.2. Classification botanique

La classification botanique complète du *Rosmarinus officinalis* L. n'a été achevée qu'au début du 20^{ème} siècle en raison de l'extrême variabilité des espèces. Le romarin appartient à la deuxième série, parmi les six, de la famille des *Lamiacées* ou *Labiées* (Camino, 1971). 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* (Quezel et Santa, 1963).

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

- ✓ Règne : *Plantae*
- ✓ Embranchement : *Phanérogames*
- ✓ Sous-embranchement : *Angiospermes*
- ✓ Classe : *Dicotylédones*
- ✓ Sous-classe : *Gamopétales*
- ✓ Ordre : *Tubiflorae*
- ✓ Sous-ordre : *Lamiale*
- ✓ Famille : *Lamiaceae (Labiatae)*
- ✓ Genre : *Rosmarinus*
- ✓ Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.

La famille *Lamiaceae* est une vaste et importante famille très typique du monde végétal. Elle est répandue dans le monde entier, mais particulièrement dans les régions tempérées et surtout méditerranéennes et spécialement en Algérie, où le chaud soleil rend les arômes des plantes encore plus forts (Site web [1]). Les *Lamiacées* sont réparties en environ 210 genres pour plus de 6 000 espèces (Site web [2]).

La famille des *Lamiacées* regroupe, outre le romarin, des plantes herbacées, pour la plupart aromatiques, comme ballote, basilic, bugle, lavande, marjolaine, mélisse, menthe, origan, romarin, sarriette, sauge, thym, etc. Nombreuses parmi ces plantes sont exploitées pour leur essence ou cultivées pour l'ornementation (Site web [1]).



Figure I. 1 : Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

I.1.3. Description botanique

Le romarin est un arbrisseau de 50 cm à 1,5 voire 2 mètres de hauteur, ligneux, toujours vert, très aromatique, très feuillé dès la base (Figure I.1). Les feuilles persistantes sont coriaces, sessiles, linéaires, entières, aux bords légèrement enroulés, beaucoup plus longues que larges, d'un vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. Leur odeur, très camphrée, évoque aussi l'encens (d'où il tient son nom « *encensier* » en provençal). La vie du romarin peut durer jusqu'à trente-trois ans.

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, pulvérulent, nu à la gorge, à lèvre supérieure ovale et entière, l'inférieure à deux lobes lancéolés. La corolle bilabiée, à tube saillant, 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, munies vers la base d'une petite dent, 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 (de couleur brune) à quatre carpelles obovales et lisses, dissimulés au fond du calice (Ducarf, 2007).

La floraison du romarin a lieu, en général, deux fois par an, la première au mois de Février (parfois en Janvier) jusqu'en Avril voire Mai, et la seconde en automne (Paume, 2008 ; Site web [3]). Cependant, il peut arriver de le voir fleurir en toute période lorsqu'il se trouve en situation optimale (Escuder, 2007).

I.1.4. Répartition géographique

Le romarin couvre un domaine géographique relativement vaste. Il pousse naturellement sur tous types de terrains avec une préférence pour les sols calcaires bien drainés, argileux ou argileux limoneux, situés dans les 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 ses nombreuses vertus : comme herbe condimentaire et mellifère (le miel du romarin est très réputé) (Site web [3] ; Site web [4]), ou 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).

Plante commune du bassin méditerranéen, son aire de répartition 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.1.5. Composition chimique

Les principaux constituants du *Rosmarinus officinalis* L. sont :

L'huile essentielle

L'huile essentielle de romarin est un liquide incolore ou jaunâtre dont l'odeur est fortement camphré, pénétrante de saveur très aromatique. Les sommités fleuries fournissent 10 à 25 ml/Kg (Bruneton, 1992). La teneur en huile essentielle dans le romarin varie en fonction de l'origine géo-climatique de la plante. Le type algérien renferme plus que (Boukhalfa, 1995) :

- 0,74 % dans la plante sèche ;
- 0,1 % dans les feuilles ;
- 1,4 % dans les fleurs et rameaux.

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de romarin, ainsi que de son activité biologique (l'activité antimicrobienne et anti-oxydante) a fait l'objet de plusieurs recherches. (Abdelli en 2010, Arab et Beddar en 2011, Boutekdjiret en 1999, Deans et *al.* en 1998 ; Farag et *al.* en 1989 ; Baratte et *al.* en 1998 ; Rasmussen et *al.* en 1972 ; CABO et *al.* en 1972).

Les huiles essentielles de romarin sont classées en chémotypes, selon leurs constituants majoritaires. 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.

Tableau I. 1 : Chémotypes de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

| Chémotypes | Teneur en % | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------------|------------------------------|
| | Camphre (Alaux, 2006) | 1,8-cinéol (Alaux, 2005) | Verbénone (Site Web [5]) | Myrcène (Mateus et <i>al.</i> , 2006) | ALGERIE | |
| | | | | | 1,8-cinéol Boutekedjiret (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 |
| Verbénone | 5,6 | 1,1 | 1,7 | 31,5 | tr | 1,0 |
| Myrcène | 0,5 | 0,2 | 10,8 | 1,4 | - | 1,5 |

Les principaux constituants de l'huile essentielle de romarin, objet de cette étude sont l'alpha pinène et le camphre (Figure I.2).



Figure I. 2 : Les structures des mono-terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) d'Algérie

La plante étudiée appartient, donc, au chémotype à camphre (Abdelli, 2010).

Composition phénolique

• Les acides phénoliques

Les acides phénoliques présents dans le romarin et à des teneurs importantes sont généralement des dérivés du phénol et de l'acide cinnamique, entre autres :

- l'acide rosmarinique ;
- l'acide caféique ;
- l'acide néo-chlorogénique ;
- l'acide vanillique (Cuvelier et *al.*, 1996).

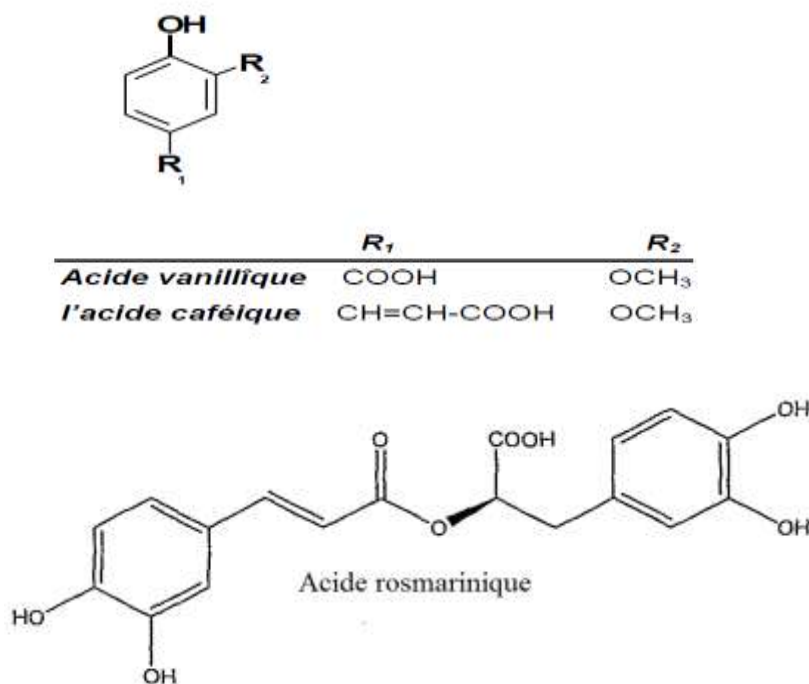


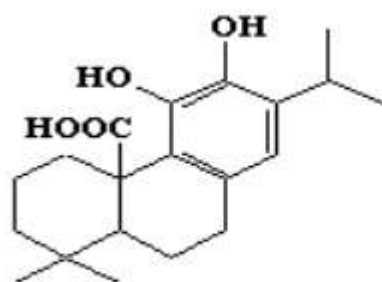
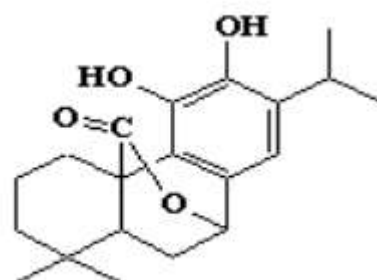
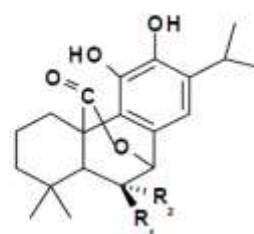
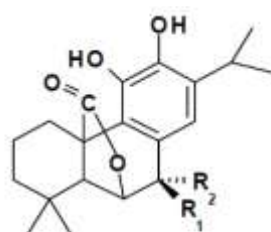
Figure I. 3 : Structures des acides phénoliques dans le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Plusieurs auteurs ont signalé la présence de ces acides phénoliques dans le *Rosmarinus officinalis* L. (Piozzi, 1994). Parmi eux, on peut citer: Benzeger et *al.* en 1980, Graza et Ruff en 1984, Lamaisons et Jean en 1991, Scarpati et Orient en 1958.

• Les diterpènes phénoliques

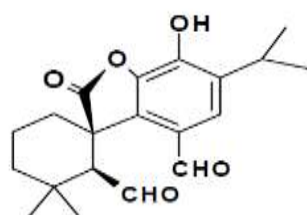
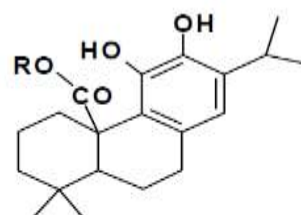
Plus de douze diterpènes, sont isolés et identifiés dans le romarin (Cuvelier et *al.*, 1996). Ils sont responsables de l'activité anti-oxydante de la plante. Les plus répandus sont l'acide carnosique, le carnosol, le 1,2-acide méthoxy carnosique, le rosmanol, l'épirosmanol (Paris et *al.*, 1993; Schwarz et Ternes, 1992; Culvier et *al.*, 1996 ; Naktani et *al.*, 1983 ; Naktani et Inatani, 1984 ; Haraguchi et *al.*, 1995 ; Chen et *al.*, 1992 ; Richheimer et *al.*, 1996).

L'acide carnosique est le constituant majoritaire parmi les diterpènes phénoliques et son pouvoir antioxydant est le plus puissant. Sa teneur dans les feuilles sèches de la plante dépasse 0,35 %. (Paris et *al.*, 1993; Schwarz et Ternes, 1992; Cuvelier et *al.*, 1996 ; Richheimer et *al.*, 1996).

**Acide carnosique****Carnosol**

| | R ₁ | R ₂ |
|--------------------------------|------------------|----------------|
| <i>Rosmanol</i> | H | OH |
| <i>Epirosmanol</i> | OH | H |
| <i>Epirosmanol-éthyl éther</i> | OCH ₃ | H |

| | R ₁ | R ₂ |
|---------------------------------|------------------|----------------|
| <i>Carnosol</i> | H | H |
| <i>Epiirosmanol</i> | OH | H |
| <i>Epiirosmanol-éthyl éther</i> | OCH ₃ | H |

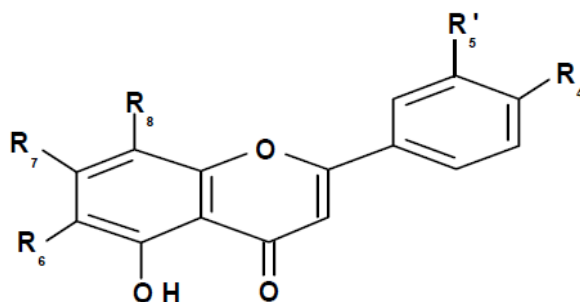
**Rosmordiale**

Rosmanol R = H
Epirosmanol R = OH

Figure I. 4 : Structures des différents diterpènes phénoliques du romarin.
 (*Rosmarinus officinalis* L.)

• Les flavonoïdes

Plus de dix flavonoïdes sont isolés et identifiés dans le romarin, sous forme d'aglycones, hétérosides de la lutéoline, de la diosmétine et flavones méthoxylées : genkwanine et dérivés, crisimaritine, scutellaréine, hespéridine et homoplantiginine (Piozzi, 1994 ; Cuvelier et *al.*, 1996).



| | <i>R</i> 6 | <i>R</i> 7 | <i>R</i> 8 | <i>R'</i> 4 | <i>R'</i> 5 |
|---|------------------|------------------|------------|------------------|-------------|
| <i>Apigénine</i> | H | OH | H | OH | H |
| <i>Genkwanine</i> | H | OCH ₃ | H | OH | H |
| <i>6-méthoxy Genkwanine</i> | OCH ₃ | OCH ₃ | H | H | OH |
| <i>Genkwanine-4- méthyl éther</i> | H | OCH ₃ | H | OCH ₃ | OH |
| <i>Lutéoline</i> | H | OH | H | OH | OH |
| <i>6- méthoxy-Lutéoline –méthyl éther</i> | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OH | OH |
| <i>6- méthoxy-Lutéoline</i> | OCH ₃ | OH | H | OH | OH |
| <i>4-,5, 7, 8 tétra –OH-flavone</i> | H | OH | OH | OH | H |
| <i>6- méthoxyLutéoline 7-glucoside</i> | OH | O-Glu | H | OH | OH |

Figure I. 5 : Structures des flavones de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

Ces molécules sont identifiées et isolées par plusieurs auteurs (Briesconet en 1967, Briescon et Michel en 1968, Sendra et *al.* en 1969, Lallment et Beauquesne en 1970, Briescon et *al.* en 1973).

- ✚ 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.1.6. Utilisations

Rosmarinus officinalis L. est une plante ornementale par son port, son feuillage et ses fleurs. Ses feuilles renferment une huile essentielle à laquelle elle doit ses propriétés intéressantes. Au 19^{ème} siècle, l'essence de romarin servait à la préparation de la très célèbre eau de Cologne de la reine de Hongrie. Aujourd'hui, elle rentre dans la composition de savons, détergents, crèmes et la plupart des parfums masculins et des eaux de Cologne ; le taux d'utilisation maximum est rapporté à 1% dans la dernière catégorie (Leung et Foster, 1996 ; Site web [6]).

