

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Ecole Nationale Polytechnique**



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
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**

Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation

**Proposé et dirigé par :**

**Pr. S. CHARCHARI**

**Etudié par :**

**M<sup>lle</sup> Fatiha HADDOU**

**M<sup>lle</sup> Ibtissam HAMMOUCHE**

Soutenu le 25 Juin 2012 devant le jury composé de :

**M. T. AHMED ZAID**

**Mme R. DERRICHE**

**Mme F. KIES**

**Mme S. CHARCHARI**

**Professeur à l'ENP**

**Professeur à l'ENP**

**Docteur à l'ENP**

**Professeur à l'ENP**

**Président**

**Examinatrice**

**Examinatrice**

**Rapporteur**

**Promotion : Juin 2012**

*« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage »  
Sadra Boudjema – Ordre du grand val*

*Au nom de DIEU, le Clément Le Miséricordieux, Le TOUT PUISSANT.  
Louanges à ALLAH Seigneur des mondes, qui nous a permis de réaliser cet humble  
travail, ainsi que ses innombrables bienfaits.*

*Si vous comptez les bienfaits de DIEU, vous ne saurez les dénombrer.  
DIEU est en vérité Clément et Compatissant.*

*Coran : S. 16. v 18*

*Considère tout ce qui t'arrive comme un mérite ou un bienfait venant de DIEU.  
Car, Seul DIEU connaît la vérité et sait ce qu'il te faut quand il le veut.  
Que sa Grâce soit sur nous !*

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

Incarnant le florilège des valeurs humaines à nos yeux, Mme S. CHARCHARI, vous avez été pour nous plus qu'un encadreur, un maître, sans qui notre soif de savoir n'aurait jamais pu être assouvie, vous avez su et pu faire de notre travail l'une de nos expériences les plus enrichissantes, veuillez trouver ici l'expression de nos sentiments de respects, les meilleurs.

Nous tenons à remercier Monsieur T.AHMED ZAID, Professeur à l'ENP de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

Pour avoir accepté de faire partie du jury de soutenance, Madame R. DERRICHE, Professeur à l'ENP et Madame F. KIES, Docteur à l'ENP, veuillez trouver ici le témoignage de nos remerciements les plus distingués.

Que tous les enseignants du Département Génie chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique trouvent ici l'expression de nos sincères gratitude pour les efforts qu'ils n'ont cessé de prodiguer pour notre bonne formation.

Nous tenons à témoigner notre reconnaissance à Monsieur A. NEHITI, technicien au Département de Génie chimique de l'ENP.

La documentation qui nous a été fournie par Mr. S. KHMISSI nous a particulièrement aidés. Qu'il en soit vivement remercié.

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

# *Dédicaces*

*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 très chères et adorables tantes*

*Pour vos conseils et votre soutien sans faille depuis ma naissance.*

*Que Dieu vous garde toujours auprès de moi.*

*A mes merveilleux et très chers deux frères*

*En leurs espérant plein de succès dans leur vie.*

*A mes grands-parents que j'aime tendrement*

*Que Dieu les protège et les prête bonnes santés et longue vie.*

*A toute mes tantes, et tous mes oncles*

*En témoignage de mon amour et mon profond respect.*

*A mes cousines et cousins*

*En leurs souhaitant plein de bonheur et de réussites*

*A ma grande famille*

*La source de ma fierté.*

*A mon adorable encadreur Mme Charchari*

*A tout mes enseignants*

*A mon binôme Ibtissam*

*A tout mes ami(e)s et collègues*

*Enfin à tous ceux qui me sont très chers.*

*Affectueusement, Fatiha*

# *Dédicaces*

*A ma mère*

*Où que tu sois, tu garderas une grande place dans ma mémoire et  
dans mon cœur que la terre te soit légère.*

*A mon père et ma belle mère, pour leurs amours, leurs soutiens et  
leurs sacrifices, que dieu les préserve.*

*A mes deux chers frères et mon adorable sœur : Bahae Eddine,  
Aymen et Ibtihel*

*A tous mes tantes et mes oncles*

*A tous mes cousins et mes cousines surtout Alae*

*A mon cher binôme Fatiha*

*A tous mes amis et collègues*

*A tous ceux qui me sont chers ;*

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

***Ibtissam***

## *P*réambule

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

## استخراج الزيوت الأساسية لنبته إكليل الجبل روزمارينوس اوفيسيناليس و تعزيز مياه التقطير

### ملخص

يتضمن هذا العمل استخراج الزيوت الأساسية لنبته إكليل الجبل ، تطرقنا اولاً الى دراسة تأثير عملية استخراج الزيت ، فترة قطف النبتة ، مدة ودرجة حرارة تخزينها و علاجها بمواد فعالة ، على مردود الزيت. الكشف عن وجود مركبات الفينول في مياه التقطير التي تم الحصول عليها خلال تقطير ببخار الماء، معايرة هذه المواد بطريقة فولين دينيس وتقييم القدرة المضادة للأكسدة من خلال محاصرة الجذور الحرة مكن من تعزيز هذا المنتج الثانوي لعملية استخراج الزيوت الأساسية.

**الكلمات الافتتاحية:** الزيوت الأساسية، نبتة إكليل الجبل، التقطير ببخار الماء، المادة الفعالة، القدرة المضادة للأكسدة.

## Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. et valorisation des eaux de distillation

### Résumé

Ce travail porte sur l'extraction d'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. L'influence, sur le rendement en huile, du procédé d'extraction, de la période de la récolte, de la durée et la température du stockage de la plante et de son prétraitement avec tensioactif, a été étudiée.

La mise en évidence de la présence des composés phénoliques dans les eaux de distillation obtenues lors de l'hydrodistillation, leur dosage par la méthode de Folin-Denis et l'évaluation de leur pouvoir antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, ont permis d'envisager une valorisation de ce sous produit issu de l'extraction de l'huile essentielle.

**Mots clés :** huile essentielle, *Rosmarinus officinalis* L., Hydrodistillation, tensioactif, activité antioxydante.

## Extraction of essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. and valorization of distillation water

**Abstract:** This work focuses on the extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L.

The influence on the oil yield, of the extraction process, the collect period, the duration and the temperature of the plant material storage, and the plant treatment with surfactant was studied. The presence of phenolic compounds highlighted in the water distillation of the hydrodistillation process, their dosage using the Folin-Denis method and the evaluation of their antioxidant capacity by the trapping method of free radical DPPH, have allowed to consider a valorization of the by-product of the essential oil extraction.

**Keywords:** essential oils, *Rosmarinus officinalis* L., hydrodistillation, surfactant, antioxidant, DPPH free radical, antioxidant activity.

## Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Etude bibliographique</b>	
<b>I.1. Les huiles essentielles.....</b>	<b>3</b>
I.1.1. Historique .....	3
I.1.2. Définition .....	3
I.1.3. Répartition et localisation des huiles essentielles .....	4
I.1.3.1. Répartition .....	4
I.1.3.2. Localisation.....	5
I.1.4. Composition chimique des huiles essentielles .....	5
I.1.5. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles .....	6
I.1.6. Activités biologiques des huiles essentielles.....	7
I.1.7. Facteurs de variation de la composition chimique des huiles essentielles .....	7
I.1.7.1. Facteurs d'ordre naturel .....	8
I.1.7.2. Facteurs d'ordre technologique .....	9
I.1.8. Domaine d'utilisation des huiles essentielles.....	10
I.1.9. Stockage et conservation des huiles essentielles.....	11
<b>I. 2. La matière végétale: <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....</b>	<b>12</b>
I.2.1. Historique .....	12
I.2.2. Taxonomie.....	12
I.2.3. Description botanique .....	13
I.2.4. Répartition géographique .....	14
I.2.5. Structure sécrétrice du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	14
I.2.6. Composition chimique du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	17
I.2.7. Chémotypes du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	18

<b>I.3. Procédés d'extraction .....</b>	<b>21</b>
I.3.1. Hydrodistillation .....	21
I.3.2. Entraînement à la vapeur d'eau .....	21
I.3.3. Mécanisme de l'extraction des huiles essentielles .....	22
I.4.1. Les tensioactifs .....	25
I.4.2. Les tensioactifs et les membranes végétales .....	27
I.4.2.1. Structure et constitution de la cuticule végétale .....	27
I.4.2.2. Action des tensioactifs sur la cuticule .....	29
<b>I.5. Les antioxydants .....</b>	<b>32</b>
I.5.1. Définition d'un radical libre .....	32
I.5.2. Définition d'un antioxydant .....	32
I.5.3. Application des antioxydants .....	33
I.5.4. Classification des antioxydants .....	33
I.5.4.1. Les antioxydants naturels .....	33
I.5.4.2. Les antioxydants synthétiques .....	35
I.5.5. Le mécanisme d'action des antioxydants .....	36
I.5.6. Les antioxydants du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	36
I.5.7. Détermination de l'activité antioxydante .....	38
I.5.7.1. Principe de la réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant .....	38
I.5.7.2. Evaluation du potentiel anti-radicalaire .....	40

## **Chapitre II: Matériels et méthodes**

<b>II.1. Matière végétale utilisée .....</b>	<b>42</b>
II.1.1. Echantillonnage .....	42
II.1.2. Détermination du taux d'humidité .....	42
<b>II.2. Dispositifs expérimentaux d'extraction.....</b>	<b>44</b>
II.2.1. L'installation et protocole expérimental de l'entraînement à la vapeur d'eau .....	44
II.2.2. Dispositif et protocole expérimental de l'hydrodistillation .....	47



II.2.3. Réactifs utilisés .....	50
<b>II.3. Méthodes d'analyse.....</b>	<b>51</b>
II.3.1. Dosage des composés phénoliques des eaux de distillation par la méthode de Folin-Denis .....	51
II.3.1.1. Mode opératoire .....	51
II.3.1.2. Masse des antioxydants dans les eaux de distillation lors de l'hydrodistillation de 100 grammes de plante sèche.....	51
II.3.1.3. Teneur en antioxydants dans l'extrait sec .....	52
II.3.2. Détermination du pourcentage d'inhibition.....	52
II.3.3. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux(IC <sub>50</sub> ).....	53
II.3.3.1. IC <sub>50</sub> exprimée en µg d'antioxydant par mL de solution.....	53
II.3.3.2. IC <sub>50</sub> exprimée en milligrammes d'extrait par gramme de DPPH.....	53

### **Chapitre III: Résultats et discussions**

<b>III.1. Extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....</b>	<b>54</b>
III.1.1. Comparaison des rendements en huiles essentielles obtenus par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation.....	54
III.1.2. Influence de la période de la récolte sur le rendement en huile essentielle.....	55
III.1.3. Influence du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur le rendement en huile essentielle, obtenue par entraînement à la vapeur et par hydrodistillation.....	55
III.1.4. Influence de la durée et la température de stockage de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle .....	57
<b>III.2. Valorisation des eaux de distillation lors de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. par hydrodistillation .....</b>	<b>60</b>
III.2.1. Dosage des composés phénoliques dans les eaux de distillation .....	60
III.2.1.1 Courbe d'étalonnage .....	60
III.2.1.2. Influence de la durée et de la température du stockage de la matière végétale sur la concentration des antioxydants présents dans les eaux de distillation .....	61
III.2.1.3. Influence du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur la concentration des antioxydants présents dans les eaux de distillation.....	63

II.2.2. Evaluation de l'activité antioxydante .....	64
III.2.2.1. Détermination du pourcentage d'inhibition .....	65
III.2.2.2. Détermination de la concentration IC <sub>50</sub> , µg/mL .....	66
III.2.2.3 Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC <sub>50</sub> ), exprimée en milligrammes d'extrait par gramme de DPPH.....	71
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>55</b>
<b>Webographie .....</b>	<b>89</b>

## Liste des figures

<b>Figure I. 1 :</b> Le romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	13
<b>Figure I. 2 :</b> Micrographie lumineuse des trichomes non glandulaires de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Marin, Koko, Duletic- Lausevic, 2006) .....	15
<b>Figure I. 3 :</b> Trichomes peltés de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Gr : 100 x 3.2) (Boutekedjiret, 1999) .....	16
<b>Figure I. 4 :</b> Micrographie lumineuse des trichomes glandulaires de la feuille de.....	17
<b>Figure I. 5 :</b> Schéma simplifié d'une molécule de tensioactif (Stolzenberg, 1989) ....	26
<b>Figure I. 6 :</b> Structure de la cuticule foliaire (Stevens, Baker, 1987) .....	27
<b>Figure I. 7 :</b> Structure de la membrane cellulaire (Reverts, 2006) .....	28
<b>Figure I. 8 :</b> Interactions séquentielles tensioactif-bicouche lipidique observées par microscopie électronique (Tamura et al., 2002) .....	30
<b>Figure I. 9 :</b> tensioactif – bicouche lipidique et formation des micelles.....	31
<b>Figure I. 10 :</b> Antioxydants de synthèse (Pokorny et al., 2001) .....	35
<b>Figure I. 11 :</b> Structures de l'acide rosmarinique, acide carnosique et le carnosol (Cuvelier et al., 1996 ; Penchev, 2010) .....	37
<b>Figure I. 12 :</b> Structure chimique du radical libre DPPH <sup>*</sup> (2,2 DiPhenyl-1-Pikryl-Hydrazyle).....	39
<b>Figure II. 1 :</b> Appareil de Dean et Stark .....	43
<b>Figure II. 2 :</b> Schéma de l'installation d'extraction de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. par entraînement à la vapeur d'eau.....	45
<b>Figure II. 3 :</b> Ruban chauffant .....	46
<b>Figure II. 4 :</b> Dispositif expérimental d'hydrodistillation à l'échelle laboratoire .....	48
<b>Figure III. 1 :</b> Hydrodistillation du romarin fleuri. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée et la température du stockage .....	57
<b>Figure III. 2 :</b> Hydrodistillation du romarin en post-floraison. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée et la température du stockage (température ambiante moyenne 18°C) .....	57
<b>Figure III. 3 :</b> Hydrodistillation du romarin en croissance. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée et la température du stockage (température ambiante moyenne 23°C).....	58

<b>Figure III. 4 :</b> Diminution du taux d'humidité et augmentation des rendements en huile essentielle, en %, obtenus par hydrodistillation des échantillons de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. récoltés à différentes périodes de végétation, .....	58
<b>Figure III. 5 :</b> Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique.....	61
<b>Figure III. 6 :</b> Influence de la durée du stockage à 23°C et le taux d'humidité H de la plante sur la masse $M_{AO}$ d'antioxydants dans les eaux de distillation recueillies lors de l'hydrodistillation de 100 g de matière sèche .....	62
<b>Figure III. 7 :</b> Evolution de l'absorbance A et du pourcentage d'inhibition I du DPPH, en fonction de la concentration en extrait sec des échantillons .....	67
<b>Figure III. 8 :</b> Cinétique de réduction du DPPH.....	68
<b>Figure III. 9 :</b> Evolution de l'absorbance A et du pourcentage d'inhibition I du DPPH, en fonction de la concentration des échantillons HD, HD+TA et d'acide ascorbique .....	69
<b>Figure III. 10 :</b> Courbe d'étalonnage du DPPH.....	71
<b>Figure III. 11 :</b> Figure III.11 : Evolution de l'indice $DPPH_{res}$ , en fonction du rapport AO/DPPH des échantillons HD, HD+TA et d'acide ascorbique. ....	73

## Liste des tableaux

<b>Tableau I. 1</b> : Chémotypes de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	19
<b>Tableau I. 2</b> : Applications des tensioactifs, en fonction de leur HLB.....	26
<b>Tableau II. 1</b> : Propriétés physico-chimiques du tensioactif utilisé .....	50
<b>Tableau III. 1</b> : Rendements en huile essentielle, en %, obtenus par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	54
<b>Tableau III. 2</b> : Rendements en huile essentielle, en %, obtenus par hydrodistillation des échantillons de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	55
<b>Tableau III. 3</b> : Rendements en huile essentielle, en %, obtenus par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur de <i>Rosmarinus officinalis</i> L avec et sans prétraitement au tensioactif .....	56
<b>Tableau III. 4</b> : Concentration des antioxydants dans les eaux de distillation, masse d'antioxydants récupérés des eaux de distillation de 100g de plante sèche et teneur en antioxydants dans l'extrait sec .....	64
<b>Tableau III. 5</b> : Comparaison du pourcentage d'inhibition I (%) du DPPH des eaux de distillation, récupérées lors de l'hydrodistillation en présence (HD+TA) et en absence (HD) du tensioactif et des acides ascorbique (AA), gallique (AG) et tannique (AT).....	65
<b>Tableau III. 6</b> : Concentrations inhibitrices IC <sub>50</sub> des échantillons des eaux de distillation HD et HD+TA. ....	67
<b>Tableau III. 7</b> : Concentrations inhibitrices IC <sub>50</sub> , en µg/mL, des échantillons des eaux de distillation HD, HD+TA et d'acide ascorbique.....	70
<b>Tableau III. 8</b> : Evolution de l'indice DPPH <sub>res</sub> , en fonction du rapport AO/DPPH des masses d'antioxydant et du DPPH, pour les échantillons HD, HD+TA et l'acide ascorbique .....	72
<b>Tableau III. 9</b> : Concentrations inhibitrices IC <sub>50</sub> , en mgAO/gDPPH, des échantillons des eaux de distillation HD, HD+TA et d'acide ascorbique .....	74

# *Introduction*

La nature cache une multitude de merveilles auxquelles, trop souvent, aucune attention n'est portée. Grâce à leurs inestimables valeurs, les extraits de plantes aromatiques et médicinales constituent l'une de ces merveilles.

Les effets bioactifs des extraits des plantes, notamment, des huiles essentielles et des antioxydants qu'elles renferment, se sont avérés être liés à leur richesse en composés terpéniques et phénoliques de structures chimiques diverses. A l'heure actuelle, ces produits naturels connaissent un intérêt croissant et trouvent des applications dans de nombreux domaines, tels, agroalimentaire, pharmacie, parfums et cosmétiques... En effet, leur utilisation est encouragée, car les composés équivalents issus de synthèses chimiques ont, souvent, des effets indésirables et mauvaise presse parmi le grand public. Il existe, donc, un besoin de production de substances naturelles bioactives isolées, concentrées et purifiées, pour la substitution des produits synthétiques.

Le fort pouvoir antioxydant et antimicrobien des plantes de la famille *Lamiacées*, à laquelle appartient *Rosmarinus officinalis* L., en fait l'une des familles botaniques les plus fréquemment utilisées au niveau mondial. Le romarin représente, donc, une source inépuisable de substances ayant des activités antioxydantes 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.

Dans ce contexte, nous avons étudié l'influence, sur le rendement en l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., du procédé d'extraction mis en œuvre, de la période de végétation, de la durée et la température du stockage de la matière végétale. Nous nous sommes intéressés, également, à la valorisation des eaux de distillation récupérées lors de l'hydrodistillation de la plante, en mettant en évidence la présence des substances, ayant un pouvoir antioxydant comparable à celui de l'acide ascorbique (vitamine C).

Le premier chapitre de ce document est une revue bibliographique, relative à la matière végétale, objet de cette étude, aux huiles essentielles et les procédés de leur extraction, aux antioxydants, en général, et ceux du romarin, en particulier.

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

Le troisième et dernier chapitre regroupe les rendements des huiles essentielles obtenues des différents essais d'extraction. Les résultats des analyses des eaux de distillation, récupérées lors de l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L, mettant en évidence la présence des antioxydants et l'évaluation de leur pouvoir antioxydant, y sont également présentés.



*Chapitre I :*

*Etude bibliographique*

## **I.1. Les huiles essentielles**

### **I.1.1. Historique**

La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorantes et des pierres brûlantes. La vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle (Robert, 2000).