Comme les autres plantes aromatiques, le romarin possède avant tout des vertus médicinales, découvertes au fil des siècles. Si les Grecs l'utilisaient pour renforcer la mémoire et de stimuler l'intellect, les bienfaits du romarin sont bien plus étendus. Regorgeant de flavonoïdes, il a en premier lieu une action antispasmodique et stimulante.

Cette plante stimule le fonctionnement de la vésicule biliaire et est indiqué, à ce titre, dans le traitement de l'insuffisance hépatique et d'inflammation chronique de la vésicule. Elle agit sur les fermentations intestinales et sur les douleurs abdominales qu'elles entraînent, en calmant les spasmes d'origine digestive par son action spasmolytique sur les intestins et l'estomac. Par son effet relaxant sur les muscles lisses du système respiratoire et de la sphère ORL, elle calme aussi la toux et contribue au confort de l'asthmatique, soigne les bronchites grâce à son huile essentielle antiseptique.

Le romarin est utilisé pour ses effets détoxiquant, diurétique, expectorante, antiinflammatoire, antinévralgique, astringent, aromatique. Utilisé en bouquet, ou en infusion dans le bain pour stimuler et tonifier l'organisme (Site web [7]), il favorise la pousse des cheveux en stimulant l'irrigation du cuir chevelu. Il est aussi recommandé aux convalescents, aux surmenés, aux dépressifs, de même qu'aux personnes sujettes aux palpitations, aux migraines, aux angoisses et aux insomnies (Site web [4]).

Le romarin agit, tant de façon externe qu'interne, sur le ralentissement de la vieillesse en piégeant les radicaux libres (Site web [6]). Les extraits de romarin présentent un pouvoir antioxydant important et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques (Leung et Foster, 1996). Sa capacité de conservation est comparable à celle des composés BHT et BHA, deux antioxydants de synthèse utilisés dans la conservation des aliments, mais présentant des risques cancérigènes. Il contient

des composés qui préviennent la baisse de l'acétylcholine qui survient lors de la maladie d'Alzheimer et améliore également la circulation sanguine dans le cerveau (Site web [8]).

I.2. Les radicaux libres

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement, tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert *et al.*, 2005).

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydatif, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène appelés aussi espèces réactives oxygénées (ERO) (Walker *et al.*, 1982).

I.2.1. Définition d'un radical libre

Un radical libre est un fragment moléculaire, neutre ou chargé, caractérisé par une instabilité et /ou un pouvoir oxydant fort. Il se différencie par la présence d'un électron (ou plus) non apparié sur la couche électronique la plus externe dit aussi « électron célibataire ». Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne (Dacosta, 2003).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxy $\text{ROO}\bullet$, radical alkoxy $\text{RO}\bullet$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (Novelli, 1997).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ERO). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit: radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle $\bullet OH$, monoxyde d'azote $NO\bullet$, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet 1O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxydinitrite $ONOO^-$ (Favier, 2003).

I.2.2. Les sources de production des radicaux libres

Les radicaux libres nocifs sont produits dans l'organisme au cours du métabolisme normal. Cette production augmente en rapport avec l'élévation de la consommation d'oxygène (Gauche et Hauswirth, 2006). Plusieurs mécanismes et systèmes responsables de la production de radicaux libres ont été identifiés jusqu'à présent, parmi eux nous citons :

- ✓ des fuites d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Aurousseau, 2002) ;
- ✓ des processus inflammatoires produits par les cellules phagocytaires activées (Milan, 2004 ; Van Antwerpen, 2006) ;
- ✓ les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones ;
- ✓ du système xanthine déshydrogénase/ oxydase activé lors d'ischémie-reperfusion (Li et Jackson, 2002 ; Valko *et al.*, 2004 ; Valko *et al.*, 2006) ;
- ✓ d'exposition à des agressions de l'environnement, comme les agents infectieux, le stress y compris le stress physique lié à l'effort, la pollution, la fumée de cigarette, le rayonnement (rayons X ou UV, radiation cosmique (voyage en avion)) et les métaux toxiques (chrome, vanadium, cuivre) (Tamer Fouad, 2003).

I.2.3. Dommages oxydatives des radicaux libres

Les phénomènes radicalaires de base sont utiles au bon fonctionnement de l'organisme. L'altération des composants cellulaires et des structures tissulaires intervient lorsque l'intensité de ces phénomènes augmente anormalement et dépasse la quantité d'antioxydants disponibles. La conséquence de ce déséquilibre va entraîner une agression appelée « stress oxydatif » (Rahman, 2002). Tous les tissus et tous leurs composants peuvent être touchés : lipides, protéines, glucides et ADN (Aurousseau, 2002 ; Valko *et al.*, 2006). Toutes ces altérations augmentent le risque de plus de 30

processus de différentes maladies (Aruoma, 1998). Parmi les, nous citons, les maladie d'Alzheimer (Smith *et al.*, 1996 ; Smith *et al.*, 2004), de Parkinson (Bolton *et al.*, 2000), de Creutzfeldt Jacob et de méningo-céphalites (Ali *et al.*, 2008), les maladies cardiovasculaires et déficience cardiaque (Jha *et al.*, 1995), les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti *et al.*, 2003) et le cancer (Ali *et al.*, 2008).

I.3. Les antioxydants

Le terme antioxydant (anti-oxygène) était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. À la fin du XIX^{ème} siècle et au début du XX^{ème} siècle, les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire par exemple la corrosion des métaux, la vulcanisation du caoutchouc et la polymérisation des carburants dans les moteurs à explosion.

En biologie, les premières recherches sur les antioxydants concernèrent la réduction de l'oxydation des acides gras insaturés, cause du rancissement. L'activité anti-oxydante était facilement mesurée en enfermant des corps gras dans des récipients hermétiques avec de l'oxygène, puis en vérifiant le taux d'absorption de ce dernier. Cependant, ce n'est qu'avec l'identification des vitamines A, C et E qu'est apparue l'importance des antioxydants dans la biochimie des organismes vivants.

I.3.1. Définition et classification

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, de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des ERO.

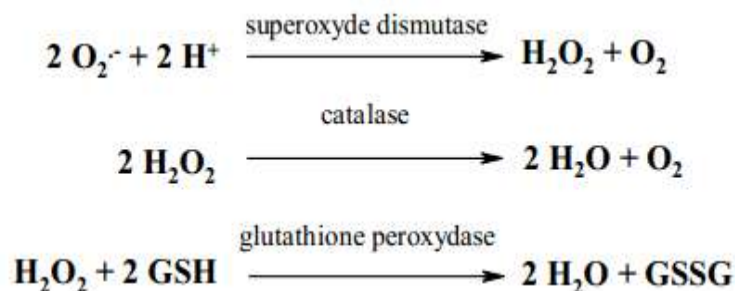
Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule (Favier, 2003).

I.3.1.1. Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes anti-oxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (Mika *et al.*, 2004). Cette ligne de défense est constitué par :

- Les superoxydes dismutases (SOD) : sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant. Elles catalysent la dismutation de deux anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène (Arora *et al.*, 2002).
- Les catalases (CAT) : Sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Arora *et al.*, 2002).
- Les peroxydases (POX): Sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons.
- Les peroxyredoxines (PRX), aussi appelées thiorédoxines peroxydases, sont des peroxydases non hémiques contenant un résidu cystéine au niveau de leur site catalytique. Les PRX sont des éléments essentiels du système de détoxification des espèces réactives de l'oxygène.
- Glutathion peroxydase (GPX) : Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂.

Ces enzymes anti-oxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait, elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (Dacosta, 2003), et le seul inconvénient que représente ces enzymes c'est qu'elles ont une vie très courte parce qu'elles s'épuisent facilement.

I.3.1.2. Des antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes anti-oxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Dacosta, 2003). Ils sont capables d'interrompre la réaction en chaîne en agissant comme donneur d'hydrogène vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde (composé intermédiaire formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (Ribeiro et *al.*, 2001).

Dans la catégorie des antioxydants secondaires, on peut distinguer deux groupes :

- ❖ Les antioxydants synthétiques
- ❖ Les antioxydants naturels

Le groupe le plus important est celui des antioxydants naturels, les antioxydants synthétiques, quant à eux, sont généralement préparés en laboratoire (Pelli et Lyly, 2003).

I.3.1.2.1. Les antioxydants naturels

Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures, dans les micro-organismes et aussi dans les tissus des animaux. 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) ; les polyphénols ; les flavonoïdes, très répandus dans de nombreux végétaux ; les tanins, présents dans le cacao, le café, le thé vert, le raisin ; les anthocynes, 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 [9]).

▲ **Les caroténoïdes** : sont des pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules. Ils sont présents dans les carottes, les fruits rouge et jaunes, les légumes verts et les tomates (Marc et *al.*, 2004). Les principaux caroténoïdes sont le β -carotène, le lycopène, la lutéine et l' α -carotène. L'activité anti-oxydante

de ces molécules repose principalement sur la présence de nombreuses doubles liaisons conjuguées au sein de leur structure (Mortensen *et al.*, 2001). Elles sont particulièrement efficaces dans la neutralisation de l'oxygène singulet et jouent le rôle de bouclier contre la photoinitiation de réactions radicalaires par les rayonnements UV. Le rôle biologique des caroténoïdes est, entre autres, complémentaire de celui de la vitamine E, elle-même régénérée par la vitamine C, d'où l'intérêt de consommer une alimentation équilibrée, riche en fruits et légumes variés pour bénéficier des nombreux effets de synergie entre micronutriments (Miller *et al.*, 1996). 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.

- ▲ **La vitamine E** : Elle désigne une famille de molécules liposolubles. Il en existe quatre isomères (α -, β -, γ -, δ - tocophérol) 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. 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). La vitamine E est présente dans les huiles végétales telles que l'huile de colza, ainsi que les noix, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes.
- ▲ **La vitamine C** : c'est un micronutriment qui n'est synthétisé par l'organisme humain et doit être apporté dans les aliments, on le trouve en grande quantité dans les agrumes, le kiwi, le persil. 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.

- ▲ **Les huiles essentielles** : elles sont connues pour posséder des activités anti-oxydantes. Ainsi, les huiles essentielles suscitent beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique, car les composés de ce type ont des propriétés oxydo-réductrices et jouent un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes.
- ▲ **Les composés phénoliques** : également 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 (Belkhiri, 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.3.1.2.2. Les antioxydants synthétiques

A cause de l'instabilité inhérente des antioxydants naturels, plusieurs antioxydants synthétiques, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. L'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'hydroxyanisole butylé (BHA) sont les plus répandus aujourd'hui, mais 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 comme la gallate de propyle (PG) (Pokorny et *al.*, 2001).

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Mais, récemment, beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire. Il existe beaucoup de travaux de recherches sur les effets biologiques des BHA/BHT, qui tournent autour de leurs actions au niveau du métabolisme énergétique des cellules ainsi que l'effet carcinologique. A cet effet, des études de toxicité chronique ont attribué une certaine activité tumorigène

au BHT lorsqu'il est absorbé en concentrations élevées (Witschi, 1981, Nationale Institute of Health Publications NIH, 1979).

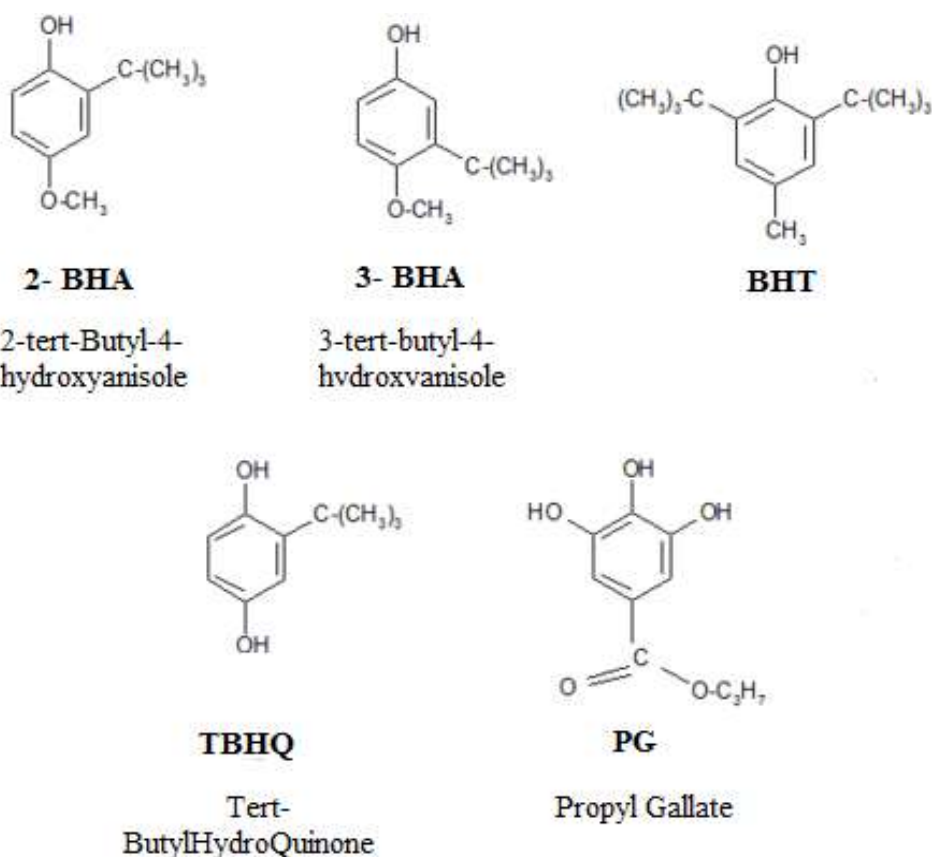


Figure I. 6 : Structures moléculaires des antioxydants de synthèse

Le besoin de réduire l'utilisation des antioxydants synthétiques, maintenant limitée dans plusieurs pays en raison de leurs possibles effets indésirables sur la santé humaine, impose d'orienter le marché vers des antioxydants d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce domaine (Herodez et *al.*, 2003).