Au début du XVI<sup>ème</sup> siècle, Paracelse, médecin suisse considéré comme le père de la pharmaco-chimie étudia l'extraction de «l'âme » des végétaux sous forme de «quintessence » (ou cinquième essence) à laquelle le nom «d'esprit » a été donné. Puis, on lui attribua le nom «d'essence » et finalement «d'huile essentielle » (Paris et Moyses, 1976).

Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes se sont développés, notamment par les civilisations arabes et égyptiennes, qui leurs attribuent avant tout un usage religieux (Sell, 2006). Puis progressivement, ces huiles essentielles se font connaître pour leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles.

De nos jours, l'usage des huiles est très large dans les domaines de la pharmacologie, la cosmétique, l'agroalimentaire, et récemment l'agro-phytosanitaire, et leurs propriétés thérapeutiques font l'objet de nombreuses recherches scientifiques.

### **I.1.2. Définition**

Malgré l'usage courant de ce terme « huile essentielle », il est très difficile de lui attribuer une seule définition, car ses domaines d'application sont tellement divers que l'on ne peut avoir une seule définition qui englobe et qui reflète toutes ses caractéristiques.

Les huiles essentielles sont des produits odorants, volatils, issus du métabolisme secondaire d'une plante aromatique, formées dans des cellules spécialisées ou groupe de cellules (Conner, 1993).

D'après Teuscher et *al.* (2005), les huiles essentielles sont des mélanges de composés lipophiles, volatils et le plus souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés, Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante.

Les huiles essentielles sont des composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou des solvants (Smallfield, 2001).

L'association française de normalisation AFNOR définit l'huile essentielle comme étant des «produits obtenus, soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques » (AFNOR, 1996).

La 8<sup>ème</sup> édition de la pharmacopée française, en 1965, a défini une huile essentielle, appelée encore essence ou huile volatile, comme étant un produit de composition généralement assez complexe, renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus aux moins modifiés au cours de l'extraction. Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisés pour la récupération des essences officinales: la distillation à la vapeur d'eau de plantes à essences ou de certaines de leurs organes, et le procédé par expression (Wichtl et Anton, 2003).

Depuis la neuvième édition, en 1972, la pharmacopée européenne n'utilise plus que le terme huile essentielle. La Commission de la Pharmacopée Européenne donne la définition suivante d'une huile essentielle : «Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage» (Bruneton, 1993).

### **I.1.3. Répartition et localisation des huiles essentielles**

#### **I.1.3.1. Répartition**

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Il y aurait, selon Lawrence, 17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles, telles, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae*, *Zingiberaceae*, etc.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (Bergamitier, Tubereuse), mais aussi les feuilles (Citronnelle, Eucalyptus, Laurier noble) et, bien que cela soit moins habituel, dans des écorces (Cannelier), des bois (bois de rose, bois de santal), des racines (Vétiver), des rhizomes (Curcuma, Gingembre), des fruits (toutes épices, Anis, Badiane), des graines (Muscade, Coriandre).

Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation. Ainsi, dans le cas de l'oranger amer (*C. Aurantium* L. ssp *Aurantium*, *Rutaceae*), le « zeste » c'est-à-dire le péricarpe frais du fruit, fournit l'huile essentielle d'orange amère ou « essence de curaçao », la fleur fournit « l'essence de Néroli » et l'hydrodistillation de la feuille, des ramilles et des petits fruits conduit à « l'essence de petit grain bigaradier ». La composition de ces trois huiles essentielles est différente. Quantitativement, les teneurs en huiles essentielles sont plutôt faibles, assez souvent inférieures à 10 ml/Kg. Des teneurs fortes comme celle du bouton floral de giroflier (150 ml/Kg et plus dans le bouton séché) sont exceptionnelles.

### **I.1.3.2. Localisation**

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à huiles essentielles des *Lauraceae* ou des *Zingiberaceae*, poils sécréteurs des *Lamiaceae*, poches sécrétrices des *Myrtaeae* ou des *Rutaceae*, canaux sécréteurs des *Apiaceae* ou des *Asteraceae* (Bruneton, 2009).

### **I.1.4. Composition chimique des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Sell, 2006).

Elles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des composés terpéniques, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvés en tant que composés majoritaires dans quelques unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc. ... Divers autres constituants minoritaires leur sont associés.

De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques (Sharma *et al.*, 2003 ; Wagner *et al.*, 2004)

♣ **Les composés terpéniques** : ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre  $n$  entier d'unités pentacarbonés ( $C_5$ ) ramifiées, dérivés du 2-méthyl-1,3-butadiène (isoprène), la classification suivante a été effectuée :

➤ Pour  $n = 2$  : les monoterpènes. Ces terpènes, proprement dits, sont des hydrocarbures en  $C_{10}$ . Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels appartenant à différentes classes chimiques, telles alcool, aldéhyde, cétone ester.

➤ Pour  $n = 3$  : les sesquiterpènes. Ce sont des hydrocarbures de formule  $C_{15}$ , soit une fois et demie (sesqui-) la molécule des terpènes (en  $C_{10}H_{16}$ ). Un groupe particulier de sesquiterpènes est représenté par les azulènes, composés instables, dont le nom vient de leur coloration bleue et qui sont utilisés en pharmacognosie, en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta et hepta carbonés. Nous retrouvons dans ce groupe le chamazulène (des essences de camomille et de matricaire).

➤ Pour  $n = 4$  : les diterpènes qui sont des dérivés d'hydrocarbures en  $C_{20}$ . Ces composés, à point d'ébullition élevé, se trouvent surtout dans les résines.

➤ Pour  $n = 5$  : les sesterpènes. Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en  $C_{25}$ .

➤ Pour  $n = 6$  : les triterpènes. Ces composés en  $C_{30}$  sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés, ou sous forme hétérosidique.

♣ **Les composés aromatiques** : sont moins abondants que les terpénoïdes. Ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique, tels, la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole, etc..., que l'on trouve dans les huiles essentielles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc... (Bruneton, 1999).

### **I.1.5. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont généralement liquides à température ordinaire. Elles sont incolores ou jaune pâle, volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1 (sauf les huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffras qui ont densité supérieure à celle de l'eau). Elles ont un indice de réfraction qui varie essentiellement avec la

teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés ; une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plus part des solvants organiques (Bruneton, 1995).

### **I.1.6. Activités biologiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaies (Pellecuer et *al.*, 1980) ou au niveau de la microflore vaginale (Viollon et Chaumont, 1994) , et d'origine fongique contre les dermatophytes (Chaumont et Leger, 1989). Elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques (Sivropoulou et *al.*, 1996) qui les rapprochent, donc, des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc. L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles les plus actives. Son composé majoritaire, le carvacrol, possède également une forte activité antimicrobienne (Caccionni et *al.*, 1998). D'après les travaux de Sivropoulou et *al.* (1996), les huiles de menthe et d'origan présentent des activités antibactériennes remarquables contre les souches à Gram+ et à Gram- (Hernandez Ochoa, 2005).

Etant donné la grande complexité de la composition chimique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies, certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile.

Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques et décroît dans l'ordre : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > éthers > hydrocarbures (Chaumont et Leger, 1989).

### **I.1.7. Facteurs de variation de la composition chimique des huiles essentielles**

La teneur et la composition d'une huile essentielle varient en fonction d'un grand nombre de paramètres d'ordre naturel, d'origine extrinsèque et intrinsèque et d'ordre technologique. On

se contentera d'un bref aperçu sur les facteurs susceptibles d'influer sur la quantité et la qualité d'une essence.

### **I.1.7.1. Facteurs d'ordre naturel**

#### **Extrinsèques**

Les conditions externes soit géographiques (latitude, altitude), édaphiques (nature du sol, les aspects culturaux comme la densité de culture, l'apport d'engrais, le nombre de récolte par an...) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des essences. Divers articles traitent de leurs influences.

Selon Fluck 1963, les facteurs écologiques prépondérants sont le climat et le sol. Ils affectent davantage les espèces dont l'essence est sécrétée dans les poils glandulaires (*Labiatae*, *Verbénaceae*, *Géraniaceae*, *Rutaceae*). Par contre, celles produites dans les formations schizogènes des feuilles, calices ou tiges sont peu affectées par les conditions météorologiques (*Lauraceae*, *Compositae*), de même que celles générées dans les canaux sécréteurs des formations schizolysigènes des fruits ou racines (*Ombelliferaeae*, *Zymgiberaceae*). Celles-ci sont cependant sensibles aux stress hydriques, qu'il s'agisse de plantes xérophytiques ou mésophytiques.

Chez *Coriandum sativum*, espèce xérophytique, une forte humidité est favorable à la production d'huile essentielle. A l'inverse, chez *Levisticum officinale*, plante mésophytique, un excès d'humidité fait chuter le rendement.

La composition chimique de l'essence de menthe poivrée est sensible à l'ensoleillement où la formation du menthol est favorisée par les nuits froides. Les jours longs et les nuits tempérées, au contraire, conduisent à une quantité plus grande d'huile essentielle riche en menthofuranne (Clarck, et Menery, 1980).

#### **Intrinsèques**

Ce sont des variables qui dépendent de la plante elle-même (génétique, localisation, maturité,...).

#### **♣ L'origine botanique**

Le rendement et la composition d'une huile essentielle dépendent, respectivement, de la famille et de l'espèce productrice.

**♣ Les chémotypes**

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents.

L'exemple le plus démonstratif est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris*. En effet, cette espèce a six chémotypes différents. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit le géraniol,  $\alpha$ -terpinéol, thuyanol-4, linalool, carvacrol ou thymol (Thompson et al., 2003). Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables.

**♣ L'organe utilisé pendant l'extraction**

En effet la teneur en huile essentielle varie selon l'organe utilisé. Ce facteur dépend également de la nature des glandes sécrétrices ; les poches situées dans l'exocarpe ou dans l'endocarpe des fruits génèrent des essences qui diffèrent en teneur des monoterpènes et sesquiterpènes.

**♣ Cycle végétatif**

La biosynthèse des principes odorants évolue au cours du cycle végétatif de la plante. Elle est prédominante pendant les périodes de forte croissance ou pendant celles, correspondant à des activités métaboliques intenses, telles, la floraison et la maturation du fruit. (Yesil Celiktas et al., 2007).

**I.1.7.2. Facteurs d'ordre technologique**

De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle.

Le mode de récolte, les conditions de transport, de séchage et de stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques. Les changements les plus importants interviennent lors du procédé d'extraction sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (pH, température) et de la durée d'extraction. Les traitements auxquels la matière végétale est soumise avant ou pendant l'extraction (broyage, dilacération chimique ou enzymatique,



pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (Angnioni *et al.* 2004).

### **I.1.8. Domaine d'utilisation des huiles essentielles**

Depuis l'aube des temps les hommes ont employé les plantes pour divers usages (condiments, médecine traditionnelle et pour lutter contre les entomopathogènes).

Les huiles essentielles comptent parmi les principes actifs des végétaux. Contrairement aux produits de synthèse, elles présentent des garanties d'efficacité d'hygiène et de santé indiscutables.

Quel que soit le mode d'utilisation, les huiles essentielles prolongeront leur action sur tous les plans grâce à leur volatilité et à leur extraordinaire pouvoir de pénétration. De nos jours, les huiles essentielles sont utilisées dans divers domaines comme :

#### **En parfumerie et cosmétique**

Les huiles essentielles sont utilisées dans l'industrie des produits de beauté, parfums, articles de toilette et produits d'hygiène (Porter, 2001).

L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gels permet de conserver ces cosmétiques grâce à leurs pouvoirs antiseptique et antioxydant, tout en leur procurant une odeur agréable (Vargas *et al.*, 1999).

#### **En agro-alimentaire**

Le consommateur cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés, ainsi qu'une meilleure qualité organoleptique. Une technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des huiles essentielles (Lachowicz *et al.*, 1998).

Les huiles essentielles trouvent des nombreuses applications dans industrie agro-alimentaire. Plusieurs secteurs alimentaires sont des consommateurs : boissons non alcoolisées, confiserie, produits laitiers, soupes, sauces, boulangerie, sans oublier la nutrition animale.

#### **En thérapeutique**

Les huiles essentielles sont utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires, telles que les rhumatismes, les allergies, l'arthrite et pour traiter certaines

maladies internes et externes, comme les infections d'origine bactérienne ou virale, les troubles humoraux ou nerveux (Maruyama, 2005).

L'usage des huiles essentielles est réalisé par massages, par inhalations, par vaporisation ou dans le bain.

### **En pharmacie**

Certaines huiles essentielles sont aussi utilisées dans l'industrie pharmaceutique, en particulier, dans le domaine des antiseptiques externes et, plus généralement, pour l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à être administrées par voie orale (Abrassart, 1988).

#### **I.1.9. Stockage et conservation des huiles essentielles**

Très volatiles et sensibles à la lumière, les huiles essentielles peuvent rapidement perdre leurs propriétés. Très vite, elles commencent à vieillir, généralement au bout de 6 mois. Pour cela elles doivent être impérativement gardées à l'abri de l'air, de la lumière et de la chaleur, et conservées dans des flacons en verre (les huiles essentielles sont réputées « ronger » les plastiques) opaques ou teintés (en bleu ou brun) hermétiquement clos, entreposés debout (Abrassart, 1997 ; Telpou, 2003).

## **I. 2. La matière végétale: *Rosmarinus officinalis* L.**

### **I.2.1. Historique**

Le romarin a fait objet de très nombreuses mentions historiques et légendaires. Il était déjà employé dans l’Egypte ancienne puis il est parvenu en Europe Centrale au IX<sup>ème</sup> par l’intermédiaire des moines bénédictins. Le romarin acquit surtout sa célébrité parce qu’il entra dans la composition de l’eau de la reine de Hongrie. En effet, âgée de soixante-douze ans, infirme et gouteuse, elle aurait retrouvé vigueur et beauté par une cure de cette eau magique (Teuscher et *al.*, 2005).

Les mariées portaient des couronnes de romarin, symboles d’amour et de fidélité, tandis que les invités recevaient des branches enjolivées de rubans de soie multicolores.

Les étudiants grecs s’en confectionnaient des couronnes de romarin qu’ils portaient durant les examens, car elles avaient la réputation d’améliorer mémoire et facultés intellectuelles. Il y a d’ailleurs, un adage qui dit que le romarin est à l’esprit ce que la lavande est à l’âme.

### **I.2.2. Taxonomie**

La classification botanique complète du genre *Rosmarinus* L. n’a été achevée qu’au début du 20<sup>e</sup> siècle en raison de l’extrême variabilité des espèces. Le romarin appartient à la deuxième série, parmi les six, de la famille des *Labiées* ou *Lamiacées*. Cette famille, l’une des plus importantes de la flore d’Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces (Boelens, 1985).

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

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

Trois espèces du genre *Rosmarinus L* ont été décrites : *Rosmarinus officinalis L*, *Rosmarinus eriocalyx* et *Rosmarinus tomentosus* (Quezel et Santa, 1963).

### **I.2.3. Description botanique**

Le romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) doit son nom au latin *ros*, rosée, et *marinus*, marin, en allusion à l'habitat de la plante que l'on trouve, selon la légende, uniquement dans les régions où s'étend, au petit jour, la rosée venant de la mer. Une autre origine pour son nom de genre explique que *Rosmarinus* serait un dérivé du latin *Rosa marina*, soit littéralement « la rose de mer », qui est le surnom de la plante dans certain régions (Escuder, 2007).

Les noms vernaculaires: rose marine, encensier, romarin des troubadours, herbe aux couronnes lui sont aussi attribués (Paume, 2008).

Le romarin est un arbrisseau formant un buisson de 1 m et plus, toujours vert, très aromatique, très feuillé dès la base. Les feuilles persistantes sont coriaces, sessiles, linéaires, entières, enroulées par les bords, vertes et chagrinées en dessus, blanches tomenteuses en dessous. Les fleurs bleu pâle ou blanchâtres, subsessiles, sont disposées en petites grappes axillaires et terminales. Le calice est en cloche, bilabié, pulvérulent, nu à la gorge, à lèvre supérieure ovale et entière, l'inférieure à deux lobes lancéolés. La corolle bilabiée, à tube saillant, est à lèvre supérieure en casque bifide, l'inférieure à trois lobes, le moyen très large et concave. Les deux étamines, à filets saillants, munis vers la base d'une petite dent, sont insérées à la gorge de la corolle. Les anthères sont linéaires et à une loge. Le fruit est un tétrakène à quatre carpelles obovales et lisses, dissimulés au fond du calice (Ducarf, 2007)



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

Le romarin fleurit longtemps, deux fois dans l'année, dès le mois de février jusqu'en mai et à l'automne (Paume, 2008), Cependant, il peut arriver de le voir fleurir en toute période lorsqu'il se trouve en situation optimale. La récolte du romarin peut se faire en toute période (Escuder, 2007).

#### **I.2.4. Répartition géographique**

Le romarin possède une aire géographique très vaste, il pousse sur tous type de terrains avec une préférence pour les sols calcaires, argileux, argileux limoneux situé dans les endroits ensoleillés chauds, secs et abrités du vent. Il est répandu sur la pluparts des maquis, garrigues sur les rivages marins, on le rencontre jusqu'à 1500m d'altitude. Il accompagne souvent le pin d'Alep, la sauge, le thym (Gilly, 2005).

Plante commune du bassin méditerranéen, son aire de répartition s'étend jusqu'au sud-ouest de l'Asie (Rombi et Robert, 2007).

Les grands producteurs du romarin sont L'Italie, le Dalmatie, l'Espagne, la Grèce, la Turquie, l'Egypte, la France, le Portugal et le Nord d'Afrique.

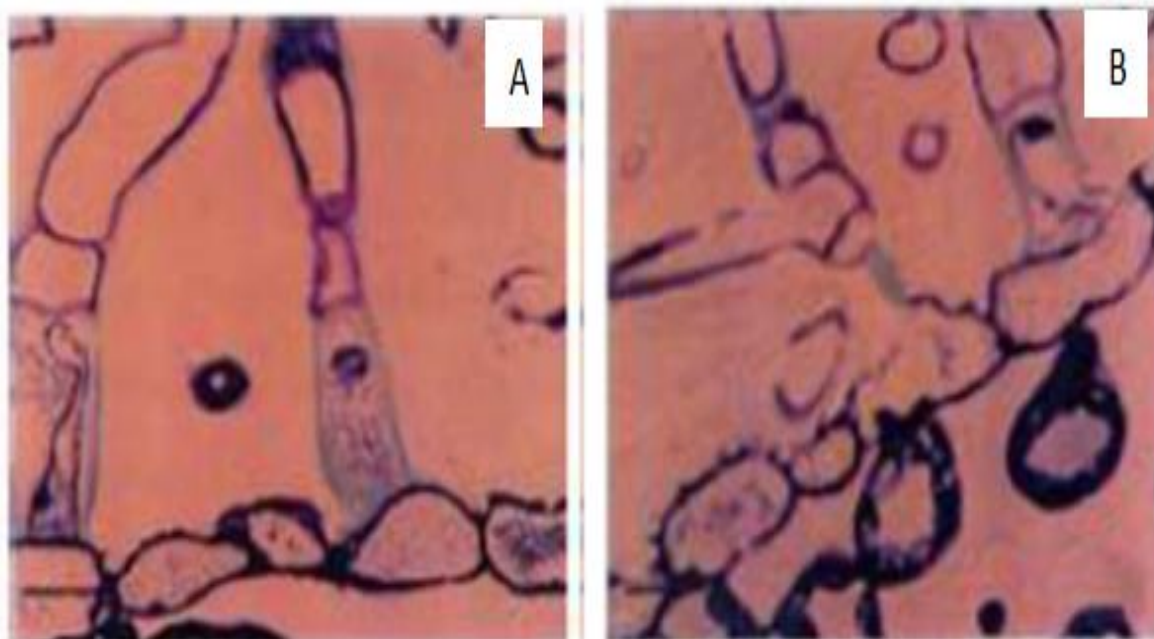
En Algérie le romarin s'étale sur une superficie excédant 100 000 hectares (Bensebia et *al.*, 2009).