I.3.2. Les antioxydants du *Rosmarinus officinalis* L.

Divers extraits d'herbes pouvant être utilisées en tant qu'antioxydant naturel sont à l'étude à l'heure actuelle. Parmi ces extraits naturels qui sont susceptibles d'être utilisés industriellement figurent les extraits des herbes de *Lamiaceae* qui contiennent des niveaux élevés des antioxydants diététiques (Zheng et Wang, 2001 ; Dragland et *al.*, 2003 ; Shan et *al.*, 2005 ; Halvorsen et *al.*, 2006), et le pouvoir antioxydant in vitro de ces herbes a été indiqué dans de nombreuses études (Exarchou et *al.*, 2002 ; Pizzale et *al.*, 2002 ; Dorman et *al.*, 2004).

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) appartenant à cette famille, possède une activité anti-oxydante caractérisée par la capacité à inhiber les radicaux libres (Vareltzis et *al.*, 1997). On dit que ses extraits sont très efficaces pour retarder l'oxydation des lipides et pour protéger les cellules vivantes des dommages causés par le stress oxydatif (Chen et *al.*, 1992 ; Wang et *al.*, 1995).

L'usage traditionnel de romarin comme épice, ainsi que les propriétés anti-oxydantes de ses feuilles ont poussé plusieurs groupes de recherche à étudier la composition de la plante et les constituants responsables de cette activité :

- La première approche pour l'utilisation des plantes aromatiques comme antioxydant est décrite par Chipault et *al.* en 1952.
- En 1955, Rac et Ostric ont utilisé l'extrait des feuilles de romarin comme antioxydant naturel (Cuvelier et *al.*, 1996 ; Boukhalfa, 1995).
- En 1966, Briscorn et *al.* ont isolé le carnosol dans le romarin et ils ont attribuée l'activité anti-oxydante à ce principe actif.
- Dans les années soixante et soixante-dix, la plus part des travaux dans cet axe sont effectués par des chercheurs japonais, Satio et *al.* en 1976.
- Fin des années soixante-dix, Chang et *al.* proposent un système d'extraction des antioxydants naturels de romarin et de soja. Une revue complète de ce sujet est publiée en 1985 par Kramer.
- Dans les années quatre-vingt, Inatani et Nakatani prend le chemin pour étudier les constituants de la fraction de diterpènes phénoliques et qui sont responsables aux effets antioxydants de romarin (Inatani et Naktani, 1984 ; Inatani et *al.*, 1983 ; Schwarz et Ternes, 1992)
- Au début des années quatre-vingt-dix, les recherches sont orientés vers (Paris et *al.*, 1993 ; Schwarz et Ternes, 1992 ; Inatani et Naktani, 1984 ; Culvier et *al.*, 1996) :

- L'isolation de l'*acide* carnosique à partir du romarin et la synthèse des autres diterpènes phénoliques;
- L'étude des différentes activités biologiques de cette fraction (diterpènes phénoliques) (in système vivo ou vitro).

Les extraits de romarin contiennent plusieurs composés dont les effets antioxydants ont été démontrés. Ces composés appartiennent essentiellement à la classe des acides phénoliques, des flavonoïdes, des diterpénoïdes et des triterpènes (European Food Safety Authority, 2008). Les propriétés anti-oxydantes du romarin sont principalement dues à l'acide carnosique, à l'acide rosmarinique et au carnosol (Culvier *et al.*, 1996, Richheimer *et al.*, 1996). Selon Aruoma *et al.* (1992), l'activité anti-oxydante des extraits de romarin est due à plus de 90% à l'acide carnosique et au carnosol.

L'industrie agroalimentaire a récemment découvert les puissantes propriétés antioxydantes du romarin. La plante pourrait en effet remplacer le BHT et le BHA, les deux antioxydants de synthèse utilisés pour la conservation des aliments, mais qui ont l'inconvénient de présenter un risque cancérigène.

I.3.3. Evaluation des propriétés anti-oxydantes

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité anti-oxydante des aliments et les systèmes biologiques (Ali *et al.*, 2008 ; Scherer et Godoy, 2009). Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes: soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron (Sanchez-Moreno, 2002; Huang *et al.*, 2005). Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998a). Les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de l'habileté du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), de l'acide hypochloreux (HOCl), de l'hydroxyle (•OH), des anions superoxyde (O⁻²•), du peroxyde (ROO•) et de l'oxyde nitrique (NO•) (Sanchez-Moreno, 2002).

Parmi ces techniques, nous citons :

- la méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (Cao *et al.*, 1993) ;
- la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité anti-oxydante équivalente de Trolox) (Miller *et al.*, 1993) ;
- la méthode FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) (Benzie et Strain, 1996) ;
- la méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (Brand-Williams *et al.*, 1995) ;
- la méthode de DMPD (Balayage du radical cation N, N- diméthyl- ρ -phenylenediamine) (Li *et al.*, 1994) ;
- la méthode TOSC (Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) (Winston *et al.*, 1998) ;
- la méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total) (Wayner *et al.*, 1985)
- la méthode photochimiluminescence (PCL) (Popov *et al.*, 1987) ;
- la méthode d'hémolyse (Charfi, 1995).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité anti-oxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité anti-oxydante de l'échantillon à tester.

Dans notre étude, pour évaluer l'activité anti-oxydante, nous avons utilisé la méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant des groupements SH-, NH- et OH- (Salah *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure - activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958 ; Brand-Williams et *al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure I.7). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, c'est-à-dire, le radical DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire.

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-hydrazine, 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.

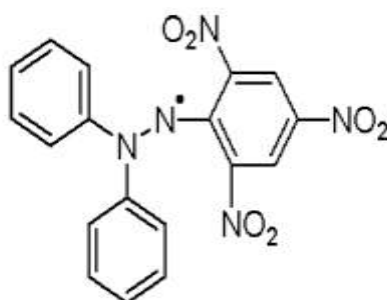


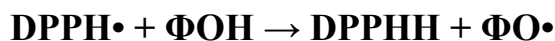
Figure I. 7 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyle)

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanisme:

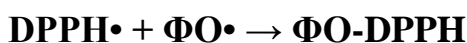
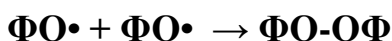
- i. la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle, caractérisée par une cinétique rapide, comme c'est le cas de certaines acides et dérivées phénoliques;

- ii. la libération d'un électron, caractérisée par une cinétique lente, observée pour les dérivées glycosylées et des anthocyanes. (Huang et *al.*, 2005 ; Nanjo et *al.*, 1996).

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH, alors transformé en une molécule stable DPPHH (Molyneux, 2004 ; Sanchez-Moreno et *al.*, 1998b):



Plusieurs voies réactionnelles qui forment des structures plus au 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 donneurs 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).

I.3.4. Applications des antioxydants

L'oxydation des lipides insaturés en présence d'oxygène sont des troubles majeurs qui, peuvent intervenir soit dans la cellule elle-même, soit lors de la préparation et de la conservation du produit utilisé par l'homme dans des domaines variés comme l'agroalimentaire, la pharmacologie et la cosmétologie. Elles conduisent à la formation de radicaux libres très réactifs et à des dérivés toxiques souvent carcinogènes et dont certains présentent des odeurs ou des saveurs désagréables.

L'addition des antioxydants est une solution pour protéger de tels produits de l'oxydation. L'objectif principal est d'empêcher l'altération des caractéristiques du

produit par inhibition de l'oxydation. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation de ce dernier.

Les antioxydants sont 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. Ils permettent aussi de favoriser la réponse et la protection immunitaire, ainsi de lutter contre les signes de vieillesse dus essentiellement à la destruction des cellules.

Un bon antioxydant doit présenter plusieurs propriétés :

- Efficacité à faible concentration
- Compatibilité physique et chimique avec le substrat qu'il est censé protéger
- Absence de toxicité

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.

I.4. Le procédé d'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide, encore appelée extraction par solvant, est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer ou de dissoudre, par immersion dans un liquide ou par arrosage par un liquide, un ou plusieurs composants (solides ou liquides) contenus dans le solide. C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide (la matière à extraire) et une phase liquide (le solvant d'extraction). Les constituants recherchés peuvent être soit le soluté, soit le résidu (Leybroos et Fremeaux, 1990). L'extraction par solvant reste l'une des méthodes les plus utilisées dans les différentes industries qui utilisent des matières premières de nature végétale comme, par exemple :

- L'industrie agro-alimentaire : extraction du sucre à partir de la canne à sucre ou de la betterave sucrière, extraction de l'huile alimentaire à partir du tournesol.
- L'industrie pharmaceutique : extraction des vitamines à partir des différents fruits, des antibiotiques et des alcaloïdes à partir des plantes.
- L'industrie des parfums : extraction des produits aromatiques à partir des plantes, fleurs et racines.

I.4.1. Mécanisme de l'extraction solide-liquide

Dans le cas typique de l'extraction des matières végétales, le soluté est localisé dans des cellules végétales à parois relativement peu perméables. L'extraction de ces matières par solvants, est un processus assez complexe, basé sur le phénomène de transfert de matière.

Ce processus peut être résumé en quatre étapes (Trambouz et Wauquier, 1975) :

- Pénétration du solvant dans le solide.
- Dissolution du soluté dans le solvant.
- Transfert de la solution obtenue vers l'interface solide-liquide.
- Diffusion du soluté contenu dans la solution au contact du solide vers la masse restante du solvant.

La dernière étape peut être considérée comme simple opération de mélange, dont la vitesse est négligeable devant la vitesse globale du processus.

I.4.2. Facteurs intervenant dans l'extraction solide-liquide

L'extraction par solvant peut être influencée par plusieurs facteurs (Trambouz et Wauquier, 1975) :

I.4.2.1. La nature et l'état du solide et du soluté

Dans les matières végétales le soluté est généralement occlus dans des sites, d'où il est extrait par un mécanisme d'osmose ou de diffusion capillaire à travers les parois cellulaires. Plus la matière est divisée, plus la surface d'échange est grande et plus le parcours moyen du soluté est petit. La fragmentation fine s'impose lorsque le soluté est stocké dans un réseau d'inerte, mais une grande finesse du solide peut devenir un inconvénient.

I.4.2.2. Le taux de l'humidité du solide

L'humidité influe négativement sur le rendement dans le cas d'utilisation des solvants hydrophobes. Leur immiscibilité à l'eau freine leur pénétration dans la cellule pour extraire les produits désirés.

I.4.2.3. La nature du solvant

Le choix du solvant repose sur plusieurs paramètres :

- Sélectivité.
- Température d'ébullition peu élevée.
- Grande capacité de dissolution.
- Faible viscosité.
- Sécurité de manipulation (point d'éclair, inflammabilité, toxicité).
- Bas prix et possibilité de recyclage.

Les solvants recommandés sont, généralement, l'eau, l'éthanol et les mélanges eau-acétone, eau-méthanol, eau-éthanol, etc. (Julien et Gavend, 1980). L'utilisation des hydrocarbures aromatiques est strictement encadrée, vu leurs propriétés cancérigènes.

I.4.2.4. La température

L'élévation de la température permet généralement l'accroissement de la solubilité, de la diffusion du soluté et la diminution de la viscosité de la solution. Elle est limitée par le risque d'extraire des composés non désirés et par le risque de dégradation thermique de soluté.

I.4.2.5. L'agitation du fluide

L'agitation du solvant en contact du solide permet le maintien des particules en suspension et l'homogénéité du milieu, a un effet toujours favorable sur l'opération.

I.4.2.6. La durée d'extraction

Il est conseillé d'arrêter l'extraction à l'instant où le rendement en produit de meilleure qualité soit maximal.

I.4.3. Les méthodes d'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide regroupe plusieurs méthodes différentes. Cette diversité de méthodes, a été induite par plusieurs facteurs, dont la variété de matières premières, l'utilisation industrielle des extraits, ainsi que les conditions de mise en contact entre les deux phases (Leybroos et Fremeaux, 1990). On citera, entre autres, la lixiviation ou lessivage, la percolation, la décoction, l'infusion, la macération, la digestion et l'élution.

I.4.4. Technologies des extracteurs solide-liquide

D'autres considérations interviennent dans la technologie de mise en œuvre d'une extraction solide-liquide, en l'occurrence, les processus continus ou discontinus, avec la phase solide en lit fixe, mobile ou dispersé, ce qui distingue les appareils d'extraction. (Leybroos et Fremeaux, 1990).

Dans cette étude nous avons réalisé l'extraction en discontinu à charge dispersée. Le contact intime entre le solide et le solvant est assuré par agitation mécanique.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1. Matière végétale utilisée

II.1.1. Cueillette

La matière végétale, objet de ce travail, provient d'un lot cultivé à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. Elle a été identifiée au Département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger, comme étant *Rosmarinus officinalis* L.

La récolte a été effectuée en période de floraison, à la fin du mois de Janvier 2014. Les parties de la plante utilisées sont les sommités aériennes constituées des feuilles et des tiges.

Le lot a été stocké à la température ambiante quasi-constante, égale à 16 ± 1 °C.

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).