#### **I.2.5. Structure sécrétrice du *Rosmarinus officinalis* L.**

Les cellules sécrétrices dans un végétal ne forment pas un tissu, au sens strict du mot, et n'ont pratiquement jamais d'origine commune. Il n'y a pas entre elles de continuité morphologique. Seule la fonction physiologique identique de ces éléments permet de définir le tissu sécréteur. Les sécrétions sont les produits du métabolisme végétal qui comprennent, entre autres, les huiles essentielles.

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

- **Les trichomes non glandulaires** sont présents dans les veines et les marges de la feuille. Certains des trichomes non glandulaires sont monocellulaires, d'autres, plus nombreux, sont multicellulaires et ramifiés (figures I.2.A et I.2.B).



**Figure I. 2 : Micrographie lumineuse des trichomes non glandulaires de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. (Marin, Koko, Duletic- Lausevic, 2006)**

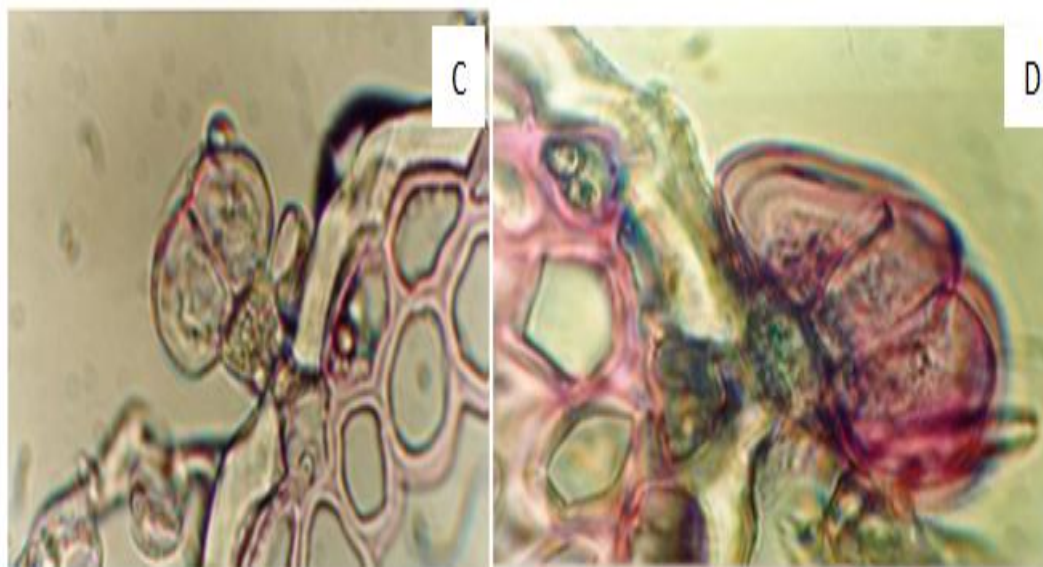
A: Section longitudinale des trichomes non glandulaires non ramifiés, bar=100 $\mu$ m ;

B: Section longitudinale des trichomes non glandulaire ramifiés, bar=100 $\mu$ m.

- **Les trichomes glandulaires**

Perrot (Perrot, 1968) à découvert la présence de poils sécréteurs de deux sortes dans le limbe de la feuille du *Rosmarinus officinalis* L. Plus tard, Spiro et Chen (Spiro, Chen, 1994) rapportent que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. est contenue dans des glandes épidermiques appelées « trichomes », en l'occurrence, des trichomes peltés et des trichomes capités.

- **Les trichomes peltés** sont présents majoritairement sur la surface abaxiale et localisés dans des dépressions épidermiques. Ils sont constitués d'une cellule épidermique basale, d'une large tige unicellulaire et d'une tête sécrétrice multicellulaire. (Figure I.3.D).



**Figure I. 3 : Trichomes peltés de *Rosmarinus officinalis* L. (Gr : 100 x 3.2)  
(Boutekedjiret, 1999)**

C: Trichome pelté bicellulaire de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L.

D: Trichome pelté pluricellulaire de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L.

- **Les trichomes capités** sont situés sur la surface adaxiale et abaxiale des feuilles et ils sont plus nombreux que les trichomes peltés. Les trichomes capités de type I sont constitués d'une cellule basale, d'une courte tige unicellulaire et d'une tête à un ou à deux loges sécrétoire (figure I.4.E). Les trichomes capités de type II sont composés d'une cellule basale, d'une courte tige mono ou bicellulaire et une tête sécrétrice unicellulaire (figure I.4.F).

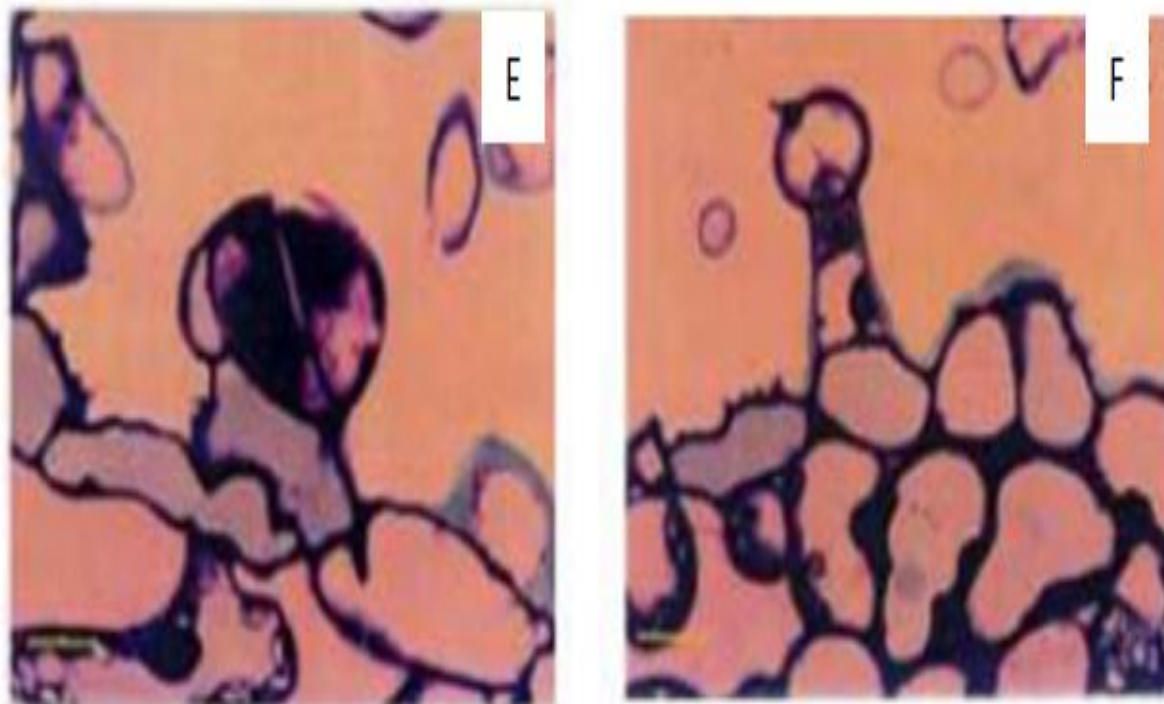


Figure I. 4 : Micrographie lumineuse des trichomes glandulaires de la feuille de

*Rosmarinus officinalis* L. (Marin, Koko, Duletic-Lausevic, 2006)

E: section longitudinale d'un trichome glandulaire capité de type I, bar=100  $\mu\text{m}$  ;

F: section longitudinale d'un trichome glandulaire capité de type II, bar=100  $\mu\text{m}$ .

#### I.2.6. Composition chimique du *Rosmarinus officinalis* L.

- **L'huile essentielle** représente 1 à 3% de la plante. Sa composition, notamment, la teneur de ses composés majoritaires est à l'origine de la définition des chémotypes.
- **Phénols diterpinés** : constitués principalement d'acide carnosique (environ 0,35%) qui se dégrade facilement en carnosol, et sont accompagnés d'isosmanol, de rosmariquinone, de rosmaridiphénol.
- **Dérivés de l'acide cinnamique**: représentent environ 3,5% et sont constitués principalement d'acide rosmarinique (1,1 à 2,5%).
- **Flavonoïdes** : présents sous forme d'aglycones et d'hétérosides comme la cirsimarine, la diosmine, l'hespéridine, l'homoplantiginine.



**I.2.7. Chémotypes du *Rosmarinus officinalis* L.**

La notion de chémotype s'applique exclusivement dans le cadre d'une même espèce botaniquement bien identifiée et pour laquelle on découvre l'existence de variations notables et relativement constantes dans la composition chimique. Quatre chémotypes du *Rosmarinus officinalis* L., sont rapportés dans la littérature (Raskin, 2003) :

- ✓ à camphre ;
- ✓ à 1,8-cinéole ;
- ✓ à myrcène ;
- ✓ à verbénone.

En effet, la teneur de ces principaux constituants peut varier, selon le chémotype, entre :

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

Ces constituants majoritaires sont accompagnés de  $\beta$ -caryophyllène, de limonène, de linalool, de  $\beta$ -pinène, de sabinène, de  $\gamma$ -terpinène, d' $\alpha$ -terpinéol et de terpinéol-4 (Teuscher et al., 2005).

Les variations dans la composition chimique de l'huile sont attribuées à la localisation géographique (Tuker and Maciarello, 1986; Tewari and Virmani, 1987; Mizrahi et al., 1991; Svoboda et Deans, 1992; Chalchat et al., 1993; Lawrence, 1995; Rao et al., 1997; Dellacassa et al., 1999). Déjà en 1973, Granger et al. avaient remarqué que le composé majoritaire du romarin d'Italie est le 1,8 cinéole, alors que pour le romarin de Corse c'est l' $\alpha$ -pinène et pour le romarin poussant en Espagne, le camphre.

La composition chimique de l'huile essentielle du romarin cultivé à l'Ecole Nationale Polytechnique, objet de cette étude a été élucidée par CG-SM (Abdelli, 2010) et par CPG (Arab et Beddar, 2011).

Le tableau I.1 regroupe les compositions chimiques des huiles essentielles du romarin, appartenant aux différents chémotypes.

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

Chémotypes	Teneur en (%)						
	camphre (Alaux, 2006)	1,8- cinéole (Alaux, 2005)	verbénone (Site web [1])	myrcène (Mateus et al., 2006)	Algérie		
					(Boutekdjiret, 1999)	(Abdelli, 2010)	(Arrab et Beddar, 2011)
<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	20,21	11,37	17,66	11,2	0,4	15,5	37,74
<b>Camphène</b>	8,33	4,69	6,03	3,4	0,3	10,5	5,82
<b><math>\beta</math>-pinène</b>	4,26	7,84	2,67	2,9	0,3	4,03	3,38
<b>Myrcène</b>	5,63	1,13	1,66	31,5	tr	1,5	1,34
<b><math>\alpha</math>- phellandrène</b>	0,46	0,21	—	1,4	—	0,4	0,32
<b><math>\alpha</math>-terpinène</b>	0,57	0,61	0,56	0,9	—	1,1	0,77
<b>p-cymène</b>	3,24	0,53	1,22	1,4	tr	4	0,55
<b>1,8-cinéole</b>	19,13	44,48	8,06	14,9	31,9	—	—
<b>Limonène</b>	4,47	2,25	4,15	3,2	—	2,1	3,47
<b>cis-<math>\beta</math>-ocimène</b>	0,14	—	—	0,7	—	1,8	—
<b><math>\gamma</math>-terpinène</b>	0,75	0,9	1,31	1,8	tr	2,7	2,59
<b>terpinolène</b>	0,59	0,42	1,24	0,6	tr	1,5	1,38
<b>Linalol</b>	0,76	0,53	1,96	1,2	3,9	2,1	2,64
<b>Camphre</b>	18,67	10,07	14,46	14,4	19,7	15,2	9,26
<b>Bornéol</b>	2,46	3,57	3,06	1	12,1	3,9	3,01
<b><math>\gamma</math>-terpinéol</b>	0,11	—	—	—	—	—	—
<b>terpinène-4-ol</b>	0,14	0,96	1	1	4	1,1	1,2
<b><math>\alpha</math>-terpinéol</b>	2,6	2,08	1,09	1,4	12,8	0,8	0,16
<b>verbénone</b>	0,23	0,02	10,08	2,6	—	1	2,15
<b>acétate de bornyle</b>	1,3	1,5	11,19	0,2	3,1	3,6	2,22
<b><math>\beta</math>- carryophyllène</b>	1,49	4,55	1,33	0,5	3	—	—
<b><math>\alpha</math>-humulène</b>	—	—	0,41	0,1	tr	0,7	1,69
<b>Verbéno</b>	—	—	—	—	—	—	0,7
<b>cis-<math>\alpha</math>- bisabolène</b>	—	—	—	0,1	—	—	0,28
<b>oxyde de carryophyllène</b>	—	0,16	—	0,2	tr	0,8	—

Nous observons que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. provenant de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger appartient au chémotype à camphre (Abdelli, 2010 ; Arrab et Beddar, 2011).

### **I.3. Procédés d'extraction**

Les procédés utilisés pour l'extraction des huiles essentielles ont pour but de capter les produits les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité (Lardy et Haberkorn, 2007).

Les techniques mises en œuvre sont *conventionnelles*, utilisées depuis longtemps, tels l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau, l'expression et *nouvelles*, développées plus récemment, comme, entre autres, l'hydrodistillation assistée par micro-ondes, la détente instantanée contrôlée.

#### **I.3.1. Hydrodistillation**

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé le plus ancien. En effet, il fut importé en Europe par les Arabes entre le VIII<sup>ème</sup> et le X<sup>ème</sup> siècle, mais le principe était déjà connu et utilisé par les égyptiens dès le IV<sup>ème</sup> siècle avant J.C. Il est aussi le plus utilisé, le plus rentable et convenant le mieux à l'extraction des molécules odorantes en vue d'une utilisation thérapeutique (Willem, 2002).

Le principe de cette méthode consiste à immerger la matière végétale dans l'eau. En chauffant l'eau, la vapeur formée entraîne avec elle l'huile essentielle. Le mélange des vapeurs d'eau et d'huile est refroidi et condensé. L'huile est ensuite récupérée par décantation. (Bachelot et *al.*, 2006).

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier et peut atteindre plusieurs heures, selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter.

La durée de distillation influe non seulement sur le rendement, mais également sur la composition de l'huile (Lucchesi, 2005).

#### **I.3.2. Entraînement à la vapeur d'eau**

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer la composition, le procédé d'entraînement à la vapeur est préféré à l'hydrodistillation.

Cette technique est similaire à la précédente sauf que la matière végétale ne pas en contact avec l'eau. Elle consiste à déposer la matière végétale dans l'extracteur sur une grille à travers

laquelle passe la vapeur d'eau, produite dans une chaudière. Cette dernière entraîne l'huile essentielle, les vapeurs d'eau et d'huile sont ensuite condensées et l'huile est récupérée par décantation.

Cette méthode est supposée apporter une amélioration de la quantité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques, car la matière végétale ne baigne pas dans l'eau bouillante (Franchomme et Pénoel, 1990 ; Lucchesi, 2005).

### **I.3.3. Mécanisme de l'extraction des huiles essentielles**

Les phénomènes régissant l'entraînement la vapeur d'eau sont complexes et peu connus à ce jour. Selon la théorie de (Von Rechenberg, 1910), le mode de récupération des huiles essentielles à partir des cellules végétales, au cours de l'entraînement à la vapeur d'eau, suit deux processus, l'osmose et la diffusion libre.

Le terme diffusion désigne un déplacement des différentes substances jusqu'à l'équilibre du système, déplacement qui serait dû au mouvement des molécules à l'intérieur des tissus de la plante, sous l'effet de la chaleur.

Les échanges de matière à travers les tissus de la plante dépendent principalement de la perméabilité de celles-ci et l'endroit où les huiles essentielles s'accumulent. (Marin et al., 2006).

Au cours de l'entraînement à la vapeur, les conditions de température et de pression augmentent considérablement le mouvement des molécules dans la plante, mais à la température d'ébullition de l'eau, une partie de l'huile volatile se dissout dans l'eau ayant diffusée à l'intérieur des glandes par osmose à travers la membrane cellulaire. La solution résultante huile-eau, exerçant une pression osmotique, s'infiltrera, à son tour, à travers les pores élargis de la paroi cellulaire gonflée et atteindra finalement la surface externe puis l'huile sera vaporisée et entraînée par la vapeur d'eau ascendante. Ce processus se poursuivra jusqu'à ce que toutes les substances volatiles aient été extraites et entraînées par la vapeur d'eau. Dans ce cas la vitesse de transfert de matière est très lente.

Une étude menée par (Gokhale et Masada, 1997) sur l'entraînement à la vapeur d'eau des graines confirme l'existence de deux étapes : osmose, dans le cas d'un matériel végétal intact, où les parois cellulaires ralentissent la cinétique d'extraction, et diffusion libre dans le cas

d'un matériel broyé, le broyage détruit toute barrière entre l'huile essentielle et la vapeur d'eau (Guenther, 1972).

Lorsque le matériel végétal est finement découpé, les parois cellulaires sont détruites et l'entraînement de l'huile se fait exclusivement par diffusion libre. Dans ce cas, les constituants de l'huile distillent dans l'ordre de leurs volatilités. Le processus de distillation est accéléré et la durée totale d'extraction peut ainsi être considérablement réduite. Le découpage est donc conseillé, car il évite les phénomènes de diffusion à cinétique lente.

D'autre part, il semblerait que, pour un matériel végétal intact, les composés polaires soient entraînés plus vite que les composés apolaires. Ainsi, les hydrocarbures monoterpéniques sortiraient après les alcools monoterpéniques. Or, la considération des températures d'ébullition n'explique pas cet ordre de sortie. Ce phénomène trouverait une interprétation, en considérant que la vitesse de diffusion des composés oxygénés dans l'eau, est supérieure à celle des composés apolaires et ils seront les premiers à arriver à la surface pour y être entraînés par la vapeur (Guenther, 1972).

Lors de la distillation des huiles essentielles, des phénomènes d'échanges de matière interviennent entre les phases et solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur le rendement et la qualité de la production.

Des études plus récentes (Gueorguiev, 1995) font état des différentes phases de l'hydrodistillation des végétaux. Pour que l'huile puisse être entraînée, il faut qu'elle soit en contact direct avec la vapeur. Un tel contact suppose la destruction de la structure cellulaire du végétal qui ne peut pas avoir lieu dans les conditions de l'hydrodistillation. Aussi, selon le mécanisme proposé, en début du processus, on assiste à la thermodiffusion ou exsudation thermique de l'huile, jusqu'à l'établissement d'un équilibre des températures à l'extérieur et à l'intérieur du site sécréteur. Par ailleurs, au contact avec la surface de la matière végétale, l'eau pénètre par osmose dans les sites sécréteurs. L'eau étant devenue abondante, la pression exercée de l'intérieur du site vers le milieu opératoire, alors, sur la paroi primaire (cuticule). Ce phénomène est appelé pression de turgescence. Dans ces conditions la turgescence provoque le gonflement du trichome et un élargissement des pores de la cuticule. De plus, la température élevée provoque la coagulation du protoplasme du trichome et par conséquent ce dernier, mais aussi la cuticule perd leur semi perméabilité. Arrivée à l'extérieur du trichome, l'huile essentielle rencontre une couche d'eau de condensation qui enveloppe le matériel végétal. Il s'ensuit une hydrodiffusion à travers cette couche, jusqu'à une interface huile-

vapeur. Le contact direct huile-vapeur étant assuré, l'huile s'évapore et est entraînée par le flux de vapeur.