L'échantillonnage a été réalisé selon la procédure suivante (Gueorguiev, 1995) :

- ✓ la masse de matière végétale du lot mère, bien mélangée, 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 :



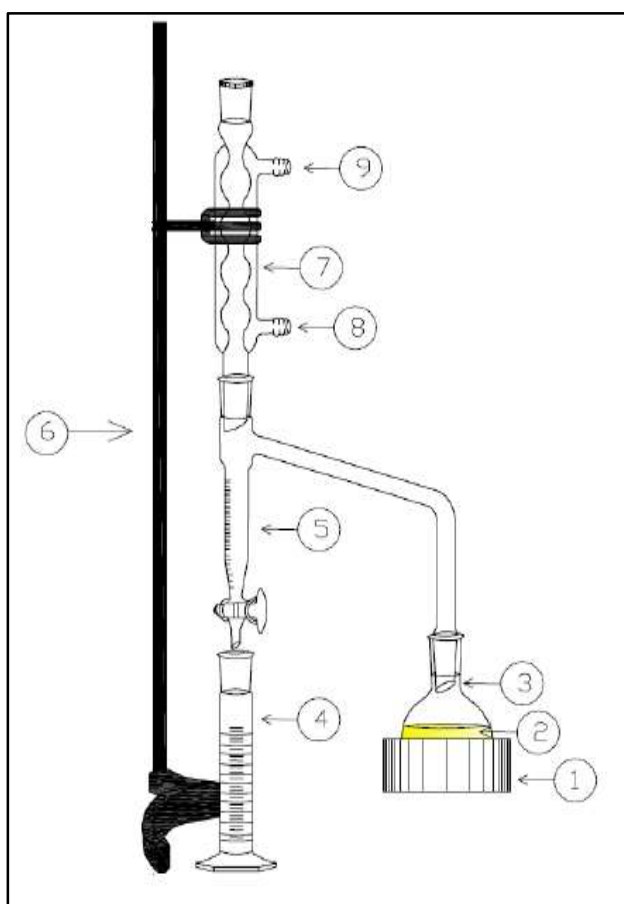
Figure II. 1 : Echantillonnage de la matière végétale

- ✓ chaque partie obtenue, est ensuite 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 par distillation azéotropique au xylène, dans un appareil de Dean et Stark, présenté à la Figure II.2 (Site web [10]).



- 1) Chauffe ballon
- 2) Xylène
- 3) Ballon de 250mL
- 4) Epreuve
- 5) Tube récepteur gradué de 0 à 10 mL, muni d'un robinet à sa partie inférieure.
- 6) Support
- 7) Réfrigérant à reflux
- 8) Entrée de l'eau de refroidissement
- 9) Sortie de l'eau de refroidissement

Figure II. 2 : Dispositif de Dean et Stark pour la mesure du taux d'humidité

La détermination du taux d'humidité a été réalisée selon la méthode normalisée ISO 1897-2 (Site web [11]) 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 pourcent (%), est calculée par la formule (II.1) suivante :

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

Avec:

- ✓ **H** : taux d'humidité, % ;
- ✓ **V_{eau}** : volume d'eau recueilli dans le tube récepteur, mL ;
- ✓ **ρ_{eau}** : masse volumique de l'eau à la température de la mesure, g/mL ;
- ✓ **M** : masse de la matière végétale humide, g.

II.2. Extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.

II.2.1. Dispositif expérimental

L'extraction a été réalisée en utilisant le dispositif expérimental schématisé sur la Figure II.3. Il est constitué d'un extracteur en verre, de volume 2 L, équipé d'un couvercle étanche, traversé par un agitateur mécanique à vitesse d'agitation variable et surmonté d'un réfrigérant à reflux.



Figure II. 3 : Dispositif expérimental de l'extraction

La température d'extraction est maintenue constante avec une précision de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ à l'aide d'un bain thermostaté, dans lequel est plongé l'extracteur.

II.2.2. Protocol expérimental

L'échantillon de la matière végétale, constitué des feuilles et des tiges du *Rosmarinus officinalis* L., préalablement pesé, est mis en contact avec l'eau dans l'extracteur. Le rapport du volume de la phase liquide et la masse de la phase solide est fixé à 16. Le mélange est agité et maintenu à une température fixée, selon les conditions opératoires.

Après un temps d'extraction bien déterminé, les phases solide et liquide sont séparées par filtration. La phase liquide contenant les composés phénoliques est récupérée et conservée au réfrigérateur.

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

Le rendement en extrait sec est calculé par rapport à la masse de la matière sèche selon la relation (II.2) suivante :

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

Où R_{ES} désigne le rendement en extrait sec, exprimé en pourcentage, m_{ES} et M_s sont, respectivement, les masses, en grammes, de l'extrait sec et de la matière végétale sèche. M_s est calculée par la formule (II.3) suivante :

$$M_s = M \times (1-H) \quad (II.3)$$

Tel que :

- ✓ **M**: la masse de matière végétale utilisée.
- ✓ **H** : Le taux d'humidité.

II.3. Mesure du pH

La mesure du pH a été effectuée, à la température ambiante, à l'aide d'un pH-mètre Hanna meteur, muni d'une électrode en verre/Ag/AgCl.

II.4. Dosage des composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques, présents dans les extraits aqueux, a été évaluée par la méthode colorimétrique de Folin-Denis, décrite par Jiao et *al.* (2005), en utilisant l'acide gallique comme standard.

II.4.1. Principe de la méthode de Folin-Denis

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, 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.

II.4.2. Protocole expérimental

Un volume de 0,5 mL d'échantillon à doser est versé dans une fiole de 20 mL 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 composés phénoliques, 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.5. Evaluation des propriétés anti-oxydantes des extraits

II.5.1. Protocol expérimental

La solution de DPPH à 100 $\mu\text{M}/\text{mL}$ est préparée en utilisant comme solvant le méthanol. Elle peut être utilisée pendant une durée maximale de cinq jours, à condition d'être conservée à l'abri de la lumière et à une température avoisinant les -5°C . 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.

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 extraits aqueux.

Les mesures de l'absorbance ont été réalisées à une longueur d'onde de 517 nm, avec un spectrophotomètre UV-VIS SECOMAM S250. Avant de procéder à l'analyse, l'appareil est étalonné au méthanol.

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 pendant 10 secondes 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.

II.5.2. Détermination du pourcentage d'inhibition

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

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

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), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Molyneux 2004).

II.5.3. Détermination de la concentration inhibitrice IC₅₀

La concentration inhibitrice IC₅₀ est la concentration d'un antioxydant, nécessaire pour provoquer une réduction de 50% de l'absorbance du DPPH dans le milieu réactionnel.

Ce paramètre, exprimé en microgrammes d'antioxydant par millilitre de solution, 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'IC₅₀ est petite.

II.5.4. Détermination de l'indice d'activité anti-radicalaire

L'indice d'activité anti-radicalaire, IAA, est défini par le rapport (II.5) :

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

Avec :

- ✓ **C_{DPPH}** : Concentration de la solution du DPPH dans la cellule au moment de l'analyse.
- ✓ **IC₅₀** : Concentration inhibitrice à 50%, toutes deux exprimées en µg/mL (Scherer et Godoy, 2009).

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

Selon Scherer et Godoy (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.6. Plan d'expériences et modélisation mathématique

L'expérimentation est un des moyens privilégiés pour acquérir ou améliorer les connaissances, mais elle doit être optimisée, car l'objectif est d'obtenir des informations les plus fiables possible en réalisant un minimum d'essais. Aussi, toute expérience devrait être l'objet d'une planification précise qui se concrétise sous la forme d'un plan d'expériences.

Les plans d'expériences constituent une stratégie d'organisation de l'expérimentation, afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique. La méthodologie des plans d'expériences est basée sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats.

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt, y , et des variables x_i . Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type : $y = f(x_i)$.

II.6.1. Terminologie

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée y , porte le nom de réponse. Les variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées paramètres ou facteurs x_i . Les

termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences (Goupy et Creighton, 2009).

- La réponse y (variable de sortie) correspond à un paramètre de sortie du système étudié. Une réponse doit être représentative, quantifiable et la moins dispersée possible pour des variables d'entrées maîtrisées et constantes (Droesbeke et *al.*, 1997).
- Le paramètre d'entrée d'un système (variable d'entrée ou facteur) x est une cause possible de variation de la réponse y . Un facteur peut être qualitatif ou quantitatif, continu ou discontinu, contrôlable ou non contrôlable.

Les facteurs sont pleinement caractérisés par les valeurs suivantes :

- ✓ Borne inférieure (b_{inf}) : limite basse (ou niveau bas) des valeurs que le facteur peut prendre.
- ✓ Borne supérieure (b_{sup}) : limite haute (ou niveau haut) des valeurs que un facteur peut prendre.

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, est appelé domaine de variation du facteur ou plus simplement le domaine du facteur. S'il y a plusieurs facteurs, chacun d'eux a son domaine de variation. Afin d'avoir une représentation commune pour tous les facteurs, les niveaux bas sont indiqués par -1 et les niveaux hauts sont indiqués par +1 (Droesbeke et *al.*, 1997).

Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental.

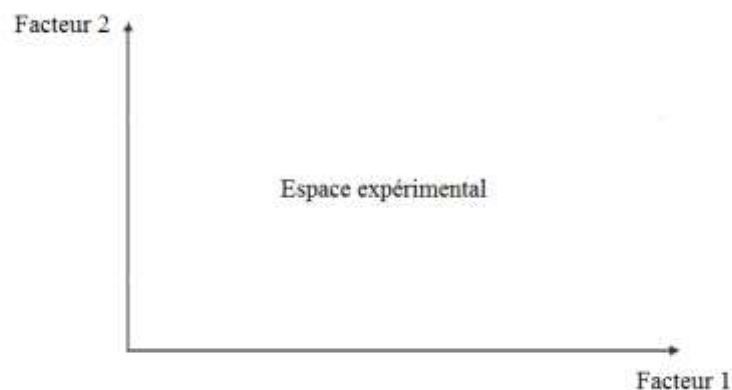


Figure II. 4 : Espace expérimental

Dans la pratique, l'expérimentateur sélectionne une partie de l'espace expérimental pour réaliser son étude. Cette zone particulière de l'espace expérimental est le domaine d'étude. Il est défini par les niveaux hauts et les niveaux bas de tous les facteurs.

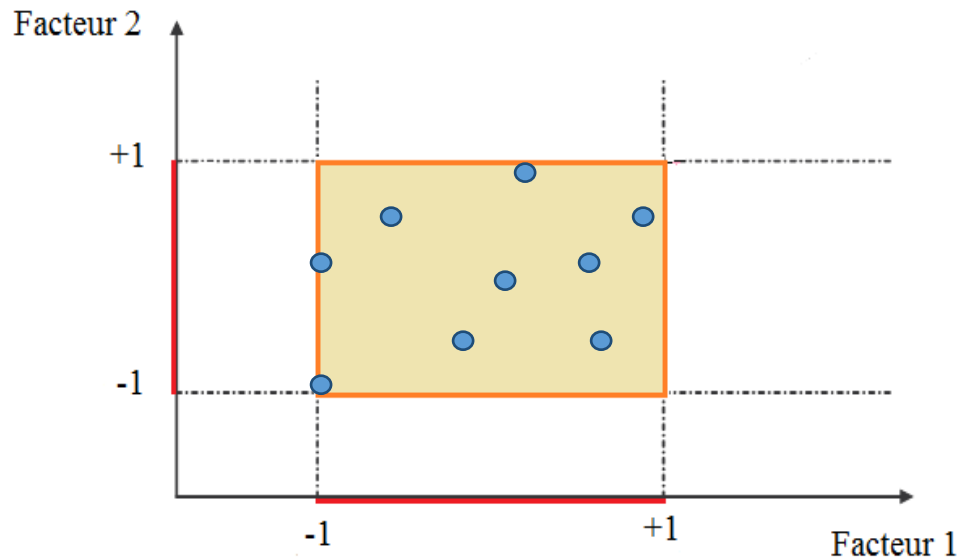


Figure II. 5 : Domaine d'étude pour un plan à deux facteurs

Jusqu'à trois facteurs, il est possible de dessiner le domaine d'étude. Au-delà de trois facteurs, on utilise une représentation en tableau, dite matricielle, plus générale puisqu'elle permet de représenter les points d'expériences dans un hypervolume à un nombre quelconque de dimensions.

Les points intérieurs à ce domaine sont les points de l'expérience, car ils sont la traduction mathématique, par leur coordonnées, des combinaisons de valeurs des grandeurs physiques leur correspondants (Droesbeke et *al.*, 1997).

▪ Surface de réponse

La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un axe orthogonal à l'espace expérimental est alors attribué à la réponse.

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. L'ensemble des réponses qui correspond à tous les points du domaine d'étude forme la surface de réponse (Figure II.6) (Goupy et Creighton, 2009).

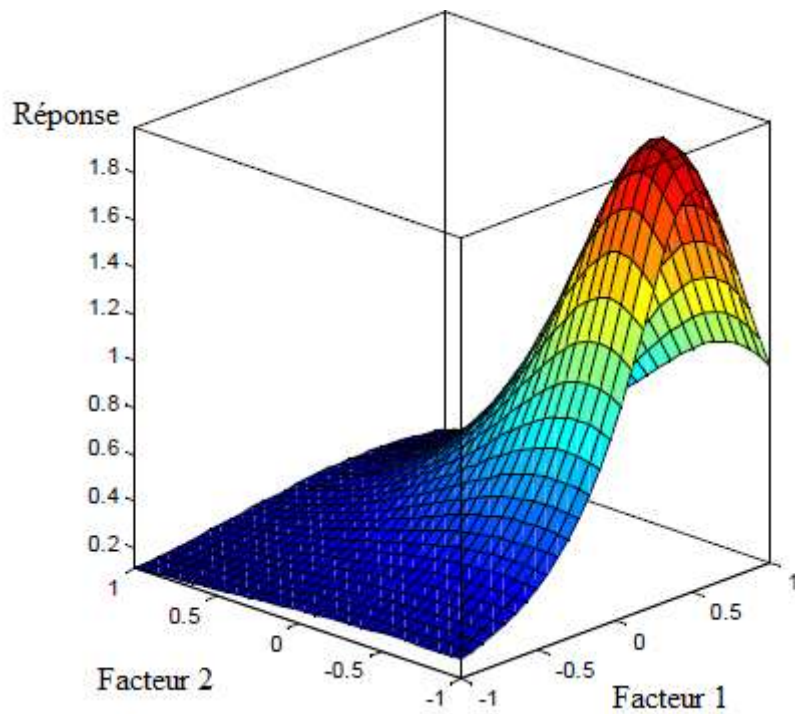


Figure II. 6 : Surface de réponse pour un plan à deux facteurs

La projection de la surface de réponse sur un plan horizontal, donne un graphique d'iso contours, présenté sur la Figure II.7 suivante, qui affiche des lignes ou des régions colorées basées sur les valeurs de la réponse prévue.