**I.4. Utilisation des tensioactifs lors de l'extraction des huiles essentielles**

Les premiers travaux l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques en présence de tensioactifs ont été entrepris dans les années 1960 (Trandafilov et Minkov, 1969 ; Minkov et *al.*, 1967). Les essais menés sur l'extraction des huiles essentielles de menthe, de lavande et de rose ont tous permis de constater une augmentation du rendement en huile de 30 à 40 %. Les auteurs n'observent pas des changements significatifs dans la composition des huiles obtenues. Toutefois, les résultats de ces recherches n'ont pas été mis en œuvre dans la pratique.

Les travaux dans ce domaine ont été repris dans les années 1970 et 2000 et appliquées à l'extraction de l'huile essentielle des pétales de rose, respectivement de *Rosa damascena* Mill. (Gantchev et *al.*, 1978 ; H. Baydar et N. Baydar, 2005) et de *Rosa alba* L. (Dobrev et Kovatcheva, 2007). Les auteurs constatent une augmentation du rendement en huile de 50 % pour *Rosa damascena* Mill. et de 130 à 316 % pour *Rosa alba* L. Ils attribuent cette augmentation du rendement au fait que les agents tensioactifs réduisent la tension, d'une part, entre la phase aqueuse et la surface hydrophobe de tissus végétaux et d'autre part, entre l'eau et la phase huileuse. Ils facilitent, en outre, le mouillage de la matière végétale et de ce fait préviennent le dépôt de l'huile sur la surface de celle-ci (Dobrev et Kovatcheva, 2007). En outre, ils préconisent la macération du matériel végétal nécessaire à un meilleur mouillage de la surface de pétale. Enfin, la forte augmentation du rendement en huile de *Rosa alba* L. serait due à l'hydrolyse des glycosides, renfermant des constituants de l'huile essentielle, dont la présence dans cette espèce de rose a été prouvée (Staikov et Zotovitch, 1963).

Enfin, l'hydrodistillation de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L., en provenance du Jardin d'essais d'Alger, a été réalisée en présence de tensioactif non ionique (Charchari S, Boudina N, Benhalla A, 2011; Abdelli M, 2010). Les auteurs ont constaté une augmentation du rendement de l'ordre de 50%. La composition qualitative de l'huile s'est avérée peu affectée par la présence du tensioactif, mais du point de vue quantitatif, des changements significatifs ont été observés.

**I.4.1. Les tensioactifs**

Un tensioactif, ou agent de surface, est un composé qui modifie la tension superficielle entre deux surfaces. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire, qu'elles



présentent deux parties de polarité différente, l'une lipophile, qui retient les matières grasses, est apolaire, l'autre, hydrophile miscible dans l'eau, est polaire.



**Figure I. 5 : Schéma simplifié d'une molécule de tensioactif (Stolzenberg, 1989)**

Il permet ainsi de solubiliser deux phases non miscibles, en interagissant avec l'une apolaire, c'est-à-dire, lipophile, donc hydrophobe, par sa partie hydrophobe; tandis qu'avec l'autre phase qui est polaire, il interagira par sa partie hydrophile.

On distingue quatre types de composés tensioactifs, regroupés selon la nature de la partie hydrophile (Stolzenberg, 1989): anioniques, cationiques, zwitterioniques (amphotères) et non ioniques.

La molécule amphiphile est caractérisée par la présence dans sa structure, de deux parties antagonistes. Cette dualité, à l'origine de l'activité de surface, de la micellisation et des capacités de solubilisation, introduit les diverses applications des amphiphiles. Les propriétés et les applications d'un tensioactif seront fonction de la valeur de sa balance hydrophile-lipophile ou HLB (Tadros, 1994), comme le montre le tableau I.1.

**Tableau I. 2 : Applications des tensioactifs, en fonction de leur HLB (Tadros, 1994)**

HLB	Applications
1,5-3	Antimousse
3-6	Emulsifiant (eau/huile)
7-9	Agent mouillant
8-18	Emulsifiant (huile/eau)
13-16	Détergent
15-18	Solubilisant

Dans cette étude le tensioactif utilisé est un solubilisant, avec une HLB égale à 16,7.

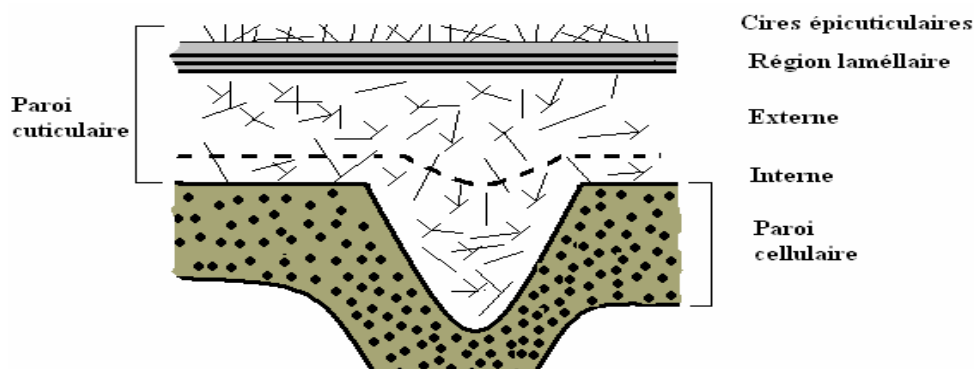
## I.4.2. Les tensioactifs et les membranes végétales

### I.4.2.1. Structure et constitution de la cuticule végétale

L'épiderme des plantes herbacées et des jeunes plantes ligneuses est recouvert de strates lipophiles, appelées cuticule, qui forment un revêtement protecteur, souple, imperméable à l'eau, tout en permettant des échanges gazeux avec le milieu extérieur par des orifices minuscules, appelés stomates.

La cuticule dans son ensemble est constituée de trois parties (Stevens et Baker, 1987), comme montre la figure I.2:

- la cuticule proprement dite, formée de cutine, un biopolyester d'acides et d'alcools gras (Baudrand-Alzieu, 1995) ;
- une couche cuticulaire assurant le lien entre la cuticule et la paroi cellulaire sous jacente;
- un dépôt de cires épicuticulaires, à la surface de la cuticule. Le terme épicuticulaire fait opposition au terme intracuticulaire qui qualifie les cires présentes dans les deux premières parties.



**Figure I. 6 : Structure de la cuticule foliaire (Stevens, Baker, 1987)**

Les cires épicuticulaires forment généralement un film amorphe à la surface de la plante et parfois des structures organisées appelées cristalloïdes, dont le type est relié à la présence prépondérante d'une ou plusieurs familles de composés lipidiques (Baudrand-Alzieu, 1995).

Les cires cuticulaires végétales sont essentiellement constituées de composés aliphatiques que l'on peut répartir schématiquement en deux groupes (Stevens et Baker, 1987):

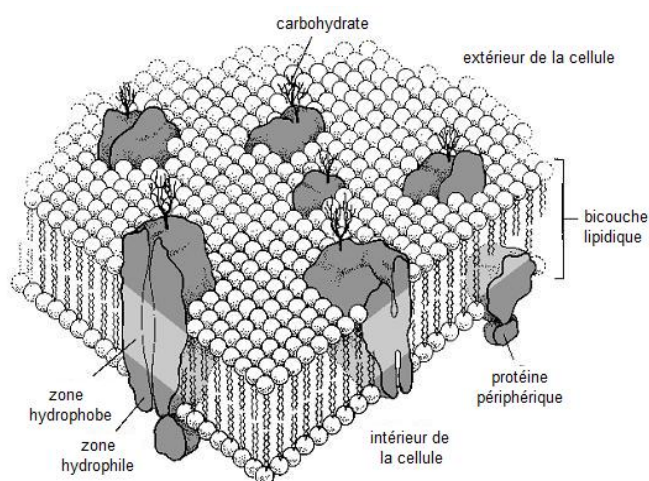
Dans le premier, on y trouve les composés les plus communs de type alcane ( $C_{19}$ - $C_{37}$ ), ester ( $C_{30}$ - $C_{60}$ ), acide ( $C_{12}$ - $C_{36}$ ), alcool primaire ( $C_{12}$ - $C_{36}$ ) et aldéhyde ( $C_{14}$ - $C_{34}$ ).

Le deuxième groupe, en revanche, concerne des composés plus rares comme les cétones ( $C_{25}$ - $C_{33}$ ), les alcools secondaires ( $C_{21}$ - $C_{33}$ ) ou les  $\beta$ -dicétones ( $C_{27}$ - $C_{35}$ ) qui sont le plus souvent majoritaires dans les cires qui en contiennent.

D'autres éléments mineurs, non aliphatiques sont également rencontrés. Il s'agit de composés cycliques ou polycycliques regroupés sous le terme de triterpénoïdes et présents sous forme d'alcool (stérols,  $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin, lupeol, erythrodiol) ou d'acides (ursolique, olénoïque).

Cette diversité dépend de très nombreux facteurs comprenant le type de cire, épi- ou intracuticulaire, la partie de la plante considérée (feuille, tige, fruit...), l'espèce végétale, l'âge, la saison ou encore les conditions agro-climatiques. Par ailleurs, les cires épicuticulaires de feuilles peuvent avoir une composition radicalement différente suivant si elles proviennent de la face abaxiale ou adaxiale.

Quant à la membrane cellulaire, elle est constituée d'une bicouche lipidique, contenant des molécules amphiphiles, telles les phospholipides et les stérols, dans laquelle sont incorporées de nombreuses protéines globulaires qui la traversent et pointent de chaque côté (Figure I.7). La partie transmembranaire de ces protéines est hydrophobe, tandis les parties exposées de chaque côté ont un caractère hydrophile (Reverts, 2006).



**Figure I. 7 : Structure de la membrane cellulaire (Reverts, 2006)**

Comme de nombreux acides gras, les acides laurique ( $C_{12}$ ), myristique ( $C_{14}$ ) et palmitique ( $C_{16}$ ) interviennent dans la composition de la membrane plasmique des cellules.

#### I.4.2.2. Action des tensioactifs sur la cuticule

Les interactions plantes-environnement induit des changements importants de la structure d'édifices supramoléculaires extracellulaires, telles les parois et les cuticules (Marion, 2005).

La zone épicuticulaire de la cutine étant en contact immédiat avec le milieu extérieur, sa nature chimique joue, évidemment, un rôle important dans les phénomènes d'étalement, de mouillage et de la pénétration de l'eau. C'est une surface hydrophobe, ce qui entraîne un mauvais mouillage avec l'eau, mais un bon mouillage avec des solutions aqueuses contenant des agents tensioactifs convenablement choisis (Chamel *et al.*, 1991).

Il a été montré, en outre, que la pénétration de la cuticule par la solution aqueuse de tensioactif est d'autant plus importante que la tension superficielle de la solution est petite. Il est permis, alors, d'admettre que le tensioactif solubilise les constituants des cires épicuticulaires et « ouvre la voie » à l'eau pour pénétrer les cellules végétales.

Bien que le principe de la solubilisation sélective par les tensioactifs des cires épicuticulaires ne soit pas bien élucidé, un mécanisme a été avancé: (Tamura *et al.*, 2002).

- étape d'adsorption: à l'interface entre la feuille et la solution aqueuse du tensioactif, ce dernier « reconnaît » la portion soluble de la cire épicuticulaire et interagit par sa partie hydrophobe avec les constituants hydrophobes;
- étape de réorganisation: certaines propriétés physiques des cires sont altérées et conduisent à un affaiblissement de la barrière diffusionnelle;
- phase de pénétration: la solution pénètre les tissus végétaux, suite à la miscellisation de la cire épicuticulaire

Des observations des interactions entre un tensioactif nonionique et la surface d'une bicouche lipidique, menées par microscopie électronique (Tamura *et al.*, 2002), présentées sur la figure I.8 montrent les étapes de la solubilisation des lipides par le tensioactif.

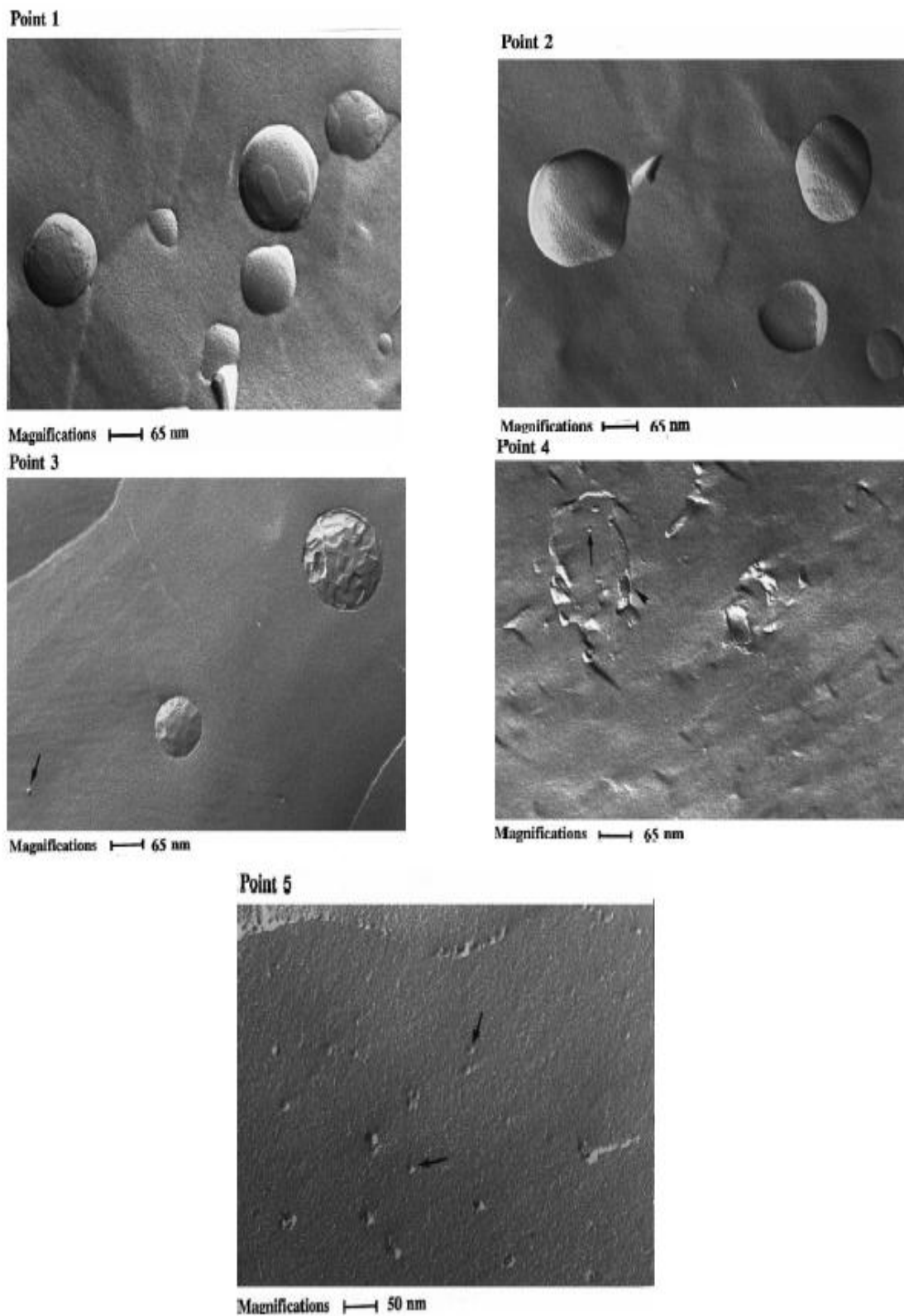
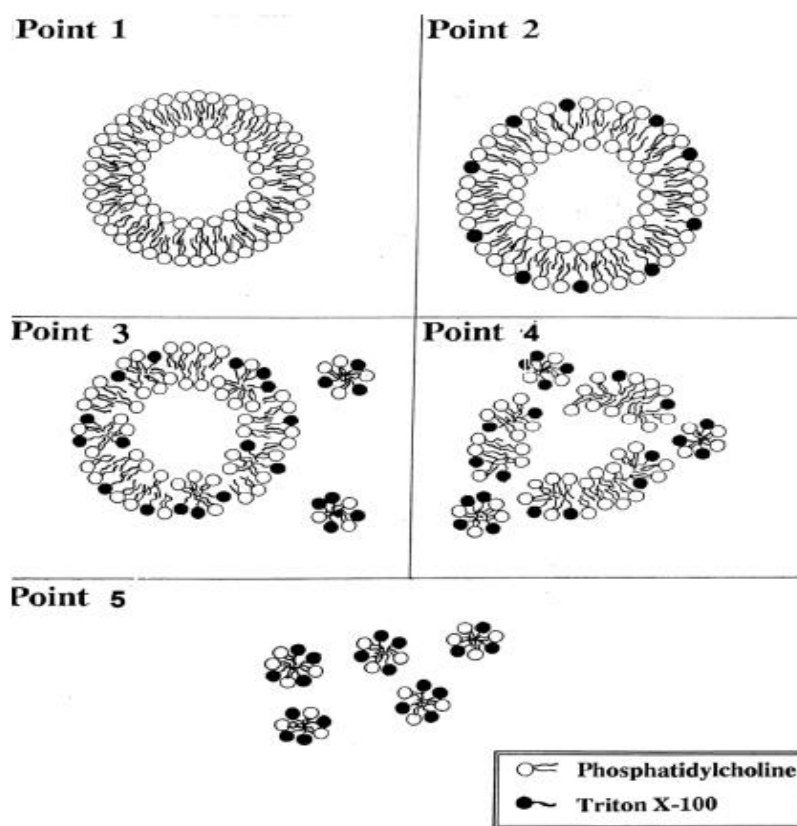


Figure I. 8 : Interactions séquentielles tensioactif-bicouche lipidique observées par microscopie électronique (Tamura *et al.*, 2002)

Ces étapes sont schématisées sur la figure I.9 suivante.



**Figure I. 9 : tensioactif – bicouche lipidique et formation des micelles**

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

Lorsque les molécules du tensioactif sont mises en contact avec la bicouche lipidique, ils pénètrent dans celle-ci (point 2). Des micelles mixtes commencent à se former et après le détachement de certaines d'entre elles, des perforations apparaissent dans la bicouche lipidique (point 3). Enfin, le nombre des micelles détachés augmente de plus en plus (Point 4) jusqu'à la dissolution complète de la bicouche lipidique par le tensioactif (Point 5).

D'autre part, les protéines cuticulaires sont aussi capables de fixer toute sorte de molécules, tels les tensioactifs, sans apparente spécificité. La couche protéique peut être modifiée en présence de molécules du tensioactif de faible poids moléculaire. En fonction de la nature des espèces, les interactions entre protéines et tensioactifs peuvent produire un renforcement ou un affaiblissement mécanique de l'interface (Chen et Dickinson, 1995; Krägel et *al.*, 1999).

## **I.5. Les antioxydants**

L'oxygène moléculaire est indispensable à la vie des organismes aérobiques. Toutefois il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces oxygénées réactives (EOR).

Aux doses faibles, ces espèces sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques. Aux doses excessives, elles deviennent néfastes ou toxiques pour l'organisme. La surproduction des espèces oxygénées réactives au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant (Favier, 2003).

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre la production des espèces oxygénées réactives et les systèmes de défenses antioxydantes, en faveur des premières. Il est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies. Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/ antioxydant.

### **I.5.1. Définition d'un radical libre**

Un radical libre est une espèce, atome ou molécule, contenant un électron célibataire ou (on apparié), ce qui le rend extrêmement réactif (Gutteridge et Halliwell, 1994).

Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'un électron à partir d'un composé non radical (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

### **I.5.2. Définition d'un antioxydant**

Un antioxydant est défini comme étant toute substance présente en faible concentration par rapport à un substrat oxydable et qui est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation de ce substrat (Favier, 2003).

L'utilisation et le sens du terme antioxydant dépend de la discipline scientifique : par exemple, en nutrition, les antioxydants peuvent être définis comme étant toute substance capable de inhiber, retarder ou empêcher le développement des rances ou autres saveurs désagréables dues à l'oxydation (Pokorny et *al.*, 2001).

Selon (Moll et Moll, 1998), ce sont des substances intervenant dans les processus d'oxydation des produits alimentaires dans le but d'empêcher ou freiner l'action de l'oxygène moléculaire.

### **I.5.3. Application des antioxydants**

Les applications commerciales des antioxydants incluent l'utilisation dans les viandes transformées et de la volaille, les vinaigrettes, assaisonnements, les noix, les bases de soupe, graisses et huiles comestibles, les aliments naturels, les aliments pour animaux de compagnie et dans les emballages. En plus des aliments, les antioxydants ont été utilisés dans des préparations médicinales ou pharmaceutiques. L'objectif principal dans chacun de ces applications est de prévenir la détérioration des caractéristiques du produit souhaitables par inhibition de l'oxydation.

Plus récemment, des antioxydants dans les sources alimentaires et suppléments diététiques ont reçu une attention pour leur capacité à prévenir ou retarder l'apparition de certains cancers et d'autres problèmes de santé chroniques comme les maladies cardiaques, cataractes, et le vieillissement. En prévenant l'oxydation, ces substances inhibent la formation d'oxygène contenu dans les radicaux qui sont censés jouer un rôle significatif dans l'initiation de ces conditions et d'autres troubles chroniques.

L'application des antioxydants dans ces domaines prometteurs en plein développement conduit à des recherches de plus en plus nombreuses, destinées à diversifier les ressources en substances naturelles et à améliorer leurs voies de récupération et de purification.

### **I.5.4. Classification des antioxydants**

#### **I.5.4.1. 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. Ce sont pour la plus part des composés polyphénoliques, parmi ces composés, les plus importants sont les flavonoïdes, les tocophérols et les acides phénoliques. Les tocophérols sont des antioxydants très connus et largement utilisés (Pokorny et *al.*, 2001).

#### **Les caroténoïdes**

Les caroténoïdes, pigment rouges (lycopène de la tomate), oranges ( $\beta$ -carotène des carottes) ou jaune (lutéine et zéaxanthine ou maïs) d'origine végétale, sont particulièrement efficaces



dans la neutralisation de l'oxygène singulet et joue le rôle de bouclier contre la photoinitiation de réactions radicalaires par les rayonnements UV. Le  $\beta$ -carotène (provitamine A), diffusant mieux que les tocophérols dans les lipides, protège les graisses profondes (Cohen, 2002).

### **Vitamine C (acide ascorbique)**

La vitamine 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. Selon le pH et la présence de métaux de transition, la vitamine C peut perdre une forme réduite ou oxydante. Le passage de l'une à l'autre se fait par l'intermédiaire d'un radical libre, radical ascorbyle, et en présence de glutathion/ glutathion-réductase. La vitamine C forme donc un couple rédox avec une forme intermédiaire radicalaire capable de capter l'oxygène singulet et certaines espèces radicalaires (Pokorny et *al.*, 2000).

### **Vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol)**

C'est une molécule liposoluble qui protège les graisses circulantes contre l'oxydation, ce qui constitue la première défense contre l'athérosclérose et en fait un protecteur cardiovasculaire. Elle limite également la formation d'aldéhydes génotoxiques. Elle 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 (Cohen, 2002).

### **Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, romarin, origan et thym possèdent des puissants composés antioxydants (Edris, 2007). Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les plus actifs. 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 (Braga et *al.*, 2006).

### **Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des métabolites dits « secondaires », ce qui signifie qu'elles n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétale, comme la croissance ou la reproduction. Ils sont présents dans tous les organes de la plante (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

Ces métabolites regroupent une grande variété de composés comprenant, entre autres, les flavonoïdes, les anthocyanes et les tannins qui peuvent agir comme des antioxydants par piégeage des radicaux libres.

Parmi les extraits naturels, susceptibles d'être utilisés industriellement, les extraits de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) possèdent une activité antioxydante caractérisée par la capacité à inhiber les radicaux libres (Varreltzis et *al.*, 1997). Les molécules responsables de cette activité sont des acides phénoliques, en l'occurrence, les acides carnosique, romarinique et le carnosol, un  $\gamma$ -lactone phénolique.

#### I.5.4.2. Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants de synthèse habituellement utilisés sont les composés phénoliques comme le Butyl Hydroxy Anisole (BHA), Butyl Hydroxy Toluène (BHT) et le Ter- Butyl Hydroxy-quinone (TBHQ), et les esters de l'acide gallique. (Pokorny et *al.*, 2001).

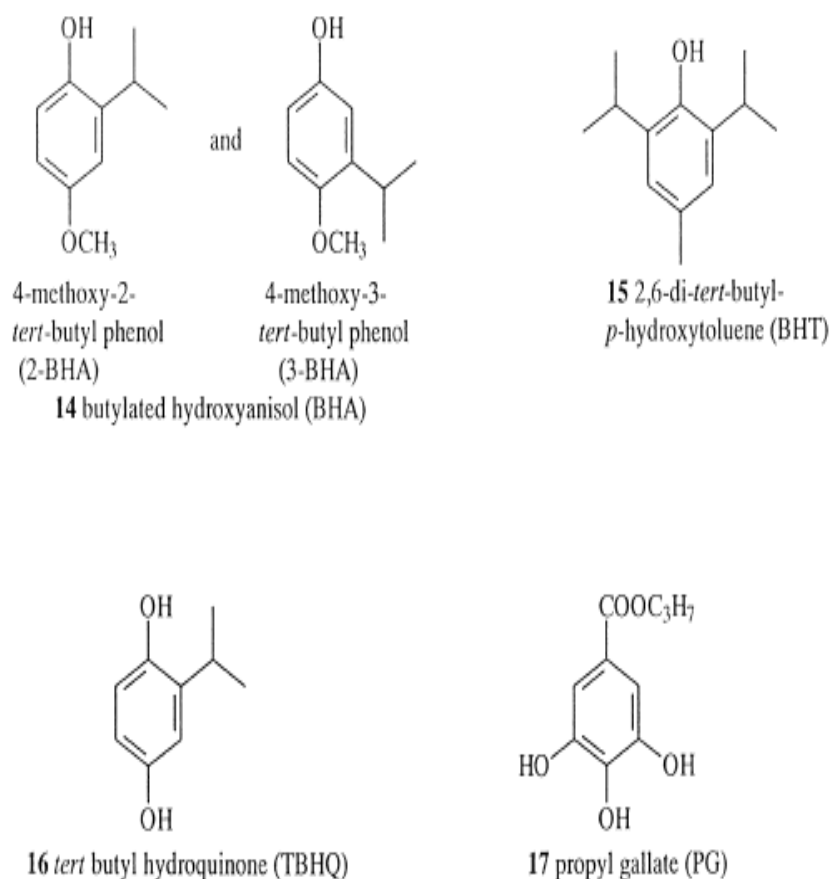


Figure I. 10 : Antioxydants de synthèse (Pokorny et *al.*, 2001)

**I.5.5. Le mécanisme d'action des antioxydants**

Le processus d'oxydation est de type radicalaire : les antioxydants vont intervenir comme « capteurs » de radicaux libres. En effet certains antioxydants de type phénolique réagissent selon un mécanisme proposé par (Sherwin, 1976) décrit comme suit : l'antioxydant cède formellement un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un intermédiaire radical stabilisé par ses structures mésomères conjuguées.

**I.5.6. 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).

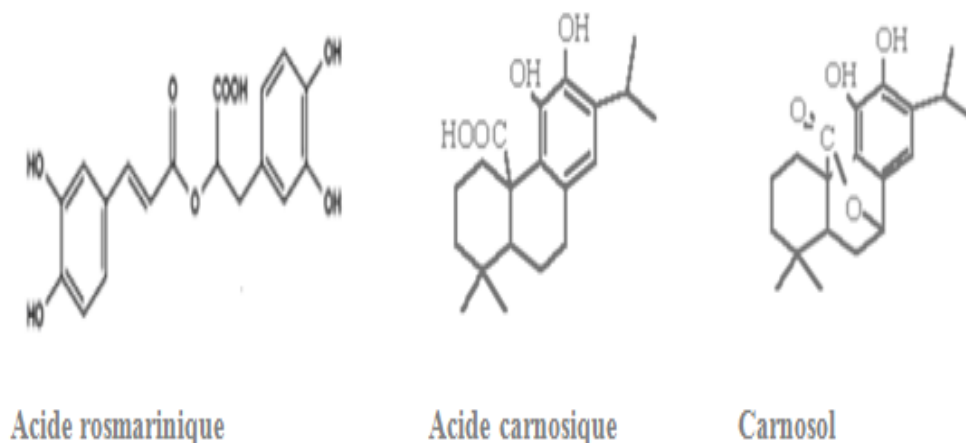
Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) appartenant à cette famille, possède une activité antioxydante caractérisée par la capacité à inhiber les radicaux libres (Vareltzis et al., 1997). On dit que ses extraits sont très efficaces pour retarder l'oxydation des lipides et pour protéger les cellules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

L'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. En fait, ces propriétés, on les connaissait depuis longtemps puisque, avant l'avènement du réfrigérateur, on s'en servait pour conserver la viande, mais l'odeur et la saveur fortement aromatiques de la plante ne permettaient de l'utiliser que dans quelques rares mets avec lesquels elle est compatible. Ceci a changé dans les années 90 lorsqu'on a réussi à extraire ses principes antioxydants sans son huile volatile. En théorie, on peut donc l'utiliser en remplacement des contestés et contestables BHT et BHA. En théorie seulement, puisque l'extrait n'est toujours pas approuvé par les autorités américaines ou canadiennes. (Site web [2]).

Par contre, les extraits de romarin ont obtenu, en 2010, l'approbation finale de l'Union Européenne pour leur emploi en tant qu'antioxydant dans les aliments. Selon les nouvelles directives 2010/67/EU et 2010/69/EU publiées au journal officiel de la Commission européenne, les extraits de romarin sont désormais inscrits dans la liste des antioxydants alimentaires approuvés par l'Union Européenne. Ils peuvent donc être officiellement utilisés pour améliorer la conservation des produits alimentaires. La directive 2010/67/EU établit les critères de pureté des extraits de romarin, et la directive 2010/69/EU établit la liste des applications dans lesquelles ils sont autorisés. Cette liste comprend de nombreux produits alimentaires dont les graisses, les huiles, les arômes, les produits carnés, les snacks, les sauces, les pommes de terres déshydratées, les compléments alimentaires. (Site web [3]).

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 antioxydantes du romarin sont principalement dues à l'acide carnosique, à l'acide rosmarinique et au carnosol (Cuvelier *et al.*, 1996, RICHHEIMER *et al.*, 1996).



**Figure I. 11 : Structures de l'acide rosmarinique, acide carnosique et le carnosol (Cuvelier, *et al.*, 1996 ; Penchev, 2010)**

Selon Aruoma *et al.* (1992), l'activité antioxydante des extraits de romarin est due à plus de 90% à l'acide carnosique et au carnosol.

La directive 2010/69/EU établit des règles de dosages des extraits de romarin dans les applications alimentaires qui ne sont pas fondées sur l'apport total en extrait de romarin mais sur l'apport en acide carnosique et carnosol, qui sont les deux principaux composés responsables de l'activité antioxydante du romarin. Cette nouvelle donne oblige les producteurs d'extraits de romarin à garantir les teneurs en actifs de leurs produits. (Site web [3])

### **I.5.7. Détermination de l'activité antioxydante**

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO• par la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Ricardo da Silva et al., 1991); FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) (Benzie et al., 1996) ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Re et al. 1999), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) (Sharma et al., 2009).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diverse des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être 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 antioxydante de l'échantillon à tester (Tabart et al., 2009 ; de Gaulejac 1999; Hua et al., 2008).

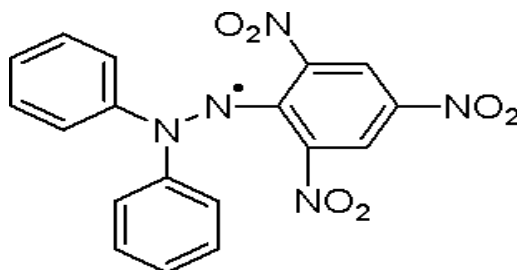
De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH est recommandé pour des composés contenant des groupements SH-, NH- et OH- (Salah et al., 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

#### **I.5.7.1. Principe de la réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant**

La capacité de céder de l'hydrogène par les antioxydants, est mis en évidence par une méthode spectrophotométrique en suivant la disparition de la couleur d'une solution alcoolique contenant le radical libre DPPH (2-2-Diphényl-1-picrylhydrazyle)

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques

(Blois 1958 ; Brand-Williams et *al.*, 1995). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Figure II.9). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, c'est-à-dire, le radical DPPH<sup>•</sup> reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

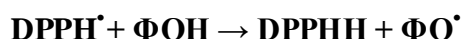


**Figure I. 12 : Structure chimique du radical libre DPPH<sup>•</sup> (2,2 DiPhenyl-1-Pikryl-Hydrazyle)**

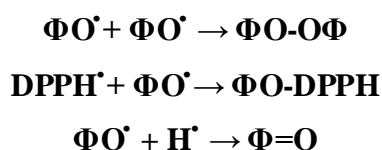
Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanisme:

- (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 ( $\Phi$ -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.*, 1998):



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



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 réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier (Molyneux, 2004).

### I.5.7.2. Evaluation du potentiel anti-radicalaire

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, deux approches sont appliquées: d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction (Sanchez-Moreno et *al.*, 1998 ; Scherer et Godoy, 2009).

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire ou pourcentage d'inhibition, où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t :

Le pourcentage d'inhibition (I%) est calculé selon la formule suivante :

$$I (\%) = [(A_{DPPH} - A_{éch.}) / A_{DPPH}] * 100 \quad (I.1)$$

Avec :

- $A_{DPPH}$  Absorbance du DPPH
- $A_{éch.}$  Absorbance de l'échantillon

Le pourcentage d'inhibition I(%) témoigne seulement de la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatifs (Sanchez-Moreno et *al.*, 1998)

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox<sup>®</sup> (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).

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration inhibitrice  $IC_{50}$  (ou l'inverse  $1/IC_{50}$ ) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa  $IC_{50}$  est petite. L'indice  $IC_{50}$  montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH avec 50% (exprimée en mol Antioxydant/mol DPPH ou mg Antioxydant/g DPPH), mais ne prennent pas en considération l'influence de la concentration sur le temps de la réaction (Sanchez-Moreno et *al.*, 1998).



## *Chapitre II:*

### *Matériels et méthodes*

## **II.1. Matière végétale utilisée**

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. Les parties de la plante utilisées sont les sommités aériennes constituées des feuilles et des tiges. La récolte a été effectuée en période de floraison, au début du mois de Mars, en période de post-floraison, au début du mois d'Avril et en période de croissance, au début du mois de Mai 2012. Chacun de ces lots a été stocké à la température ambiante.

### **II.1. 1. Echantillonnage**

L'utilisation des échantillons représentatifs d'un lot mère de matière végétale, est indispensable, car les feuilles et les tiges se répartissent d'une manière aléatoire lors de son conditionnement.

Un échantillonnage, a été effectué pour chacun des trois lots de la matière végétale utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle, visant la préparation des échantillons représentatifs du lot mère, ayant les mêmes propriétés moyennes. 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 méthode d'usage 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 ;
- 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.1.2. Détermination du taux d'humidité**

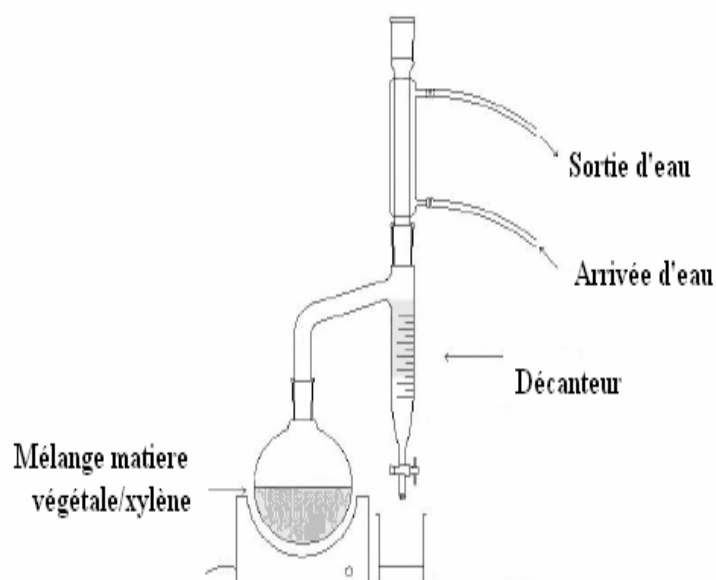
Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé, avant chaque manipulation, par distillation azéotropique au xylène, dans un appareil de Dean et Stark (figure II.1),

afin d'exprimer le rendement en huile essentielle par rapport à la masse de la matière végétale sèche. Ceci permettra la comparaison des rendements en huile essentielle, obtenus par différents essais, sur la même base.

La détermination du taux d'humidité a été réalisée suivant le protocole expérimental suivant. Une masse de matière végétale, pesée avec précision  $10^{-4}$  g, est introduite dans le ballon et immergée dans du xylène. Le mélange est porté à ébullition et les vapeurs contenant l'eau et le solvant montent jusqu'au réfrigérant et, une fois liquéfiées, sont recueillies dans le tube gradué. A l'intérieur de celui-ci ces liquides non miscibles se séparent en deux phases.

Lorsque la phase supérieure, dans notre cas le xylène, atteint le niveau du bras, elle s'écoule dans celui-ci 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 n'augmente plus. Le volume d'eau et la température ambiante sont mesurés avec précision, après une séparation complète des deux phases.



**Figure II. 1 : Appareil de Dean et Stark**  
(Site web[4]: [http://fr.wikipedia.org/wiki/Appareil\\_de\\_Dean\\_Stark](http://fr.wikipedia.org/wiki/Appareil_de_Dean_Stark).)