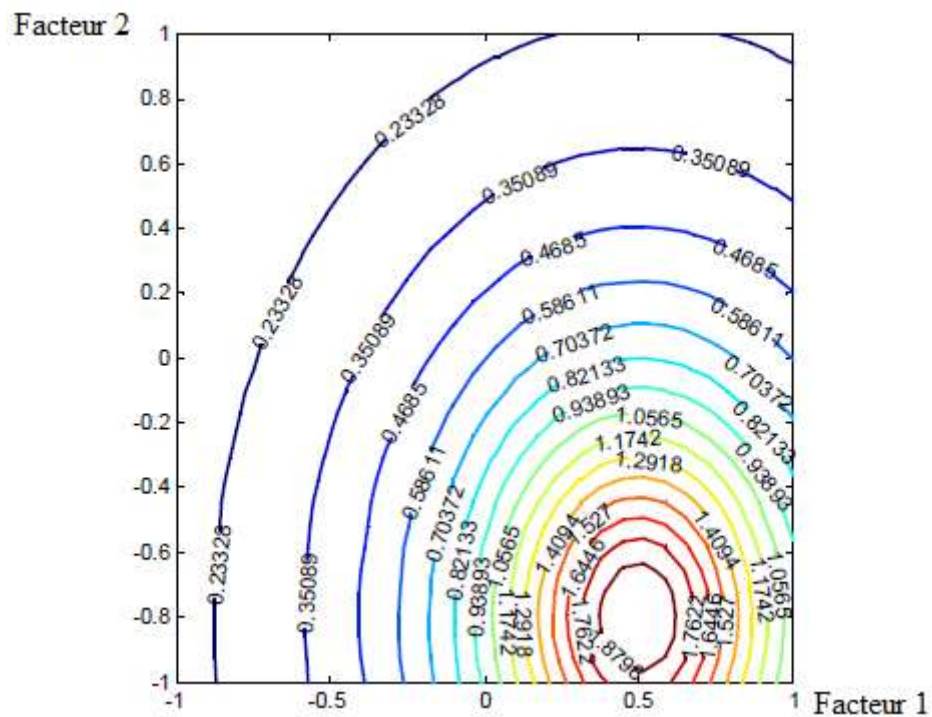


Figure II. 7 : Projection de la surface de réponse sur un plan horizontal

II.6.2. Coordonnées centrées réduites

Lorsqu'on attribue la valeur -1 au niveau bas d'un facteur, la valeur 0 au niveau de base et la valeur $+1$ au niveau haut, on effectue deux modifications importantes :

- ✓ On change l'unité de mesure.
- ✓ On déplace l'origine des mesures.

Ces deux modifications entraînent l'introduction de nouvelles variables que l'on appelle variables centrées réduites (V.C.R.). Centrées, pour indiquer le changement d'origine, et réduites pour signaler la nouvelle unité.

Le passage des variables d'origine, A , aux variables centrées réduites, x , et inversement, est donné par la formule suivante, où A_0 est la valeur centrale en unités courantes :

$$x = \frac{A - A_0}{Pas} \quad (\text{II.6})$$

Où A_0 est la valeur centrale entre le niveau haut et le niveau bas et le Pas est égal à la moitié de la différence entre les deux niveaux.

L'intérêt des variables centrées réduites est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines d'étude retenus et quels que soient les facteurs. (Goupy et Creighton, 2009).

II.6.3. Notion de modèle mathématique

Un modèle mathématique est une fonction, généralement, un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin, qui relie la réponse aux facteurs. Ses dérivées sont supposées finies et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé :

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \sum a_{ii} x_i^2 + \dots \quad (\text{II.7})$$

Où :

- ✓ y : est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et est obtenue avec une précision donnée.
- ✓ x_i : représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai.
- ✓ a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} : sont les coefficients du modèle mathématique adopté. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer, d'une part, toutes les réponses dans le domaine d'étude sans être obligé de réaliser les expériences et d'autre part, de rechercher l'extremum de la fonction mathématique (Goupy et Creighton, 2009).

II.6.4. Plan factoriel complet à trois niveaux de deux paramètres

Dans notre étude, le plan factoriel utilisé est un plan à trois niveaux de deux facteurs, 3^2 . Ce plan prévoit 9 essais à réaliser et le modèle mathématique comporte 6 coefficients :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 \quad (\text{II.8})$$

Une fois le modèle établi, on doit procéder à une évaluation statistique pour vérifier sa validité et apprécier les effets individuels et conjugués des paramètres étudiés.

II.6.5. Logiciel Statgraphics Centurion XVI

STATGRAPHICS Centurion XVI est la 16^{ème} version du logiciel STATGRAPHICS pour micro-ordinateurs. La première version est parue en 1982.

C'est un logiciel d'analyse statistique et graphique largement utilisé pour les statistiques descriptives et exploratoires, les modélisations, l'amélioration de la qualité et le Six Sigma. Il inclut plus de 180 procédures, dont :

- Analyses exploratoires des données ;
- Analyses de la variance et régressions ;
- Ajustements de lois ;
- Maîtrise Statistique des Procédés (SPC) ;
- Plans d'expériences ;
- Six Sigma ;
- Fiabilité et méthodes de survie ;
- Analyses de séries temporelles et prévision ;
- Méthodes multivariées ;
- Méthodes non paramétriques (STATGRAPHICS® CENTURION XVI, User manual, 2013).

II.7. Réactifs utilisés

- Méthanol (99,7%, Sigma Aldrich)
- Réactif de Folin-Denis (Merck)
- Acide gallique (99,5%, Sigma)
- Acide ascorbique (PA, Panreac)
- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Aldrich)
- Carbonate de sodium (99%, Rectapur)
- Xylène (Fluka)

Chapitre III

Résultats et discussions

III.1. Elaboration du plan des expériences de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.

III.1.1. Choix des paramètres et des critères d'optimisation

La température et la durée de l'extraction sont les principaux paramètres intervenant dans l'extraction solide-liquide. Ils sont indépendants, continus, expérimentalement accessibles et quantitativement mesurables. Pour ces raisons ils ont été choisis comme variables d'entrée ou paramètres à optimiser.

Quant aux critères d'optimisation, ou grandeurs d'intérêt, appelés encore réponses, le choix s'est porté sur le rendement R_{ES} en extrait sec, la concentration des composés phénoliques dans la phase liquide, exprimée en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG), par millilitre (mg EAG/mL), ou par gramme de matière sèche (mg EAG/g Ms) et l'indice d'activité anti-radicalaire IAA. Ces trois critères d'optimisation sont, eux aussi, quantitativement mesurables. Cependant, un rendement en extrait sec élevé peut ne pas correspondre à une teneur élevée en antioxydants, car en fonction des conditions opératoires de l'extraction, des produits hydrosolubles, autres que les antioxydants peuvent être récupérés. Enfin, l'indice d'activité anti-radicalaire IAA renseigne sur le potentiel antioxydant des extraits et est, donc, une réponse qualitative, tout en demeurant quantitativement mesurable.

III.1.2. Choix du plan des expériences et du modèle mathématique

Nous avons opté pour un plan factoriel complet à trois niveaux des deux paramètres. Le plan 3^2 prévoit 9 essais, soit le total des combinaisons des trois niveaux des deux paramètres. Les résultats des essais programmés et réalisés permettent d'établir un modèle mathématique de second ordre.

III.1.3. Définition du domaine d'étude

En tenant compte de la capacité de l'installation, des résultats des essais préliminaires et des travaux antérieurs (Bounoua et Boumahdi, 2013), nous avons fixé et réuni, dans le Tableau III.1, les niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser. Le fait que la température et le temps sont des grandeurs continues, leur conversion en variables réduites n'est pas nécessaire.

Tableau III. 1 : Niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser

| Paramètre \ Niveau | Niveau inférieur | Niveau de base | Niveau supérieur |
|----------------------------|------------------|----------------|------------------|
| Température, °C | 40 | 60 | 80 |
| Durée de l'extraction, min | 30 | 90 | 150 |

Des échantillons représentatifs du lot mère de même taux d'humidité, égale à 21,56%, ont été utilisés pour les 9 essais prévus par le plan 3^2 . Ils ont été conservés au réfrigérateur, afin d'éviter une variation importante du taux d'humidité de la matière végétale. Pour les mêmes raisons, les neuf essais ont été réalisés en espace de quatre jours. Pour chacun des essais, nous avons déterminé le rendement en extrait sec R_{ES} , la concentration en composés phénoliques de l'extrait aqueux en mg EAG/mL et l'indice d'activité anti-radicalaire IAA. Ces résultats ont permis d'établir le modèle mathématique pour chaque réponse et d'apprécier les effets individuels, conjugués et quadratiques des deux paramètres étudiés.

III.2. Modélisation

III.2.1. Modélisation du rendement en extrait sec

Les conditions opératoires des essais programmés et réalisés par la suite, ainsi que le rendement en extrait sec R_{ES} sont regroupés dans le Tableau III.2 suivant :

Tableau III. 2 : Conditions opératoires des essais programmés par le plan factoriel des expériences 3^2 et les rendements R_{ES} en extraits sec obtenus

| Essai | T, °C | t, mn | R_{ES} , % |
|-------|-------|-------|--------------|
| 1 | 40 | 30 | 2,19 |
| 2 | 60 | 30 | 2,81 |
| 3 | 80 | 150 | 15,30 |
| 4 | 40 | 90 | 2,81 |
| 5 | 60 | 90 | 3,11 |
| 6 | 80 | 90 | 9,84 |
| 7 | 40 | 150 | 2,55 |
| 8 | 60 | 150 | 5,00 |
| 9 | 80 | 30 | 3,77 |

Les résultats du Tableau III.2 montrent que le rendement en extrait sec est très affecté par la température et le temps de l'extraction : il varie entre 2,19%, pour l'essai 1, et 15,30 %, pour l'essai 3.

L'équation (III.1) du modèle mathématique comporte 6 termes, dont les coefficients de régression ont été déterminés à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVI :

$$R_{ES} = 23,9363 - 0,7624.T - 0,1005.t + 6,0917.10^{-3}.T^2 + 2,3271.10^{-3}.T.t + 4,6296.10^{-6}.t^2$$

(III.1)

On constate que les effets individuels de la température et du temps influencent le plus le rendement en extrait sec, l'effet quadratique de la température et l'effet conjugué des deux paramètres sont de même ordre de grandeur, en revanche, le coefficient du terme quadratique du temps étant très petit par rapport aux autres, ce terme peut être négligé.

III.2.2. Modélisation de la teneur en composés phénoliques de l'extrait aqueux du *Rosmarinus officinalis* L.

Lors de l'extraction des antioxydants du romarin, nous avons mesuré le pH des différents extraits aqueux obtenus. Les valeurs de pH enregistrées entre 6,09 et 7,23, signifiant la présence des composés à caractère acide, en l'occurrence, des acides carboxyliques, et/ou des composés phénoliques hydrosolubles, nous ont suggéré à effectuer un test avec le réactif de Folin-Denis. Ce dernier s'est avéré positif, témoignant de la présence de composés phénoliques. Nous avons, alors, appliqué la méthode de Folin-Denis pour le dosage des composés phénoliques, en utilisant l'acide gallique comme standard. 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 $R^2=0,9996$:

$$A = 0,7106.C_{AG}$$

(III.2)

Les résultats du dosage, exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique (EAG), par millilitre des extraits aqueux (mg EAG/mL) et par gramme de matière sèche (mg EAG /g Ms) sont réunis dans le Tableau III.3 suivant :

Tableau III. 3 : Résultats du dosage des composés phénoliques dans les extraits aqueux du *Rosmarinus officinalis* L.

| Essai | T, °C | T, mn | Teneur en composés phénoliques | |
|-------|-------|-------|--------------------------------|-------------------------|
| | | | mg EAG/mL | mg EAG/g M _s |
| 1 | 40 | 30 | 0,51 | 10,3 |
| 2 | 60 | 30 | 0,79 | 16,1 |
| 3 | 80 | 150 | 2,42 | 49,4 |
| 4 | 40 | 90 | 0,45 | 9,2 |
| 5 | 60 | 90 | 0,79 | 16,1 |
| 6 | 80 | 90 | 1,35 | 27,6 |
| 7 | 40 | 150 | 0,56 | 11,5 |
| 8 | 60 | 150 | 0,62 | 12,6 |
| 9 | 80 | 30 | 0,79 | 16,1 |

L'examen des valeurs du Tableau III.3, suscite les remarques suivantes :

- La teneur en composés phénoliques dans la phase liquide varie sensiblement, en fonction de la température et du temps de l'extraction : entre 0,45 et 2,42 mg EAG / mL.
- Les essais 2 et 4 ont fourni le même rendement en extrait sec, égal à 2,81% (Tableau III.2), alors que les teneurs en composés phénoliques dans les phases liquides issues de ces essais sont de 0,79 et 0,45 mg EAG / mL, respectivement.
- La teneur en composés phénoliques des phases liquides des essais 2, 5 et 9 est la même, égale à 0,79 mg EAG / mL, mais les rendements en extrait sec sont différents.