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

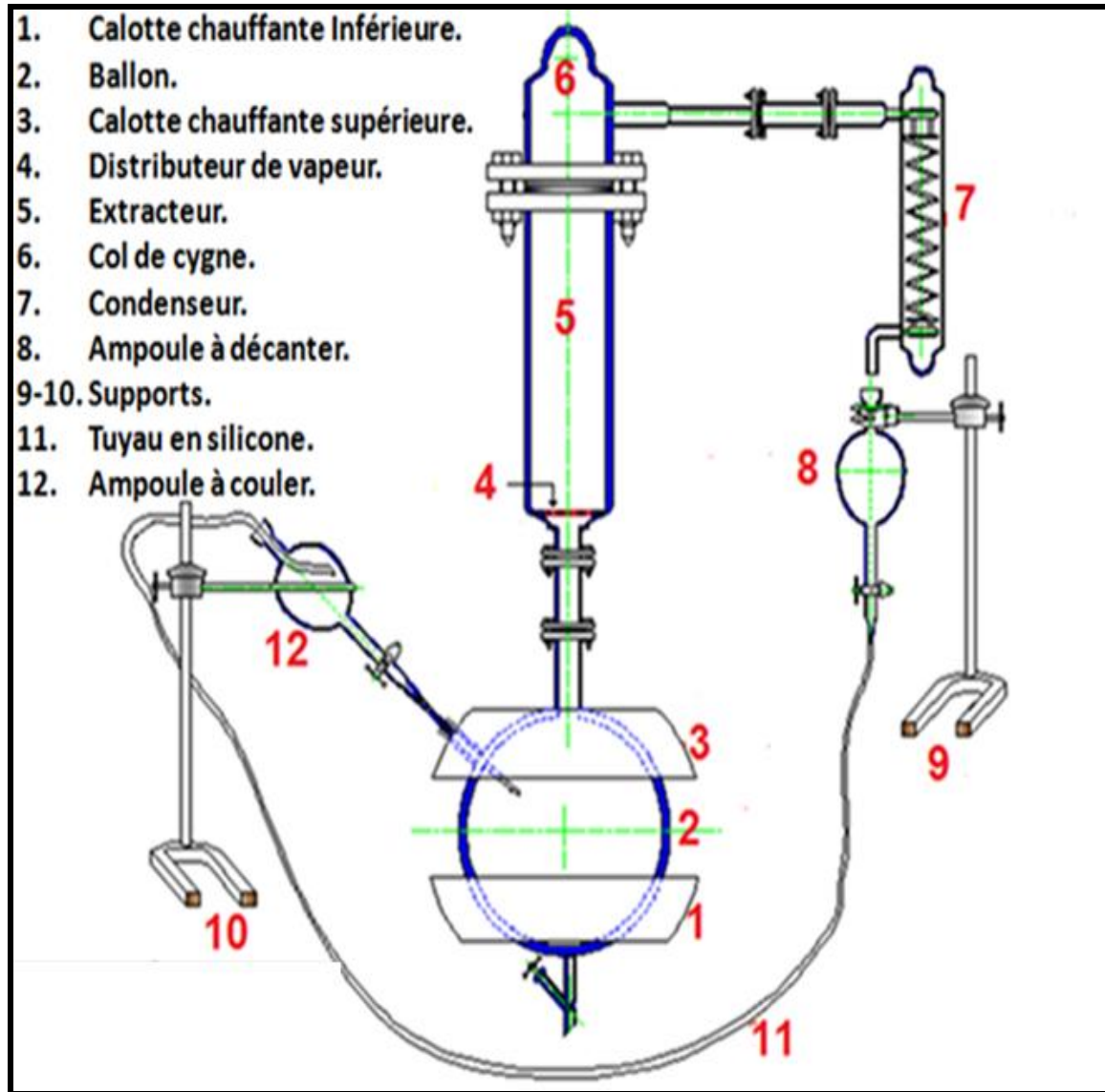
$$H = (V_{\text{eau}} * \rho_{\text{eau}}) * 100 / M \quad (\text{II.1})$$

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

## **II.2. Dispositifs expérimentaux d'extraction**

### **II.2.1. L'installation et protocole expérimental de l'entraînement à la vapeur d'eau**

Nous avons mené nos essais d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. sur une installation d'extraction solide/fluide à échelle semi-pilote, conçue (Tifaoui, Si Mehand, 2007) et réalisée (Bouhouné Ali, Laoufi 2010) au Département du Génie chimique de l'Ecole Nationale Polytechnique. Cette installation a été réalisée avec des éléments de récupération en verre spécial (EIVS). L'installation est schématisée sur la figure II.2 suivante.



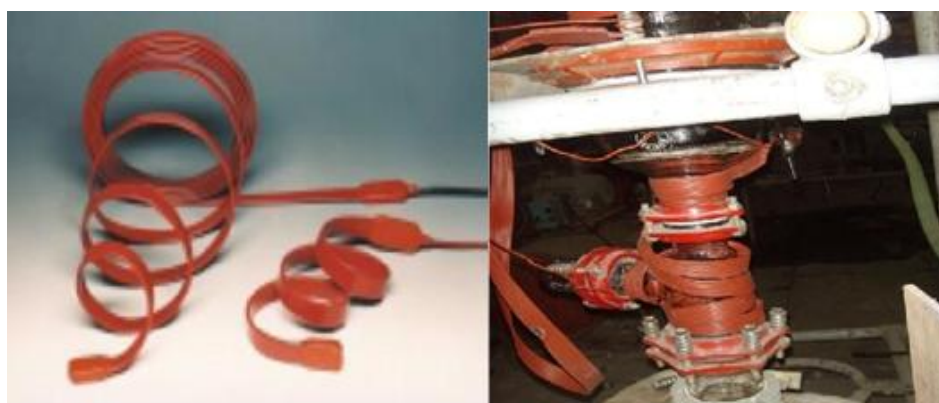
**Figure II. 2 : Schéma de l'installation d'extraction de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. par entraînement à la vapeur d'eau (Arab, Beddar, 2011)**

Cette installation est constituée d'une chaudière génératrice de vapeur, d'un extracteur, d'un condenseur, d'un décanteur et d'un système de cohobage.

La chaudière génératrice de vapeur est un ballon de capacité de 20 L. Il est surmonté, à sa partie centrale supérieure, d'une sortie de vapeur cylindrique. La partie inférieure du ballon se termine par une conduite, de forme cylindrique, munie d'un robinet servant à l'alimentation en eau et le vidange de la chaudière. La partie supérieure latérale du ballon comporte une conduite, permettant le cohobage. Le chauffage est assuré par deux calottes chauffantes, couvrant la partie supérieure et inférieure du ballon.

L'extracteur est constitué d'un cylindre et deux cloches, l'une fixée sur la partie inférieure et l'autre, sur la partie supérieure du cylindre. La cloche inférieure est reliée au col central du ballon-chaudière. La cloche supérieure, ou le col du cygne, est amovible et permet d'introduire la matière végétale dans l'extracteur. Elle a une conduite latérale, servant à l'évacuation des vapeurs ascendantes. Le flux de vapeur, généré dans le ballon-chaudière, passe dans l'extracteur à travers un distributeur de vapeur en téflon qui joue, aussi, le rôle de support de la matière végétale. L'étanchéité de l'assemblage des différentes parties de l'extracteur est assurée par des joints en téflon.

Le chauffage de l'extracteur et de la conduite à vapeur située au-dessous de l'extracteur, est réalisé à l'aide de deux rubans chauffants (Figure II.3), enveloppant, en partie, le corps de l'extracteur et la conduite à vapeur. Par conséquent l'utilisation de ces rubans permet de varier le débit de vapeur d'eau en évitant la condensation des vapeurs.



**Figure II. 3 : Ruban chauffant**

Le condenseur est tubulaire à serpentín, constitué de deux tubes enroulés. Les vapeurs venant de l'extracteur sont envoyées dans le serpentín, alors que l'eau de refroidissement circule entre le serpentín et les parois du condenseur.

Une ampoule à décanter, de capacité 250 ml, a été utilisée comme vase florentin pour la séparation des deux phases, huile essentielle et eau, issues de l'entraînement à la vapeur d'eau. Le principe de décantation est basé sur la différence des densités et l'immiscibilité des huiles essentielles et l'eau (Koller, 2001).

Pour assurer le retour des eaux de distillation dans le ballon-chaudière, celle-ci a été relié, par un tuyau en silicone, à une ampoule à couler. Cette dernière est fixée sur le

col latéral du ballon à l'aide d'un réducteur rodé, se terminant par un tube incliné, pour éviter le contact avec les parois du ballon et, par conséquent, le choc thermique entre les eaux de distillation froides venant du décanteur et les parois chaudes du ballon. L'extrémité du tube, par lequel les eaux de distillation s'écoulent, est située au dessus du niveau d'eau. La dénivellation des deux ampoules permet l'évacuation en continu de l'eau du décanteur. Les débits d'écoulement d'eau sont réglés à l'aide des robinets des deux ampoules.

L'extraction, par entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle semi pilote, de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L., avec et sans tensioactif, a été réalisée selon un protocole établi sur la base des travaux antérieurs. (Abdelli M, 2010 ; Charchari et al., 2011 ; et Bouhoun Ali, Laoufi, 2010)

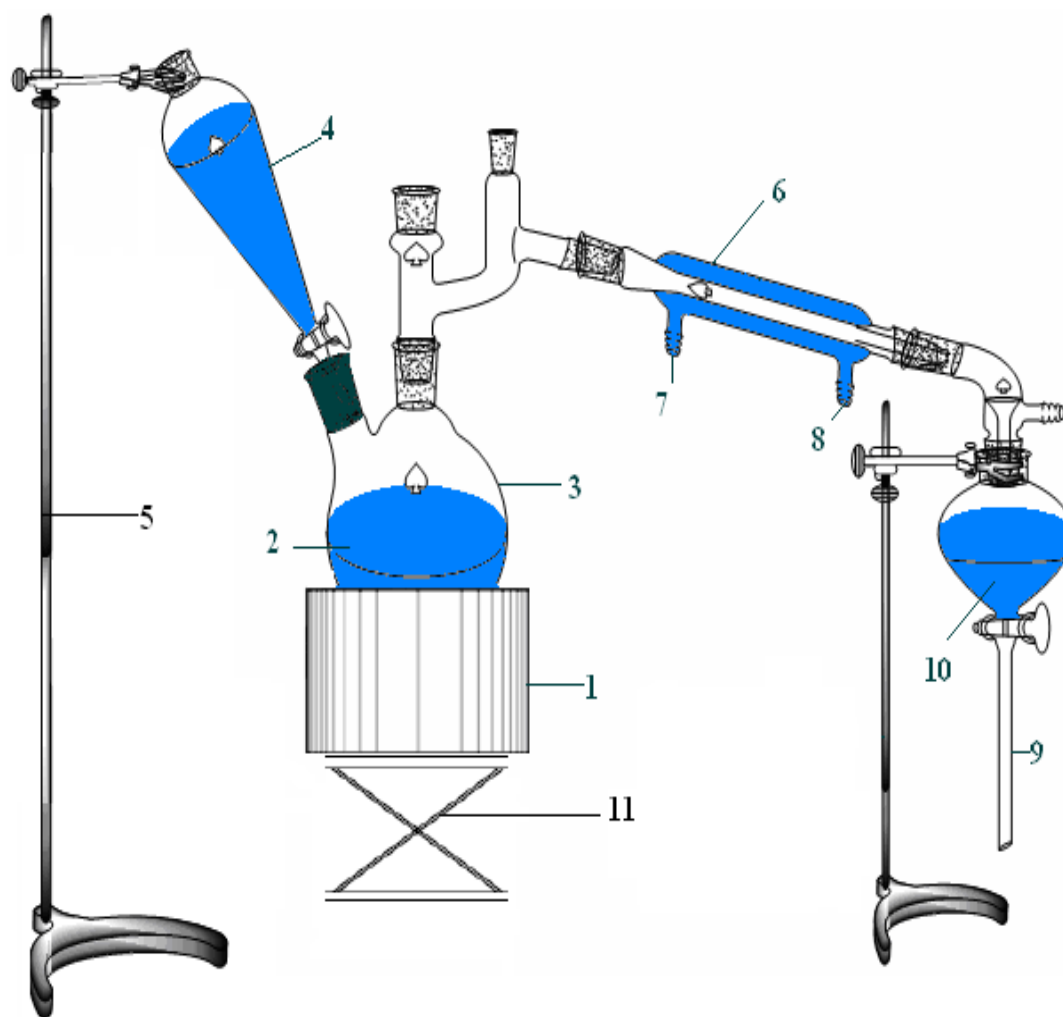
Dans le cas d'extraction sans tensioactif, l'échantillon représentatif de matière végétale, préalablement pesé, est introduit dans l'extracteur et subit un entraînement à la vapeur d'eau avec cohobage, pendant 2 heures. Au cours de l'extraction, le débit de vapeur est contrôlé, en mesurant le volume des eaux de distillation, récupéré dans le décanteur, en unité de temps.

Dans le cas d'extraction avec tensioactif, la matière végétale est préalablement immergée dans un volume précis de solution aqueuse de tensioactif de concentration connue et macérée pendant 24 heures. Elle est ensuite introduite dans l'extracteur et soumise à l'entraînement à la vapeur d'eau.

L'huile essentielle est séparée des eaux de distillation par décantation et pesée. Le rendement en huile est exprimé, en pourcentage, par rapport à la masse de la matière végétale sèche.

### **II.2.2. Dispositif et protocole expérimental de l'hydrodistillation**

Les essais d'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. ont été effectués à l'échelle laboratoire. Le dispositif expérimental est schématisé à la figure II.4 suivante.



**Figure II. 4 : Dispositif expérimental d'hydrodistillation à l'échelle laboratoire**

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| 1 : Chauffe ballon.               | 7 : Sortie de l'eau de refroidissement.       |
| 2 : Mélange eau/matière végétale. | 8 : Entrée de l'eau de refroidissement.       |
| 3 : Ballon.                       | 9 : Ampoule à décanner, récipient de recette. |
| 4 : Ampoule à couler.             | 10 : Distillat.                               |
| 5 : Support.                      | 11 : Support élévateur.                       |
| 6 : Réfrigérant.                  |   |

Il est constitué d'un ballon de 6 litres, dans lequel la matière végétale baigne dans l'eau. La source de chaleur est un chauffe-ballon à puissance de chauffe variable. Le ballon est surmonté d'un réfrigérant où les vapeurs d'eau et d'huile essentielle sont refroidies et condensées. Le distillat est récupéré dans une recette.



Pour récupérer l'huile solubilisée dans les eaux de distillation et maintenir le niveau d'eau dans le ballon constant, les eaux de distillation, recueillies dans l'ampoule à décanter sont envoyées dans le ballon à l'aide de l'ampoule à couler (cohobage).

Le protocole expérimental suivant a été adopté lors des essais d'extraction par hydrodistillation.

La matière végétale, constituée des feuilles et des tiges de *Rosmarinus officinalis* L., préalablement pesée, est mise en contact avec l'eau ou avec la solution aqueuse de tensioactif utilisé.

Le rapport volume d'eau/masse de matière végétale de 16,8, correspondant au rapport minimal permettant d'immerger la matière végétale dans le liquide, a été utilisé.

L'ensemble est porté à l'ébullition à pression atmosphérique. Le débit de vapeur de  $17,5 \pm 0,1$  mL/mn, en moyenne, correspondant à la puissance maximale de chauffe, est maintenu constant pendant toute la durée d'extraction.

Les vapeurs sont condensées dans le réfrigérant et les eaux de distillation sont ensuite réintroduites dans le ballon, afin de récupérer l'huile essentielle dissoute et de maintenir le rapport volume d'eau /masse de matière végétale à son niveau initial.

La durée de l'hydrodistillation a été fixée à 2 heures 30 minutes, en se basant sur les résultats d'une étude antérieure relative à la cinétique d'extraction du romarin provenant du même lot. (Abdelli, 2010)

A la fin de l'opération le mélange eau-huile est récupéré dans le récipient de recette. L'huile est séparée des eaux de distillation par décantation. La masse d'huile récupérée est déterminée par pesée. Le rendement en huile est exprimé, en pourcents, par rapport à la masse de matière sèche (II.2):

$$R_{HE} = 100. m_{HE}/M_S \quad (II.2)$$

Où par  $R_{HE}$  est désigné le rendement en huile essentielle, exprimé en pourcents ;  $m_{HE}$  et  $M_S$  sont les masses, en grammes, de l'huile essentielle et de la matière végétale sèche.

### II.2.3. Réactifs utilisés

- **Tensioactif**

Lors de l'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., nous avons utilisé un tensioactif non ionique, dont ces propriétés physico-chimiques sont résumées dans le tableau II.1 suivant :

**Tableau II. 1 : Propriétés physico-chimiques du tensioactif utilisé**

<b>Aspect</b>	<b>Liquide visqueux claire de couleur jaune à jaune vert</b>
<b>Masse volumique</b>	<b>1,1 g/ml</b>
<b>Température d'ébullition</b>	<b>100°C</b>
<b>H.L.B</b>	<b>&gt;16</b>
<b>CMC*</b>	<b>8,04.10<sup>-5</sup>M</b>

\*Concentration micellaire critique

Le choix du tensioactif utilisé a été justifiée par le fait qu'il ne présente ni toxicité, ni caractère irritant. Il est peu coûteux, sans goût et sans odeur, parfaitement soluble dans l'eau et complètement biodégradable en aérobiose et en anaérobiose. Grâce à ces qualités il est utilisé en microbiologie et en industrie alimentaire.

En se basant sur les résultats des travaux antérieurs (Charchari, Boudina et Benhalla., 2011), nous avons fixé :

- la concentration des solutions aqueuses de tensioactifs utilisées à 5g/L;
- la durée de macération de la matière végétale dans la solution de tensioactif, préalable à l'hydrodistillation, à 24 heures;
- **Méthanol** (99,7%, Sigma Aldrich)
- **Réactif de Folin-Denis** (Merck)
- **Acide gallique** (99,5%, Sigma)
- **Acide ascorbique** (PA, Panreac)
- **Acide tannique** (purissimum, Panreac)
- **2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH** (Aldrich)

## II.3. Méthodes d'analyse

### II.3.1. Dosage des composés phénoliques des eaux de distillation par la méthode de Folin-Denis

La teneur en composés phénoliques a été évaluée selon la méthode colorimétrique de Folin-Denis, décrite par JIAO et al. (2005), en utilisant l'acide gallique comme standard. Le réactif de Folin-Denis est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés.

#### II.3.1.1. Mode opératoire

Un volume de 0,2mL de la solution de 0,5 mL des eaux de distillation, diluées dans 20mL d'eau, est prélevé dans une fiole de 50 mL, contenant 25 mL de l'eau distillée, puis 2,5 mL de réactif Folin-Denis sont ajoutés. Après 3 minutes, 2,5mL d'une solution saturée de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) sont ajoutés et le contenu de la fiole est complété jusqu'au jauge avec de l'eau distillée et conservée à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 20 minutes. L'absorbance de la solution est ensuite mesurée à 760 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS Secomam S250.

La même procédure est appliquée, lors d'établissement d'une courbe d'étalonnage, donnant l'évolution de l'absorbance, en fonction de la concentration en acide gallique. Ainsi, la concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et est exprimée en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'extrait sec, contenu dans 1 ml des eaux de distillation.

#### II.3.1.2. Masse des antioxydants dans les eaux de distillation lors de l'hydrodistillation de 100 grammes de plante sèche

La masse des composés phénoliques, ou des antioxydants,  $M_{AO}$ , dans les eaux de distillation lors de l'hydrodistillation de 100 grammes de matière végétale sèche, exprimé en g EAG /100g, est calculée par l'expression II.3 suivante.

$$M_{AO} = 100.V. F_d. C_{AO} / M_S \quad (II.3)$$

Dans cette expression, V est le volume des eaux de distillation, en mL et  $C_{AO}$ , la concentration des composés phénoliques dans les eaux de distillation, exprimée en g EAG/mL. Par  $M_S$  est désignée la masse de la matière végétale sèche, en grammes et par  $F_d$ , le facteur, tenant compte de la dilution des eaux de distillation dans l'échantillon à doser.

### **II.3.1.3. Teneur en antioxydants dans l'extrait sec**

Pour déterminer la teneur en antioxydants dans l'extrait sec, 1 ml des eaux de distillation est prélevé et séché dans l'étuve à 40°C jusqu'au poids constant.

La teneur en antioxydants, exprimée en %, est calculée par la formule II.4 suivante :

$$T_{AO}(\%) = 100 \cdot (m \text{ EAG} / m \text{ ES}) \quad (\text{II.4})$$

où m EAG est la masse des composés phénoliques, exprimée en grammes équivalent d'acide gallique et m ES, la masse, en grammes de l'extrait sec.

### **II.3.2. Détermination du pourcentage d'inhibition**

La solution de DPPH à 40 µg/ml (0,004 mg dans 100 ml de méthanol) est préparée à l'avance et elle ne se conserve pas plus de 4-5 jours à -5°C et à l'obscurité. Des solutions méthanoliques des eaux de distillation, récupérées lors de l'hydrodistillation du romarin, en absence et en présence du tensioactif, de différentes concentrations en extrait sec, et des solutions dans le méthanol, des acides ascorbique, gallique et tannique, de concentration 25 µg/mL sont préparées. Un volume de 3 ml de la solution à tester est mélangé avec 1 ml de la solution du DPPH (absorbance autour de  $1 \pm 0,002$  à 515 nm). Le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 10 secondes. Le contenu est ensuite transféré dans la cellule du spectrophotomètre, puis incubé dans le compartiment pendant le temps nécessaire. L'absorbance à 515 nm est enregistrée (contre le méthanol) UV-VIS Secomam S250.

Pour certains essais le rapport des volumes de DPPH et de la solution a été fixé à 1:1 et l'absorbance a été enregistrée après 5 minutes de contact entre les deux solutions.

Le pourcentage d'inhibition (I%) est calculé selon la formule (I.1).

### II.3.3. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC<sub>50</sub>)

#### II.3.3.1. IC<sub>50</sub> exprimée en µg d'antioxydant par mL de solution

La concentration inhibitrice, qui correspond à une réduction de 50% de l'absorbance du DPPH dans le milieu réactionnel, exprimée en microgrammes d'antioxydant par millilitre de solution, a été déterminée à partir des équations des courbes  $I=f(C)$ , donnant l'évolution du pourcentage d'inhibition  $I$ , en fonction de la concentration  $C$  des antioxydants, en posant  $I=50\%$

IC<sub>50</sub> a été déterminée pour l'acide ascorbique et pour les antioxydants présents dans les eaux de distillation, récupérées lors de l'hydrodistillation en absence et en présence de tensioactif.

#### II.3.3.2. IC<sub>50</sub> exprimée en milligrammes d'extrait par gramme de DPPH

La concentration inhibitrice, exprimée en mg d'antioxydant par gramme de DPPH, a été déterminée à partir des équations des courbes  $DPPH_{res} = f(AO/DPPH)$ , donnant l'évolution de l'indice  $DPPH_{res}$ , en fonction du rapport AO/DPPH des masses d'antioxydant et du DPPH, en posant  $DPPH_{res}$  égal à 50% (Popovici et al., 2010).

L'indice  $DPPH_{res}$ , exprimé en pourcents, est défini par le rapport de la concentration résiduelle  $CDPPH_{t=t_e}$  du DPPH, restant en fin de cinétique et sa concentration initiale  $CDPPH_0$ :

$$\%(DPPH)_{res} = 100 \cdot CDPPH_{t=t_e} / CDPPH_0 \quad (II.5)$$

La concentration résiduelle  $CDPPH_{t=t_e}$  du DPPH, restant en fin de cinétique, est estimée par de la loi de Beer-Lambeer  $A=k.C$ , à partir d'une courbe d'étalonnage, donnant l'évolution de l'absorbance de la solution du DPPH, en fonction de sa concentration.

La courbe d'étalonnage a été établie, en mesurant l'absorbance à 515 nm de cinq solutions de concentration 5, 10, 20, 30 et 40 µg/mL du DPPH dans le méthanol.

# *Chapitre III:*

## *Résultats et discussions*

### III.1. Extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

#### III.1.1. Comparaison des rendements en huiles essentielles obtenus par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation

Les rendements en huile ont été déterminés lors de l'hydrodistillation et de l'entraînement à la vapeur de *Rosmarinus officinalis* L., en utilisant des échantillons représentatifs de la plante de même taux d'humidité, 49,64%. Le tableau III.1 suivant réunit les résultats obtenus.

**Tableau III. 1 : Rendements en huile essentielle, en %, obtenus par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur de *Rosmarinus officinalis* L.**

Procédé d'extraction	Entraînement à la vapeur	Hydrodistillation
R <sub>HE</sub> ,%	2,16	1,62

Nous remarquons que le rendement le plus élevé est enregistré pour le procédé de l'entraînement à la vapeur d'eau. Il est supérieur de 33% à celui obtenu par hydrodistillation.

Mis à part que l'entraînement à la vapeur d'eau a été réalisé à l'échelle semi pilote, alors que l'hydrodistillation, à l'échelle de laboratoire, une autre raison pourrait être à l'origine de la différence des rendements obtenus. En effet, au cours de l'hydrodistillation la matière végétale est en contact permanent avec la solution aqueuse en ébullition, pendant toute la durée d'extraction. Ce contact direct entre l'eau et la matière végétale favorise, d'une part, la solubilisation de certains constituants de l'huile essentielle dans l'eau bouillante et, d'autre part, des réactions secondaires d'élimination et de réarrangement ou bien phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant donner naissance à certaines substances acides, faiblement solubles dans l'eau et peu volatiles, qui seront retenus par l'eau. Ceci a pour conséquence la diminution du rendement en huile et l'augmentation de l'acidité des eaux d'hydrodistillation, que nous avons constaté. Par contre, lors de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, l'huile n'est pas retenue par le matériel végétal et les pertes dues à sa solubilisation dans l'eau sont moins importantes.

### III.1.2. Influence de la période de la récolte sur le rendement en huile essentielle

Pour déterminer l'influence de la période de la récolte sur le rendement en huiles essentielles, nous avons procédé à des extractions par hydrodistillation de trois échantillons de la plante fraîche, ayant des taux d'humidité entre 56,7 et 64,5% et cueillis à différentes périodes de végétation, en l'occurrence, pendant les périodes de floraison (Mars), de post-floraison (Avril) et de croissance (Mai).

Le tableau III.2 suivant réunit les résultats obtenus.

**Tableau III. 2 : Rendements en huile essentielle, en %, obtenus par hydrodistillation des échantillons de *Rosmarinus officinalis* L. récoltés à différentes périodes de végétation.**

Période de récolte	H,%	R,%
Floraison	56,70	1,00
Post-floraison	64,58	1,40
Croissance	64,52	1,49

Les résultats obtenus montrent que le rendement en huile le plus élevé (1,49%) est obtenu de la plante cueillie dans la période de croissance, suivi par celui de la plante en période de post-floraison et floraison, 1,40 et 1,00%, respectivement.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure que la période de récolte de la plante influe sur le rendement et ceci pourrait être attribué, d'une part, à l'influence des conditions climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température et humidité) sur la matière végétale, et d'autre part par le fait qu'au cours du cycle végétatif la biosynthèse des principes odorants évolue et elle prédomine pendant la période de la croissance.

### III.1.3. Influence du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur le rendement en huile essentielle, obtenue par entraînement à la vapeur et par hydrodistillation

Les rendements en huile ont été déterminés lors de l'extraction par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur des échantillons de la plante de même taux d'humidité avec et sans macération dans une solution aqueuse de tensioactif. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.3 suivant.



**Tableau III. 3 : Rendements en huile essentielle, en %, obtenus par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur de *Rosmarinus officinalis* L avec et sans prétraitement au tensioactif**

Procédé d'extraction	H, %	R <sub>HE</sub> , %		Augmentation du rendement, %
		Sans tensioactif	Avec tensioactif	
Entraînement à la vapeur d'eau	49,64	2,16	2,42	12
Hydrodistillation	56,7	1,00	1,21	21

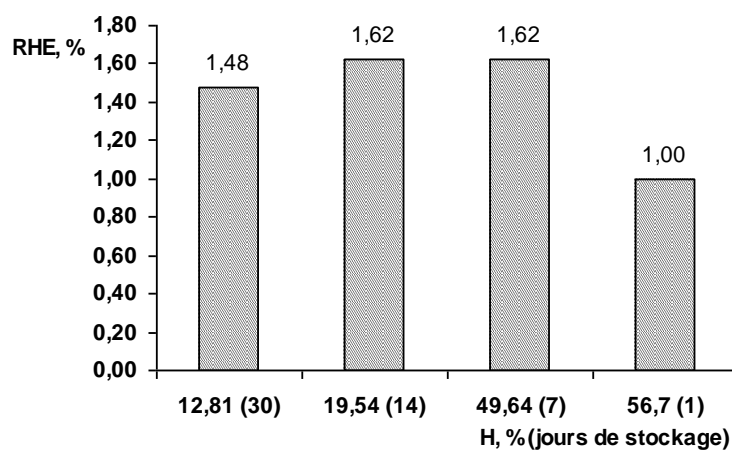
On note que quelque soit le procédé d'extraction, pour un même taux d'humidité de la matière végétale, les rendements obtenus en présence de tensioactif sont supérieurs à ceux obtenus sans tensioactif.

Deux raisons pourraient être à l'origine de ce fait: d'une part, la solubilisation sélective des cires épicuticulaires et des membranes cellulaires y créant des ouvertures, ce qui a pour conséquence l'amélioration des échanges de matière, en l'occurrence, la pénétration de l'eau dans les cellules végétales et la diffusion de l'huile essentielle vers la surface du végétal, et, d'autre part, la miscellisation des constituants de l'huile par le tensioactif, favorisant leur hydrodiffusion.

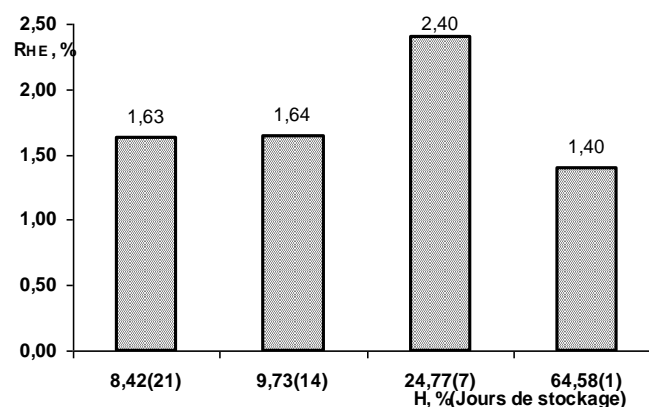
L'augmentation du rendement en présence du tensioactif pour l'hydrodistillation (21%) est supérieure celle de l'entraînement à la vapeur (12%). Ceci pourrait, être attribué au fait qu'au cours de l'hydrodistillation la matière végétale, étant en contact permanent avec la solution aqueuse du tensioactif en ébullition pendant toute la durée d'extraction, l'action du tensioactif sur la matière végétale est prolongée et a pour conséquence l'amélioration des échanges de matière. Ce n'est pas le cas lors de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, où la plante n'est plus en contact avec la solution aqueuse du tensioactif.

### III.1.4. Influence de la durée et la température du stockage de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle

Afin d'étudier l'influence de la température et de la durée du stockage, nous avons procédé à l'extraction par hydrodistillation des échantillons représentatifs des trois lots de romarin, récoltés, respectivement, en périodes de floraison, de post-floraison et de croissance et stockés à l'air libre et à la température ambiante. Cette dernière, mesurée chaque matin à la même heure a été de 11°C, pour le mois de Mars, 18°C, pour le mois d'Avril et 23°C, pour le mois de Mai. L'évolution des rendements obtenus est illustrée par les figures III.1, III.2 et III.3 suivantes.



**Figure III. 1 : Hydrodistillation du romarin fleuri. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée et la température du stockage (Température ambiante 11°C).**



**Figure III. 2 : Hydrodistillation du romarin en post-floraison. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée et la température du stockage (température ambiante moyenne 18°C)**

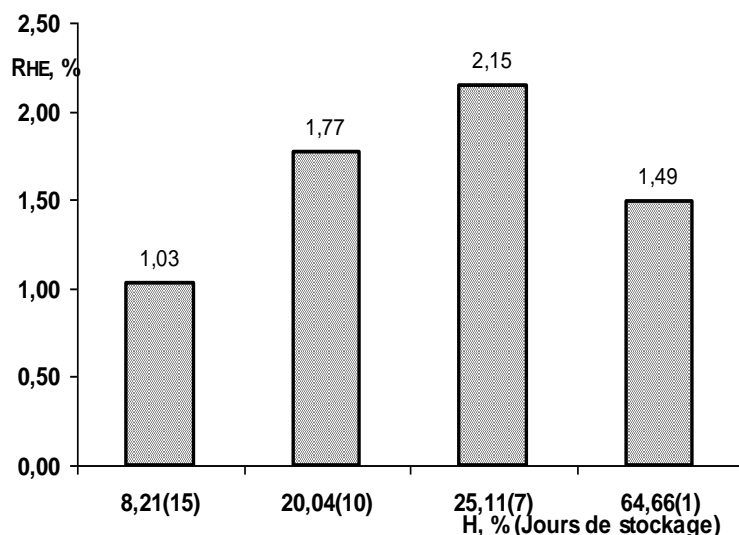


Figure III. 3 : Hydrodistillation du romarin en croissance. Evolution du rendement en huile essentielle, en fonction de la durée et la température du stockage (température ambiante moyenne 23°C)

Nous observons une diminution du taux d’humidité et une augmentation du rendement en huile essentielle, après une semaine de stockage des échantillons de la plante des trois lots, illustrées par la figure III.4 suivante.

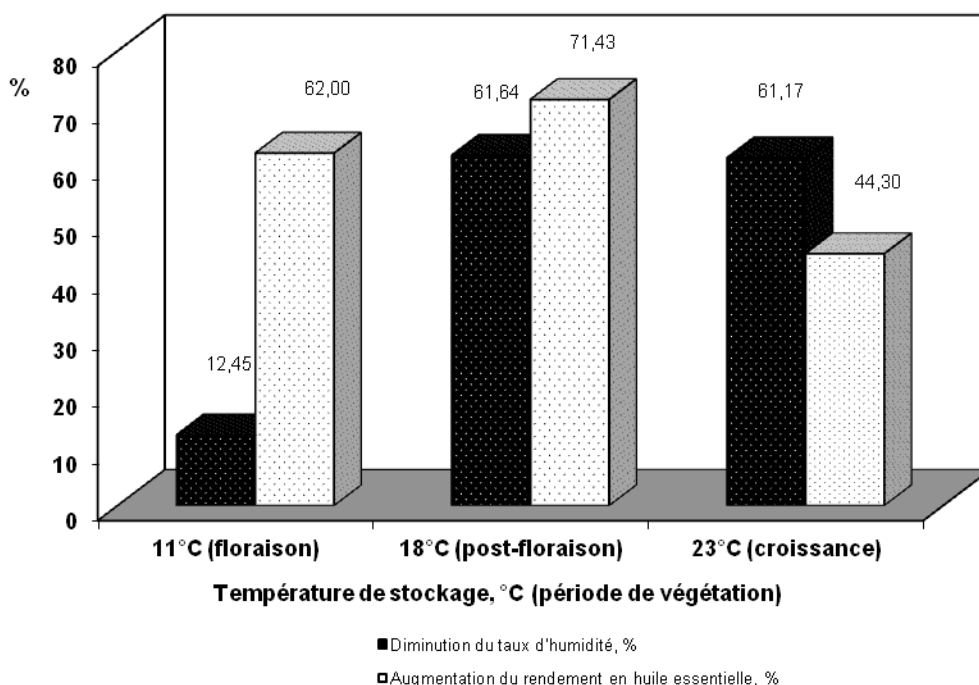


Figure III. 4 : Diminution du taux d’humidité et augmentation des rendements en huile essentielle, en %, obtenus par hydrodistillation des échantillons de *Rosmarinus officinalis* L. récoltés à différentes périodes de végétation, stockés pendant une semaine à la température ambiante

On constate que l'augmentation de rendement en huile essentielle présente un maximum de 71,43%, correspondant à la température du stockage de 18°C.

En effet, le rendement en huile est affecté par deux processus contradictoires et compétitifs:

- l'évaporation, accélérée avec l'élévation de la température ;
- la formation, pendant le stockage, de métabolites secondaires, comme, entre autres, des composés terpéniques, issus du métabolisme glucidique qui dépend de la température et de la teneur en eau dans les tissus végétaux. Cette fonction particulière des cellules sécrétrices, appelée respiration terpénique, a été observée pour d'autres plantes et rapportée dans la littérature. (Gueorguiev, 1995 ; Silou et *al.*, 2002)

Au delà d'une semaine de stockage, nous constatons que :

- Pour le lot stocké à 11°C, le rendement en huile conserve sa plus grande valeur 1,62% jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour, puis il diminue de 8,64 %, pour atteindre 1,48%.
- Le rendement en huile du lot stocké à 18°C diminue de 31,67%, puis se stabilise entre le 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour à 1,63 %.
- Le troisième lot, stocké à 23°C, enregistre une perte du rendement en huile de 52,09% en 8 jours de stockage, pour atteindre une valeur très faible 1,03%.

Cette évolution du rendement en huile essentielle serait à attribuer à l'établissement d'un équilibre entre la vitesse du métabolisme secondaire et la vitesse de l'évaporation. Cette dernière est prédominante à la température la plus élevée (23 °C pour le 3<sup>ème</sup> lot), ou pour une durée de stockage plus longue à des températures moyennes (18°C pour le 2<sup>ème</sup> lot). Par ailleurs, la déshydratation de la plante qui augmente au cours de stockage, cause la mort des cellules sécrétrices et provoquerait la réduction, voire, l'arrêt de la respiration terpénique et, par conséquent, l'arrêt de la formation des terpènes, constituant l'huile essentielle. Dans ce cas, si la température ambiante du stockage n'est pas très élevée, la plante conserve son huile essentielle.

## **III.2. Valorisation des eaux de distillation lors de l'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. par hydrodistillation**

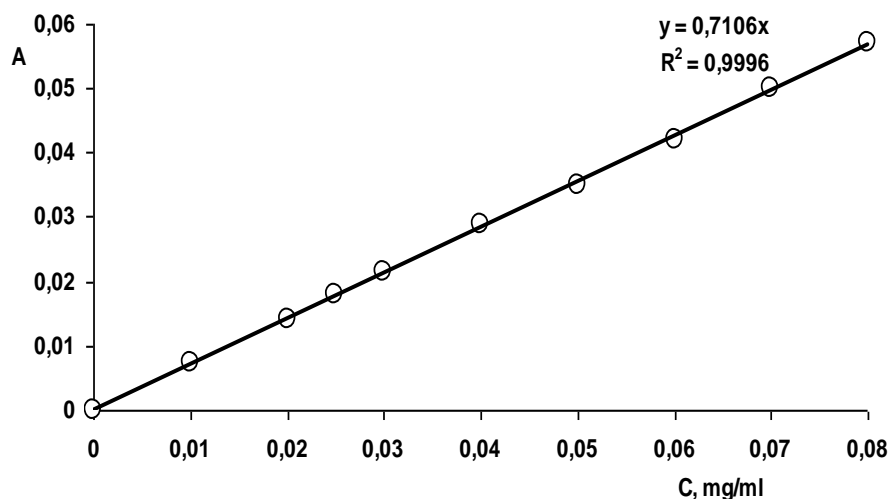
Lors de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle du romarin, nous avons mesuré le pH des eaux de distillation. Les valeurs de pH enregistrées entre 5,5 et 6, signifiant la présence des composés à caractère acide, en l'occurrence, des acides carboxyliques, et/ou des composés phénoliques 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, décrite par JIAO *et al.* (2005), en utilisant l'acide gallique comme standard et procédé à l'évaluation de leur pouvoir antioxydant.