L'équation (III.3) du modèle mathématique, donnant l'évolution de la teneur en composés phénoliques dans la phase liquide, en fonction de la température et du temps de l'extraction, s'écrit :

$$EAG = 66,7503 - 1,8092.T - 0,4016.t + 1,4358.10^{-2}.T^2 + 6,6979.10^{-3}.T.t + 4,7732.10^{-4}.t^2$$

(III.3)

On constate que, comme dans le cas du rendement en extrait sec, les effets individuels de la température et du temps influencent le plus la teneur en composés phénoliques dans la phase liquide et l'effet quadratique du temps peut être négligé.

III.2.3. Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire

III.2.3.1. Evaluation du potentiel antioxydant des extraits aqueux du *Rosmarinus officinalis* L.

Nous avons procédé à l'évaluation de la capacité de piégeage du radical libre DPPH, de l'ensemble des échantillons des extraits aqueux récupérés, lors de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.

III.2.3.1.1. Détermination de la concentration IC₅₀

Afin de déterminer la concentration, en $\mu\text{g/mL}$, des extraits aqueux nécessaires à la diminution de l'absorbance du DPPH de 50%, nous avons préparé des solutions aqueuses des échantillons des extraits aqueux, de concentrations 10, 20, 30, 40 et 50 $\mu\text{g/mL}$. 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.1 présente l'allure générale des courbes $A = f(C)$ et $I = f(C)$, obtenues pour chacun des échantillons des extraits aqueux, où C est la concentration en extrait au moment de la mesure.

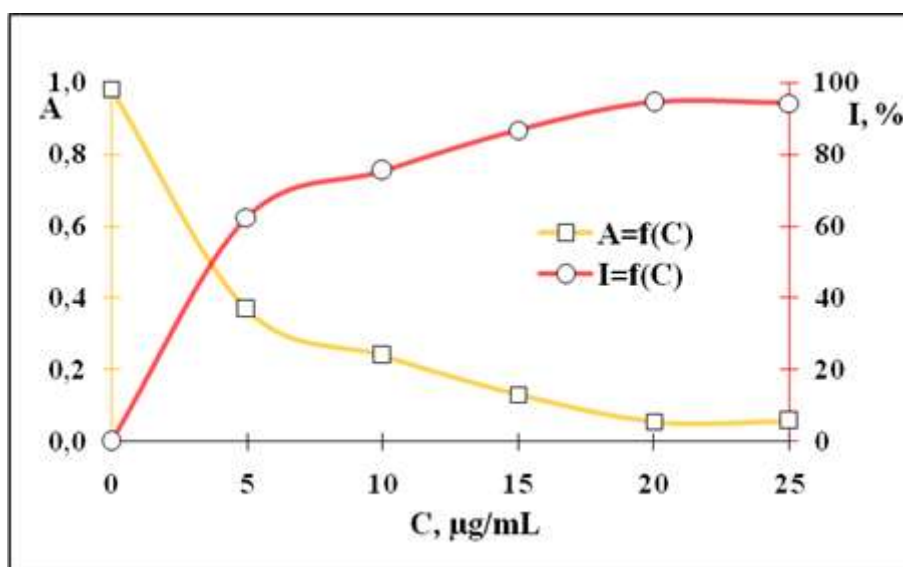


Figure III. 1 : Evolution de l'absorbance du DPPH et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration de l'échantillon testé

Les valeurs des concentrations IC_{50} des échantillons des extraits aqueux du *Rosmarinus officinalis* L., ont été déterminées, à partir des courbes $I = f(C)$, en posant $I = 50\%$.

III.2.3.1.2. 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 $R^2=1$.

$$A = 0,032.C_{DPPH} \quad (\text{III.4})$$

Où C_{DPPH} est la concentration massique du DPPH exprimée en $\mu\text{g/mL}$.

Nous avons eu recours à la courbe d'étalonnage, afin d'estimer la concentration finale de la solution du DPPH.

Les indices d'activité anti-radicalaire de l'ensemble des échantillons des extraits aqueux sont calculés par le rapport de cette concentration et la concentration IC_{50} , déterminée précédemment.

III.2.3.2. Modélisation de l'indice d'activité anti-radicalaire

Les indices d'activité anti-radicalaire de l'ensemble des échantillons des extraits aqueux, sont rapportés dans le Tableau III.4 suivant :

Tableau III. 4 : Valeurs des IAA des échantillons des extraits aqueux de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L.

| Essai | T, °C | t, mn | IAA |
|-------|-------|-------|------|
| 1 | 40 | 30 | 3,58 |
| 2 | 60 | 30 | 3,32 |
| 3 | 80 | 150 | 4,62 |
| 4 | 40 | 90 | 3,23 |
| 5 | 60 | 90 | 3,43 |
| 6 | 80 | 90 | 4,11 |
| 7 | 40 | 150 | 3,34 |
| 8 | 60 | 150 | 3,42 |
| 9 | 80 | 30 | 3,58 |

L'examen des valeurs du Tableau III.4, nous permet de formuler les remarques suivantes :

- Les valeurs des IAA des échantillons des 9 essais sont toutes supérieures à 2 et permettent de conclure que les extraits aqueux du *Rosmarinus officinalis* L. obtenus présentent une très forte activité anti-radicalaire (Scherer et Godoy, 2009).
- L'indice d'activité anti-radicalaire de l'échantillon obtenu par l'essai 3, égal à 4,62 est supérieur à celui de l'acide ascorbique, IAA= 4,48 (Haddou et Hamouche, 2012) qui compte parmi les antioxydants très puissants.

Le modèle mathématique, donnant l'évolution de l'indice d'activité anti-radicalaire des extraits aqueux, en fonction de la température et du temps de l'extraction est donné par l'équation (III.5) suivante :

$$IAA = 6,7894 - 0,1120.T + 0,0162.t + 8,3333.10^{-4}.T^2 + 2,6667.10^{-3}.T.t + 1,48148.10^{-5}.t^2 \quad \text{(III.5)}$$

Comme dans les modèles, relatifs au rendement en extrait sec et à la teneur en composés phénoliques, on observe que, l'effet individuel de la température, suivi de l'effet individuel du temps sont les plus importants, l'effet quadratique du temps est le plus faible.

III.3. Evaluation statistique des modèles mathématiques établis

Avant de procéder à l'évaluation statistique des modèles mathématiques établis, nous les avons corrigés, en éliminant le terme de l'effet quadratique du paramètre temps de l'extraction. Les équations des modèles corrigés s'écrivent comme suit :

$$R_{ES} = 23,9626 - 0,7624T - 0,1013t + 6,0917.10^{-3}T^2 + 2,3271.10^{-3}T.t \quad \text{(III.6)}$$

$$EAG = 66,7503 - 1,8092.T - 0,4016.t + 1,4358.10^{-2}.T^2 + 6,6979.10^{-3}T.t \quad \text{(III.7)}$$

$$IAA = 6,7894 - 0,1120.T - 0,0162.t + 8,3333.10^{-4}.T^2 + 2,6667.10^{-3}T.t \quad \text{(III.8)}$$

III.3.1. Analyse de la variance

L'évaluation statistique des modèles mathématiques a été effectuée par analyse de la variance (ANOVA) à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVI. Le Tableau III.5 suivant, regroupe les valeurs de la probabilité, ou p-value, pour chacun des effets, le coefficient de corrélation R^2 , l'erreur standard de l'estimation et l'erreur absolue moyenne.

Tableau III. 5 : Résultats de l'analyse de la variance

| Effet \ Réponse | RES | EAG | IAA |
|---------------------------------|---------|--------|--------|
| | P-Value | | |
| T° | 0,0016 | 0,0168 | 0,0025 |
| t | 0,0076 | 0,1192 | 0,0477 |
| T ² | 0,0403 | 0,2735 | 0,0185 |
| T.t | 0,0084 | 0,0660 | 0,0079 |
| R ² , % | 96,63 | 87,28 | 95,87 |
| Erreur standard de l'estimation | 1,15 | 6,40 | 0,13 |
| Erreur moyenne absolue | 0,67 | 3,70 | 0,07 |

Chacune de ces statistiques apporte des informations permettant la validation ou l'invalidation des modèles mathématiques élaborés:

- La valeur de la probabilité permet de vérifier la signification statistique de chaque effet en comparant le carré moyen à une estimation de l'erreur expérimentale,
- Le coefficient de corrélation R^2 indique la qualité de l'approximation du modèle,
- L'erreur standard de l'estimation est l'écart type des résidus,
- L'erreur moyenne absolue est la moyenne des valeurs résiduelles.

Dans les modèles du rendement en extrait sec, R_{ES} , et de l'indice d'activité anti-radicalaire, IAA, les 4 effets ont des valeurs de probabilité inférieures à 0,05, ce qui indique qu'ils sont significativement différents de zéro au niveau de confiance de 95,0 %. Par ailleurs, ces deux modèles décrivent correctement les variations du R_{ES} et IAA,

puisque leurs coefficients de corrélation R^2 sont très élevés, respectivement 96,63% et 95,87%.

Par contre, dans le cas du modèle de la teneur en composés phénoliques, trois des quatre effets ont des valeurs de probabilité supérieures à 0,05 et ne sont significatifs pour un intervalle de confiance de 95%. En diminuant le niveau de confiance de 95,0 % à 72,0%, les 4 effets deviennent significativement différents de zéro. Ceci suppose qu'en réalisant des essais répétitifs, 28% des résultats obtenus seront erronés. D'autre part, on observe que le modèle établi dans ce cas est le moins précis, car son coefficient de corrélation R^2 n'est que de 87,28%. Ceci pourrait être attribué à l'erreur élevée, mais acceptable pour une microanalyse, et au fait que la méthode de Folin-Denis est très sensible au pH de l'échantillon à analyser. Or, les mesures du pH des extraits, ont montré une variation entre 6,09 pour le niveau supérieur de la température et du temps (essai 3), 7,11 pour le niveau inférieur de ces deux paramètres (essai 1) et de 7,17 pour le niveau de base (essai 5). Cette variation du pH pourrait être à l'origine de la relative imprécision de la détermination de la teneur en composés phénoliques par la méthode de Folin-Denis.

Les diagrammes de Pareto, basés sur l'analyse de la variance, traduisent, dans un ordre décroissant, les effets standardisés individuels, conjugués et quadratiques affectant les critères d'optimisation étudiés. Ils sont représentés par les Figures III.2., III.3 et III.4 respectivement.

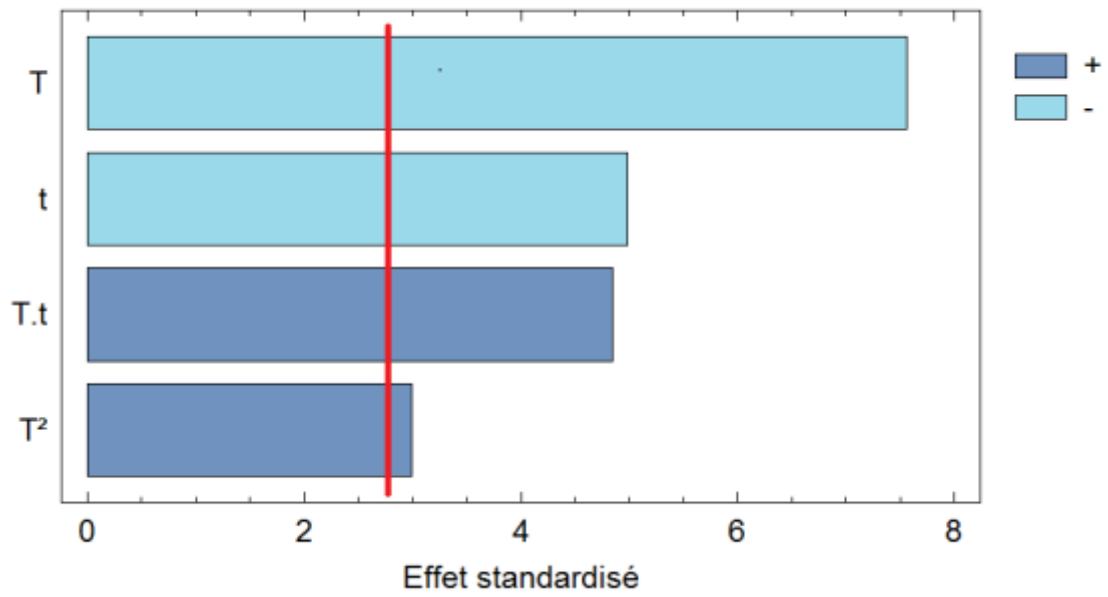


Figure III. 2 : Diagramme de Pareto pour le rendement en extrait sec ($\alpha=0,05$)

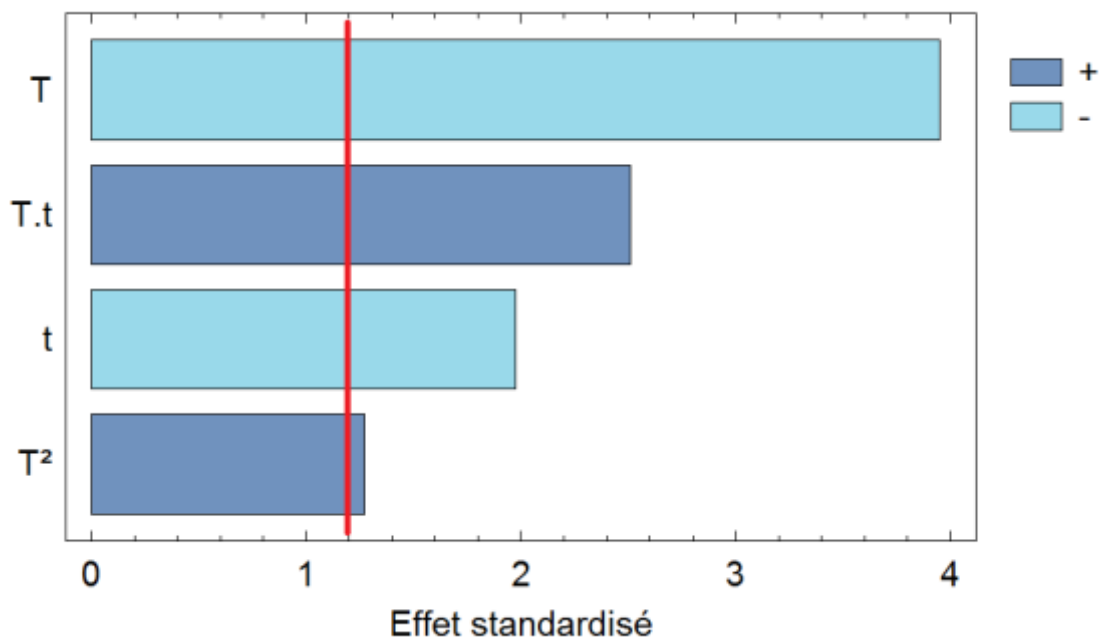


Figure III. 3 : Diagramme de Pareto pour la teneur en composés phénoliques ($\alpha=0,28$)

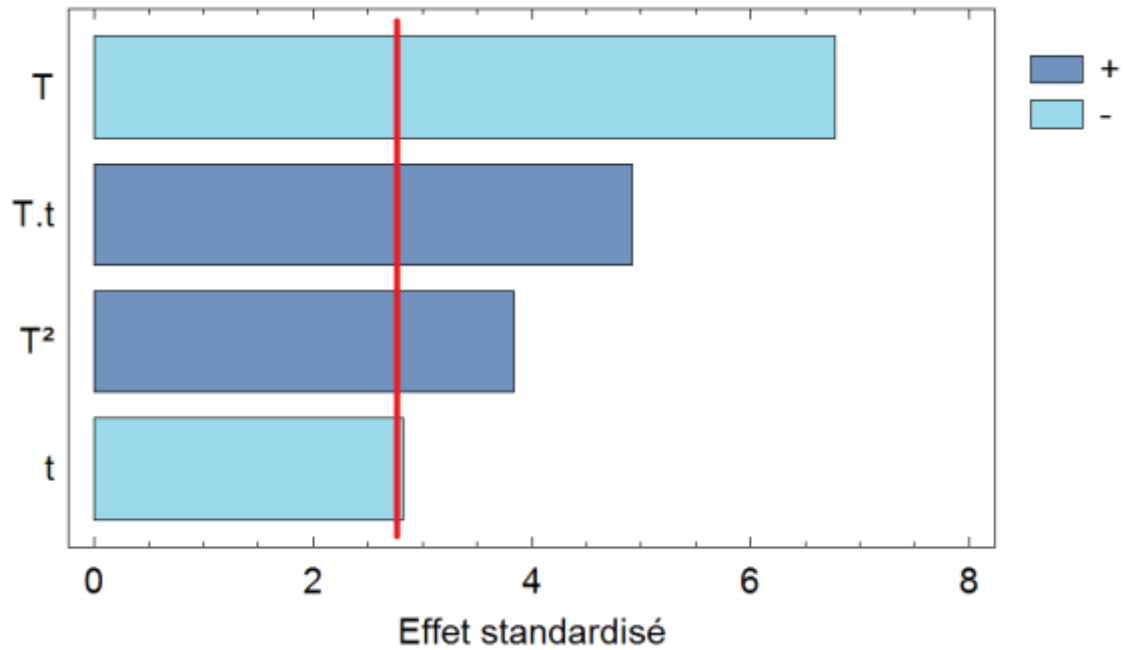


Figure III. 4 : Diagramme de Pareto pour l'indice d'activité anti-radicalaire ($\alpha=0,05$)

Au seuil de confiance indiqué, chaque modèle comporte quatre termes, parmi lesquels, l'effet individuel de la température est le plus important.

III.3.2. Surfaces de réponse

Les Figures III.5, III.6 et III.7 présentent les surfaces de réponse des trois critères d'optimisation étudiés.

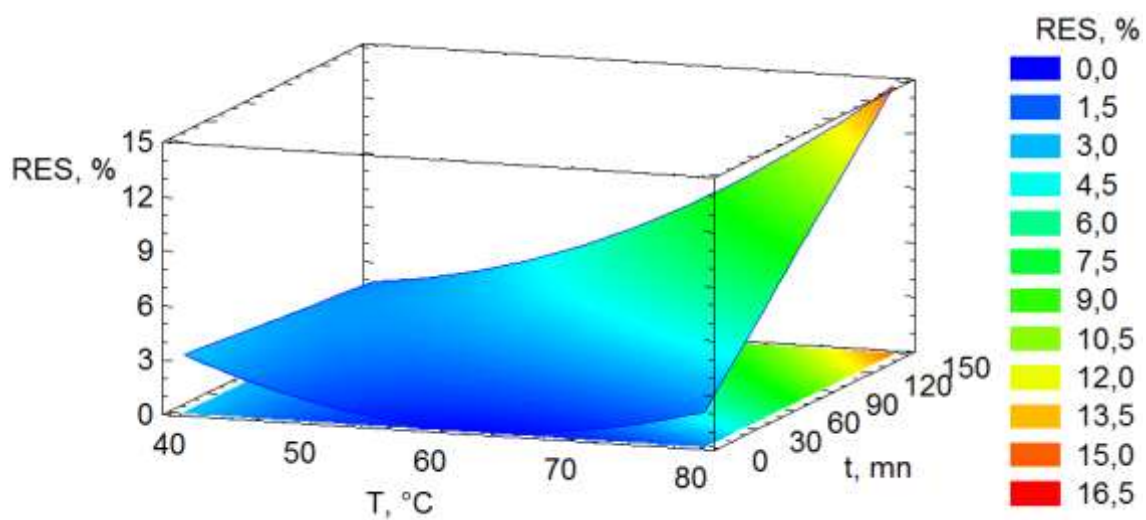


Figure III. 5 : Surface réponse pour le rendement en extrait sec (RES)

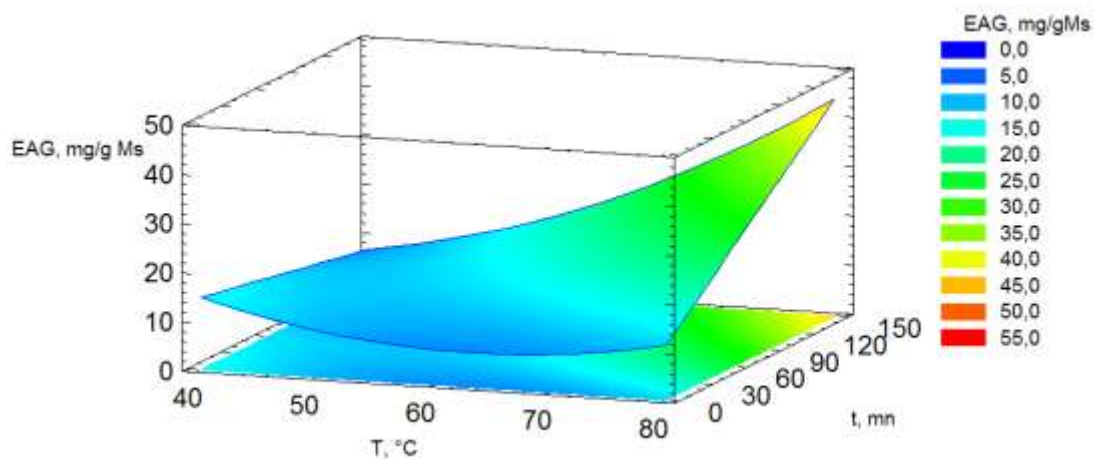


Figure III. 6 : Surface de réponse pour la teneur en composés phénoliques (EAG)

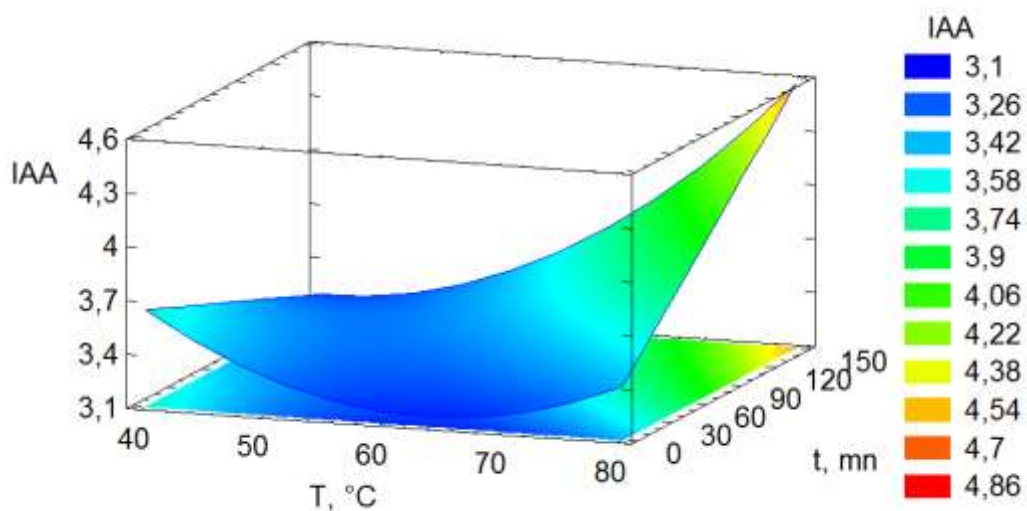


Figure III. 7 : Surface de réponse pour l'indice d'activité anti-radicalaire (IAA)

L'examen des figures ci-dessus montre que les surfaces de réponse des trois critères d'optimisation ont la même allure, caractérisée par une variation relativement faible de chaque réponse entre le niveau inférieur et de base de la température et de la durée d'extraction, suivie d'une forte ascension vers le niveau supérieur des deux paramètres.

III.4. Optimisation

Les surfaces de réponse montrent que les valeurs maximales de chaque critère d'optimisation tendent vers le sommet du domaine d'étude, correspondant au niveau supérieur des deux paramètres, de coordonnées 80°C, 150 min. Ces conditions opératoires ont été indiquées aussi comme optimales par le logiciel Statgraphics Centurion XVI.

Conclusion

Cette étude a porté sur l'optimisation de l'extraction des antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L., provenant d'un lot cultivé à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. Les essais d'extraction solide-liquide ont été effectués en charge dispersée, à l'échelle laboratoire.

L'optimisation des principaux paramètres du procédé, en l'occurrence, la température et la durée de l'extraction, a été menée par planification des expériences, en adoptant un plan factoriel à trois niveaux des deux paramètres, 3^2 , les critères d'optimisation étant le rendement en extrait sec, la teneur en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant des extraits.

Les essais programmés par le plan factoriel ont été réalisés, en utilisant des échantillons représentatifs d'un même lot de matière végétale. Des modèles du second ordre, donnant l'évolution de chaque critère d'optimisation, en fonction des deux paramètres étudiés, ont été établis.

L'analyse statistique de ces modèles, menée à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVI, a montré qu'ils décrivent correctement le comportement du système étudié et ont permis la détermination des valeurs optimales de la température et de la durée de l'extraction, dans le domaine d'étude, comme suit:

- ▲ Température de l'extraction : 80 ° C
- ▲ Durée de l'extraction : 150 min.

Les surfaces de réponse, correspondant à chacun des critères d'optimisation ont des allures identiques. La teneur en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant des extraits étant maximales au niveau supérieur de la température, permet de conclure que les antioxydants hydrosolubles du *Rosmarinus officinalis* L. ne seraient pas thermo dégradables.

Cette étude, loin d'être achevée, a permis, néanmoins, d'optimiser le procédé d'extraction solide-liquide, de mettre en évidence la présence des antioxydants dans les extraits aqueux du *Rosmarinus officinalis* L., d'évaluer leur potentiel antioxydant et d'envisager leur éventuelle récupération.

L'étude des antioxydants dans le *Rosmarinus officinalis* L. est une perspective pour la découverte des nouvelles substances naturelles dans les plantes algériennes ayant un pouvoir antioxydant important, afin d'enrichir une variété des antioxydants naturels pour:

- Substituer les antioxydants synthétiques qui ont des effets indésirables contre l'organisme.
- Trouver des remèdes aux maladies causées par le stress oxydatif.

Cette étude ouvre la voie de futures recherches, aussi bien dans le domaine des sciences appliquées que fondamentales, en vue de la valorisation du *Rosmarinus officinalis* L.

Références bibliographiques

- **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, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.
- **Alaux S. (2005)** Fiche technique de l'huile essentielle biologique du romarin à cinéole, *Rosmarinus officinalis* L., Laboratoire Florame aromathérapie.
- **Alaux S. (2005)** Fiche technique de l'huile essentielle biologique du romarin à verbénone, *Rosmarinus officinalis* L., Laboratoire Florame aromathérapie.
- **Alaux S. (2006)** Fiche technique de l'huile essentielle biologique du romarin à camphre, *Rosmarinus officinalis* L., Laboratoire Florame aromathérapie.
- **Ali S.S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahu A., Bora U. (2008)** Indian medicinal herbs as sources of antioxidants, *Food Res Int*, 41: 1–15.
- **Arab S., Beddar B. (2011)** Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.: extraction, composition chimique, propriétés physiques et antimicrobiennes, *Projet de Fin d'Etudes*, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.
- **Arora A., Sairam R., Srivastava G. (2002)** Oxidative stress and antioxidative system in plants, *Current Science*, 82: 1227-1238.
- **Aruoma O. I. (1998)** Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 199–212.
- **Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R., Loligers J. (1992)** Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosmariny constituents: carnosol and carnosic acid, *Xenobiotica*, Vol. 22, p.p. 257-268.
- **Aurousseau B. (2002)** Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits, *INRA Prod. Anim.*, 15 (1): 67-82.
- **Beauquesne B., Pinkas L., Tork M. (1980)** Plantes médicinales des régions tempérées, Ed. Masson.
- **Belkhiri F. (2009)** Activité antimicrobienne et anti-oxydante des extraits du *Tymus communis* L. et *Carthamus caeruleus* L., Mémoire de Magister, Université de SETIF, p.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*, 49: 161 - 166.
- **Benzie I. F. F., Strain, J. J. (1996)** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- **Blois M.S. (1958)** Determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- **Bloor S. J. (2001)** *Method. Enzymol*, 335: 3-14.
- **Bolton J. L., Trush M. A., Penning T. M., Dryhurst G., & Monks T. J. (2000)** Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol*, 13: 135.
- **Boukhalfa K. (1995)** Apport des couplages CPG/MS et CPG/IR dans l'analyse des mélanges naturels complexes, exemple l'huile essentielle de romarin, Thèse d'Ingénieur d'Etat, USTHB, Alger.
- **Bounoua D., Boumahdi L. (2013)** Hydrodistillation de *Salvia Officinalis* L. et de *Rosmarinus Officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation, Projet de Fin d'Etudes, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.
- **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, Alger.
- **Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food. Sci. Technol*, 28: 25–30.
- **Bruneton J. (1992)** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 2^{ème} édition, Ed. Lavoisier, Tech. & Doc, Paris.
- **Bruneton J. (1999)** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3^{ème} édition, Ed. Lavoisier, Tech. & Doc, Paris, p. 488.
- **Camino A.Y. (1971)** *Le romarin*, Ed. Ion, Madrid.
- **Cao G.H., Alessio H.M., Cutler R.G. (1993)** Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for antioxidants, *Free Radical Biol Med*, 14: 303-311.
- **Charfi D. (1995)** Effet des eaux usées traitées sur les caractéristiques physico-chimiques du sol et sur la physiologie de quelques espèces végétales cultivées au périmètre d'ElHajeb (Sfax), Thèse en écologie végétale, Fac. Sci. de Sfax.

- **Chen Q., Shi H., Ho C-T. (1992)** Effects of rosmariny extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 69: 999-1002.
- **Cillard J., Cillard P. Cormier M. (1980)** Effect of Experimental Factors on the Prooxidant Behavior of oc-Tocopherol, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 57: 255-261.
- **Culevier M-E., Richard H., Berset C. (1996)** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 73: 645-652.
- **Dacosta Y. (2003)** Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques, Ed. Yves Dacosta, Paris, p. 317.
- **Dagnelle J.P. (1981)** Principe d'expérimentation, Ed. Presses agronomiques de Gembloux, Belgique.
- **Deans et al. (1998)** Chemical composition, antibactériel, and antioxidantive activity of laurel, sage, rosmariny, oregano and coriander essential oils, *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 10, p. 618.
- **Dorman, H.J.D., Bachmayer, O., Kosar, M. & Hiltunen, R. (2004)** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey, *J Agric Food Chem*, 52: 762-770.
- **Dragland S., Sanoo H., Wake K., Holte K., Blomhoff R. (2003)** culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *J Nutr.* 133: 1286-1290.
- **Droesbeke J-J., Fine J., Sapotra G. (1997)** Plans d'expériences, applications à l'entreprise, Ed. TECHNIP, Paris.
- **Ducerf G. (2007)** L'encyclopédie des plantes bio-indicatrices, alimentaires et médicinales, Guides de diagnostic des sols, Vol. 2, Ed. Promonature, Fiche n° 454 « Romarin », p. 251.
- **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.
- **European Food Safety Authority (2008)** Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission on the use of rosemary extracts as a food additive, *The EFSA Journal*, 72: 4.

- **Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I.P., Troganis A., Boskou D. (2002)** Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory, *J Agric Food Chem*, 50: 5294-5299.

- **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. 108-117.

- **Gauche E., Hausswirth C. (2006)** Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice, *Science & Motricité*, 58 : 43-66.

- **Georgetti S.R., Casagrand R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana, E.C.S., Fonseca Maria J.V. (2003)** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the Chemiluminescence Method, *AAPS Pharm Sci*, 5 (2) : 1-5.

- **Gilly G. (2005)** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à Grasse : botanique, culture, chimie, production et marché, Ed. l'Harmattan, Paris, p. 418.

- **Goupy J., Creighton L. (2009)** Introduction aux plans d'expériences avec applications, 4^{ème} Edition, Ed, Dunod, Paris.

- **Gueorguiev E. (1995)** Technologie des produits aromatiques naturels et synthétiques, Ed. Zemizdat, Sofia.

- **Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R., Bernigault R. (2005)** Mesure de la résistance aux radicaux libres, Sixième Journée de la Recherche Avicole, p.p. 554-558.

- **Haddou F., Hammouche I. (2012)** «Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation», Projet de Fin d'Etudes, Département de Génie Chimique, ENP, Alger.

- **Halvorsen B.L., Carlsen M.H., Phillips K.M. (2006)** Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in United States, *Am J Clin Nutr* 84: 95-135.

- **Haraguchi et al. (1995)** Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis* L., *Planta Med.*, p. 333.
- **Herodez S. S., Hadolinb M., Skergeta M., Zeljko Knez (2003)** Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *Food Chemistry*, 80: 275 – 282.
- **Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005)** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856.
- **Jha P., Flather M., Lonn E., Farkouh M., Yusuf S. (1995)** The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data, *Ann. Intern Med.*, 123(11): 860-872.
- **Jiao Z., Liu J., Wang S. (2005)** Antioxidant Activities of Blackberry Pigment Extract. *Food Technology and Biotechnology*, Zhengzhou, 1(43): 97-102.
- **Julien et Gavend G. (1980)** Le cuir origine et fabrication, Ed. Centre technique de cuir.
- **Leung A.Y., Foster S. (1996)** Encyclopedia of common naturel ingredients used in foods, drugs, and cosmetics, 2^{ème} édition, Awrley inter-science publication, p. 445.
- **Leybroos J. et Fremeaux P. (1990)** Extraction solide-liquide. Technique de l'ingénieur. Paris.
- **Li C., Oldham C.D., May S.W.N. (1994)** N-Dimethyl-1,4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine. Alpha-amidating mono-oxygenase catalysis, *Biochem. J.*, 300: 31-36.
- **Li C.Y., Jackson R.M. (2002)** Reactive species mechanisms of cellular hypoxiareoxygenation injury, *Am. J. Physiol.-Cell Physiol*, 282: C227–C241.
- **Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P. (2004)** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments, *Médecines Sciences*, 20 : 458-464.
- **Mateus E.M, Lopes C., Nogueira T. (2006)** Pilot steam distillation of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal, *Silva Lusitana*, Portugal, 14(2): 203 – 217.

- **Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S. (2004)** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species, *Phytochemistry Reviews*, 3: 173-193.
- **Milane H. (2004)** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques, Thèse de doctorat en Sciences : Pharmacochimie, Université Louis Pasteur, Strasbourg I.
- **Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V., Milner A. (1993)** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin Sci*, 84: 407–412.
- **Miller N-J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. (1996)** Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384: 240-242.
- **Molyneux P. (2004)** The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26 (2): 211-219.
- **Mortensen A., Skibsted L.H., Truscott T.G. (2001)** The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Arch. Biochem. Biophys*, 385 (1): 13–19.
- **Naktani N., Inatani R. (1984)** Antioxidative diterpenes from rosmary, *Agric Biol Chem.*, p. 2081.
- **Naktani N., Inatani R., Fuwa H.H., Seta H. (1983)** Structure of a new antioxidants phenolic diterpens isolated from rosmary (*Rosmarinus officinalis* L.), *Agric Biol Chem.*, p. 1661.
- **Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y. (1996)** Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Free Radic Biol Md*, 21(6): 895-902.
- **National Cancer Institute Bioassay of Butylated Hydroxitoluene (BHT) for possible carcinogenicity (1979)** National Institute of Health Publications NIH, p.p. 79-1706.
- **Novelli G. P. (1997)** Role of free radicals in septic shock, *J. Physiol. Pharmacol.*, 48: 517-527.
- **Paris et al. (1993)** Effect of carnosolic acid products, Vol. 56, N°8, p. 1426.
- **Paume M-C., (2008)** Sauvages et médicinales plante remèdes pour nos petits maux, Ed. Édisud, Romarin, p. 212.

- **Pelli K., Lyly M. (2003)** Les antioxydants dans l'alimentation: Les antioxydants naturels et synthétiques dans les aliments, p 9.
- **Piozzi F. (1994)** J. Photochemistry, Vol. 3, p. 125.
- **Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Überegger E., Conte L.S. (2002)** Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content, J Sci Food Agric 82: 1645-1651.
- **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2000)** Antioxidant in food: practical applications. Ed. Woodhead, , p.p. 17, 43-44, 388.
- **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001)** Antioxidant in food: practical applications. Ed. Woodhead, p.p. 17, 43-44.
- **Popov I., Lewin G., Baehr R. (1987)** Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase, Biomed Biochim Acta, 46: 775–779.
- **Quezel P., Santa S. (1963)** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 1 et 2, CNRS, Paris, p. 1170.
- **Rahman, I. (2002)** Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic target, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 1(3): 291-315.
- **Rameau J.C et al. (2008)** Flore forestière française: Région méditerranéenne, Ed. Institut pour le développement forestier / Ministère de l'agriculture et de la pêche.
- **Raskin (2003)** Chémotype ou race chimique, Ed. du Laboratoire Orau Honnelles, Belgique, 10 : 618 – 627.
- **Ribeiro M.A., Bernardo-Gil M.G., Esquivel M.M. (2001)** *Melissa officinalis* L.: study of antioxidant activity in supercritical residues, Journal of Supercritical Fluids, 21: 51 – 60.
- **Richheimer S., Bernart M., King G., Kent M., Bailey D. (1996)** Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary, J. Amer. Oil Chem. Soc., 73: 507-514.

- **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.
- **Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell, G.P., Rice-Evans C.A. (1995)** Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, Archives of Biochemistry and Biophysics, p.p. 339-346.
- **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 Jose A., Saura-Calixto F. (1998a)** A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, Journal of the Science of Food and Agriculture, 76(2): 270-276.
- **Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F. (1998b)** New parameter for evaluation of free radical scavenging capacity of polyphenols, 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ESCOC-2).
- **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: 654-658.
- **Schwarz K., Ternes W. (1992)** Isolation and formation of other phenolic diterpens, Vol. 195, P 99.
- **Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005)** Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents, J Agric Food Chem, 53: 7749 -7759.
- **Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., Hagen T.M. (2004)** Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress, Curr. Med. Chem, 11(9): 1135– 1146.
- **Smith, M.A., Perry G., Richey P.L., Sayre L.M., Anderson V.E., Beal M.F., Kowall N. (1996)** Oxidative damage in Alzheimer's, Nature, 382: 120-121.

- **STATGRAPHICS@CENTURION XVI, (2013)** User manual, Ed. Stat Point Technologies Inc.
- **Tamer Fouad M.D. (2003)** Free radicals, types, sources and damaging reactions, Internal Medicine Articles. (<http://www.doctorslounge.com/primary/articles/>)
- **Teuscher, Anton R., Lobstein A. (2005)** Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Ed. Lavoisier, Paris, p. 522.
- **Trambouze P., Wauquier J.P. (1975)** Le développement des procédés de raffinage et pétrochimie. Ed TECHNIP, Paris, p. 242.
- **Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. (2004)** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, Mol. Cell. Biochem, 266: 37–56.
- **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006)** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, Chem. Biol Interact, 160: 1–40.
- **Van Antwerpen P. (2006)** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique: Ciblage du système myeloperoxydase / peroxyde d'hydrogène /chlorure, Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques, Académie universitaire Wallonie-Bruxelles.
- **Vareltzis K., Koufidis D., Gavriilidou E., Papavergou E., Vasiliadou S. (1997)** Effectiveness of a natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage, Z Lebensm Unters Forsch A, Vol. 205, p.p. 93 – 96.
- **Villano D., Fernández-Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. (2007)** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, Talanta, 71(1):230–235.
- **Walker J.E.M., Saraste M.J., Runswick, Gay N.J. (1982)** Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold, Embo J, 1 (8): 945-51.
- **Wang, J.W., Hashimoto K., Shibamoto T. (1995)** Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in model meat system, J agric food chim 43: 2707-2712.

- **Wayner D. D. M., Burton G. W., Ingold K. U., Locke S. (1985)** Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 187: 33-37.
- **Winston G.W., Regoli F., Dugas A. J., Fong J. H., Blanchard K. A. (1998)** A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, *Free Radical Biol. Med*, 24: 480–484.
- **Witschi H. (1981)** Enhancement of tumor formation in mouse lung by dietary butylated hydroxytoluene. *Toxicology*, 21: 95-101.
- **Zheng, W. & Wang, S.Y. (2001)** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J Agric Food Chem* 49: 5165-5170.

Webographie

- **Site web [1]** : <http://www.afleurdepau.com/Flore/lamiaceae/f.htm> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [2]** : <http://www.mi-aime-a-ou.com/Lamiaceae.php> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [3]** : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Romarin> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [4]** : <http://www.01sante.com/contenu/page/romarin-655> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [5]**: <http://www.abcdelanature.com/huiles-essentielles-qz.html> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [6]**: http://www.aroma-zen.com/gemmotherapie_maceratemere-glycerine-unitaire_romarin-rosmarinus-officinalis-herbalgem-p-815.html (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [7]**: <http://www.supertoinette.com/fiche-cuisine/124/romarin.html> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [8]**: <http://www.mesantenaturelle.com/chroniques/herbier/romarin.php> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [9]**: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Antioxydant> (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [10]**: http://fr.wikipedia.org/wiki/Appareil_de_Dean_Stark. (consulté le 28.05.2014)
- **Site web [11]**:
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 28.05.2014)