### **III.2.1. Dosage des composés phénoliques dans les eaux de distillation**

En appliquant la méthode originale du dosage des composés phénoliques totaux à nos échantillons des eaux de distillation, nous avons observé la formation d'un précipité qui compromet la mesure correcte de l'absorbance. Ceci nous a amené à modifier le protocole expérimental, en diminuant de moitié le volume de la solution saturée de carbonate de sodium, préconisé dans la méthode originale. Le mode opératoire, appliqué à nos échantillons, est présenté dans le Chapitre II, paragraphe II.3.1.1.

#### **III.2.1.1 Courbe d'étalonnage**

Nous avons établi, au préalable, la courbe d'étalonnage, donnant la variation de l'absorbance, en fonction des concentrations des solutions aqueuses de l'acide gallique, allant de 0,01 à 0,08 mg/mL. Dans ce domaine de concentrations la loi de Beer-Lambert est vérifiée, comme montré à la figure III.5 suivante.

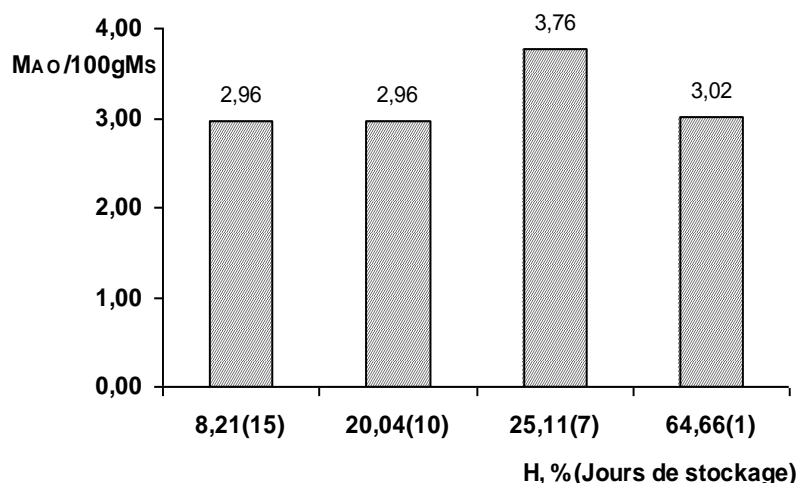


**Figure III. 5 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique**

En se référant à cette courbe d'étalonnage, nous avons déterminé les concentrations en antioxydants  $C_{AO}$  présents dans les eaux de distillation et calculé la masse des composés phénoliques, ou des antioxydants,  $M_{AO}$ , dans les eaux de distillation, rapportée à 100 grammes de matière végétale sèche et exprimée en g/100g, selon l'expression II.6 (Chapitre II).

### **III.2.1.2. Influence de la durée et de la température du stockage de la matière végétale sur la concentration des antioxydants présents dans les eaux de distillation**

Nous avons déterminé la concentration des antioxydants dans les eaux de distillation recueillies lors des essais d'hydrodistillation du romarin, récolté en période de croissance (mois de Mai), stocké à la température ambiante de 23°C, et estimé la masse d'antioxydants dans les eaux de distillation recueillies lors de l'hydrodistillation de 100 g de matière sèche. Les résultats obtenus sont présentés à la figure III.6 suivante.



**Figure III. 6 : Influence de la durée du stockage à 23°C et le taux d'humidité H de la plante sur la masse  $M_{AO}$  d'antioxydants dans les eaux de distillation recueillies lors de l'hydrodistillation de 100 g de matière sèche**

On constate, au vu des résultats obtenus, qu'après une semaine de stockage, la masse des antioxydants augmente de 24,5%, puis diminue de 21,28 % et reste constante à 2,96%, à partir du dixième jour du stockage.

Pour interpréter ce résultat, rappelons que, comme les terpénoïdes, constituants de l'huile essentielle, les antioxydants sont issus du métabolisme secondaire. Les antioxydants du romarin, en particulier, l'acide carnosique, s'accumulent dans les vacuoles des cellules végétales. Des études récentes ont prouvé que, dans les conditions favorisant la production des radicaux libres, tels que la sécheresse et la forte lumière, la teneur en diterpènes phénoliques fortement oxygénés, tels le carnosol, le rosmanol, l'isorosmanol, et 11,12-di-o-méthyl-iso-rosmanol, augmente dans les feuilles du romarin par l'intermédiaire de l'activité antioxydante de l'acide carnosique (Munne-Bosch et *al.*, 1999; Munne-Bosch et Alegre, 2000). Ainsi, l'acide carnosique pourrait jouer un rôle important en protégeant la plante *in vivo* contre le stress oxydant.

De toute évidence la formation de ces produits continue après la récolte de la plante: en témoigne l'augmentation de leur teneur dans les eaux de distillation recueillies lors de l'hydrodistillation du romarin stocké pendant une semaine.

Par contre, les molécules antioxydantes en général, et les antioxydants du romarin, en particulier, sont par nature des molécules labiles, notamment lorsqu'elles sont exposées à l'air et/ou à la chaleur. Lors du stockage de la plante, il se produirait un certain nombre de réactions conduisant à l'oxydation de ces composés. On rapporte, dans la littérature, que l'acide carnosique serait le précurseur du carnosol et de nombreux autres antioxydants présents dans cette plante (Wenkert et *al.*, 1965).

Nous avons observé, par ailleurs, une évolution de la couleur de la plante au cours de stockage : elle conserve sa couleur verte, après la récolte, au terme d'une semaine de stockage, puis brunit avec le prolongement de ce dernier. Ce brunissement de la matière végétale traduit des processus de transformations des composants de ses tissus, y compris des antioxydants qu'elles renferment, dues aux stress oxydatif et hydrique pendant le stockage. Ceci expliquerait la diminution de la teneur des antioxydants dans la plante, et par conséquent, dans les eaux de distillation, lors de l'hydrodistillation.

Enfin, la stabilisation de la teneur en antioxydants dans la plante et, par conséquent, dans les eaux de distillation, pourrait être attribuée à l'arrêt des fonctions vitales des cellules végétales et aussi des réactions chimiques de transformation en raison de la quantité insuffisante d'eau dans la plante sèche.

### **III.2.1.3. Influence du prétraitement de la matière végétale avec tensioactif sur la concentration des antioxydants présents dans les eaux de distillation**

La concentration des antioxydants dans les eaux de distillation a été déterminée lors de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle de deux échantillons de même taux d'humidité, égal à 20,04%, représentatifs du lot du romarin, récolté en période de croissance (mois de Mai). L'un des échantillons, HD+TA, a été macéré pendant 24 heures dans une solution aqueuse de tensioactif, l'autre, HD, a été soumis à l'hydrodistillation sans aucun prétraitement. Un volume d'un millilitre a été prélevé des eaux de distillation obtenues de chaque essai et séché à 40°C jusqu'au poids constant, afin de déterminer la masse en extrait sec dans les eaux de distillation et d'évaluer la teneur en antioxydants. La masse d'extrait sec dans un millilitre des eaux de distillation est de 14,8 mg, dans les deux cas.



Ces données expérimentales nous ont permis d'estimer la masse  $M_{AO}$  des antioxydants dans les eaux de distillation, lors de l'hydrodistillation de 100 grammes de plante sèche, et la teneur  $T_{AO}$  en antioxydants dans l'extrait sec.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.4 suivant.

**Tableau III. 4 : Concentration des antioxydants dans les eaux de distillation, masse d'antioxydants récupérés des eaux de distillation de 100g de plante sèche et teneur en antioxydants dans l'extrait sec**

Echantillon	$C_{AO}$ , mgEAG/mL	$M_{AO}$ , g/100g de plante sèche	$T_{AO}$ dans l'extrait sec, %
HD	1,76	2,96	11,89
HD+TA	1,97	3,31	13,31

Nous observons que la macération du romarin dans une solution aqueuse de tensioactif provoque une augmentation de 11,94 % de la concentration des antioxydants dans les eaux de distillation et, par conséquent, de la masse d'antioxydants que l'on peut y récupérer lors de l'hydrodistillation de 100 grammes de plante sèche. Il est évident que le tensioactif intervient, grâce à ses propriétés solubilisantes et de miscellisation, pour l'acheminement des antioxydants hydrosolubles de la matrice végétale vers le milieu aqueux.

### II.2.2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des échantillons des eaux de distillation, récupérées lors de l'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle du romarin, a été effectuée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. A cet effet, nous avons déterminé le pourcentage d'inhibition et les concentrations nécessaires à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH dans le milieu réactionnel,  $IC_{50}$ , exprimées en  $\mu\text{g/mL}$  et en mg d'antioxydant par gramme de DPPH pour deux échantillons des eaux de distillation:

- HD+TA, pour lequel la matière végétale été macéré pendant 24 heures dans une solution aqueuse de tensioactif, avant de subir l'hydrodistillation;
- HD, pour lequel la plante a été soumise à l'hydrodistillation sans aucun prétraitement.

### III.2.2.1. Détermination du pourcentage d'inhibition

Comme il n'existe pas de mesure absolue du pouvoir antioxydant d'un composé, son pourcentage d'inhibition est comparé à celui des antioxydants de référence. Aussi, nous avons déterminé le pourcentage d'inhibition, I, des deux échantillons HD et HD+TA et comparé les valeurs obtenues à celles de trois antioxydants de référence.

A cet effet, des solutions dans le méthanol à 25 µg/mL des acides ascorbique, gallique et tannique ont été préparées et à 3 mL de chaque solution a été ajouté 1 mL d'une solution méthanolique de DPPH de concentration 0,1mM. L'absorbance a été mesurée, après 30 minutes, à 517 nm. Selon la même procédure ont été enregistrées les absorbances des solutions, dans le méthanol à 185 µg/mL d'extrait sec, des échantillons HD et HD+TA. Cette concentration en extrait sec correspond à 25 µgEAG/mL pour l'échantillon HD.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.5 suivant.

**Tableau III. 5 : Comparaison du pourcentage d'inhibition I (%) du DPPH des eaux de distillation, récupérées lors de l'hydrodistillation en présence (HD+TA) et en absence (HD) du tensioactif et des acides ascorbique (AA), gallique (AG) et tannique (AT)**

Echantillon	Concentration, µg/mL	Absorbance	I, %
<b>AA</b>	25	0,015	98,62
<b>AG</b>	25	0,025	97,70
<b>AT</b>	25	0,030	97,24
<b>HD</b>	185 µg/mL d'extrait sec équivalent à 22,35 µg EAG/mL	0,073	93,28
<b>HD+TA</b>	185 µg/mL d'extrait sec équivalent à 25,02 µg EAG/mL	0,053	95,12
<b>DPPH</b>	0,1mM	1,014	-

Les valeurs du tableau III.5, relatives au pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH, sont de même ordre de grandeur et reflètent le pouvoir antioxydant élevé des échantillons testés.

Concernant le pouvoir antioxydant des composés de référence, nos résultats sont similaires à ceux publiés dans la littérature (Popovici et *al.*, 2010, Sanchez-Moreno et

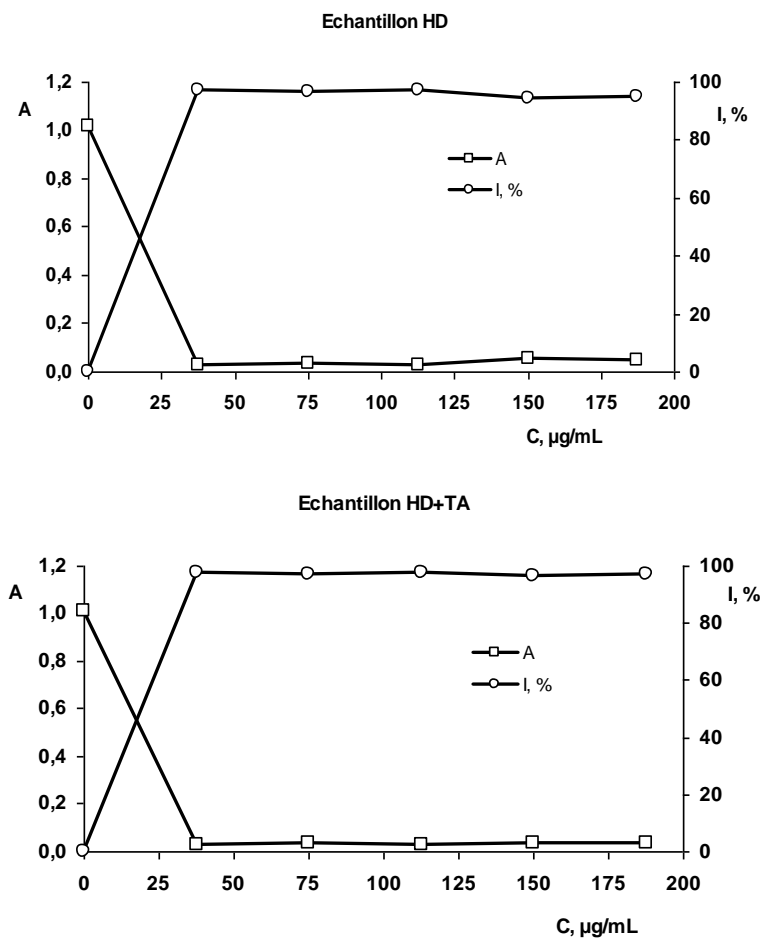
*al.*, 1998), qui signalent que l'activité antioxydante des trois acides décroît dans l'ordre suivant: acide ascorbique > acide gallique > acide tannique. Quant au pouvoir antioxydant des échantillons des eaux de distillation, pour une même concentration en extrait sec (185 µg/mL) celui de HD+TA s'est révélé supérieur, en raison de la concentration des antioxydants plus élevée dans cet échantillon, 1,97 µgEAG/mL, que celle, 1,76 µgEAG/mL, de l'échantillon HD.

### **III.2.2.2. Détermination de la concentration IC<sub>50</sub>, µg/mL**

Des solutions méthanoliques de différentes concentrations en extraits sec, allant de 50 à 250 µg/ml, ont été préparées en utilisant les eaux de distillation, obtenues lors de l'hydrodistillation du romarin avec (HD+TA) et sans tensioactif (HD). A 3 mL de chaque solution a été ajouté 1mL d'une solution méthanolique de DPPH de concentration 0,1mM. L'absorbance de chaque solution, mesurée, après 30 minutes, à 517 nm, a permis de calculer le pourcentage d'inhibition du DPPH.

Les résultats obtenus nous ont servis pour tracer les courbes, présentées sur la figure III.7, donnant l'évolution de l'absorbance et du pourcentage d'inhibition des solutions testées, en fonction de leur concentration réelle au moment de la mesure.

La concentration IC<sub>50</sub>, nécessaire pour réduire de 50% l'absorbance du DPPH, a été calculée à partir de la courbe  $I=f(C)$ . On note que, autour d' $I=50\%$ , l'évolution du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration, est linéaire :  $I = k.C$ . Aussi, en déterminant la pente  $k$  de la droite et en posant  $I=50$ , nous avons accédé à la concentration IC<sub>50</sub>. La valeur obtenue a été convertie en concentration réelle de la solution, en tenant compte de la dilution de l'échantillon lors de la mesure de son absorbance.



**Figure III. 7 : Evolution de l’absorbance A et du pourcentage d’inhibition I du DPPH, en fonction de la concentration en extrait sec des échantillons HD et HD+TA.**

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau III.6 suivant

**Tableau III. 6 : Concentrations inhibitrices IC<sub>50</sub> des échantillons des eaux de distillation HD et HD+TA.**

Echantillon	I=k.C*	IC <sub>50</sub> *, µg/mL	IC <sub>50</sub> ** , µg/mL
HD	I=2,5957.C	19,26	25,68
HD+TA	I=2,6009.C	19,22	25,63

\* Concentration de la solution au moment de la mesure de l’absorbance

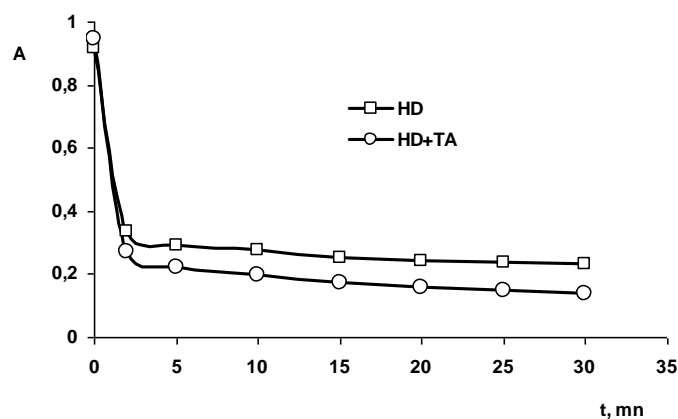
\*\* Estimée à partir de la concentration de la solution au moment de la mesure de l’absorbance

Les valeurs d’IC<sub>50</sub>, trouvées pour les deux échantillons, sont pratiquement identiques. Ceci remet en cause les résultats du dosage des antioxydants, qui ont montré une concentration d’antioxydants plus élevée dans l’échantillon HD+TA. Cependant, lors de la comparaison du pourcentage d’inhibition de ces deux échantillons à ceux des composés de référence (paragraphe III.2.2.), où les solutions testées ont une plus

faible concentration au moment de la mesure de l'absorbance (18,75  $\mu\text{g/mL}$ , pour les composés de référence et 138,5  $\mu\text{g/mL}$ , en extrait sec, pour les échantillons HD et HD+TA), un pourcentage d'inhibition de l'échantillon HD+TA, supérieur à celui de HD, a été trouvé.

Les valeurs d' $\text{IC}_{50}$  semblent entachées d'erreur, due, à notre avis, au fait que les solutions de forte concentration sont colorées en jaune et absorbent dans le même domaine que le DPPH. On note, en effet, sur la figure III.7, une augmentation de l'absorbance pour les solutions à concentration élevée. Aussi, nous avons mesuré l'absorbance de la solution à 200  $\mu\text{g/mL}$  de l'échantillon HD+TA et trouvé une valeur de 0,046, ce qui corrobore notre hypothèse. Par ailleurs, nous avons observé que les solutions concentrées provoquent une décoloration très rapide du DPPH.

Sur la base de ces observations et en se référant aux travaux antérieurs (Baydar et *al.*, 2007) nous avons réduit la concentration de nos échantillons et le rapport des volumes de DPPH et de la solution à doser à 1 : 1 au lieu de 1 : 3, utilisé précédemment. Par ailleurs, nous avons suivi l'évolution de la réduction du DPPH, en fonction du temps, pour deux échantillons HD, HD+TA de concentration 10  $\mu\text{g/mL}$ . Les profils cinétiques obtenus, présentés à la figure III.8, révèlent que la réaction est très rapide. Ceci nous a amené à réduire le temps du contact à 5 minutes.



**Figure III. 8 : Cinétique de réduction du DPPH**

Dans ces conditions opératoires, nous avons enregistré l'absorbance des solutions méthanoliques des échantillons HD, HD+TA et de l'acide ascorbique de concentrations 10, 20, 30, 40 et 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement, et calculé le pourcentage d'inhibition et la concentration inhibitrice  $\text{IC}_{50}$ . Afin de comparer nos résultats à ceux publiés dans la littérature, les mesures de l'absorbance ont été effectuées à 515 nm.

La figure III.9 regroupe les courbes, donnant l'évolution de l'absorbance et du pourcentage d'inhibition, en fonction de la concentration des solutions analysées.

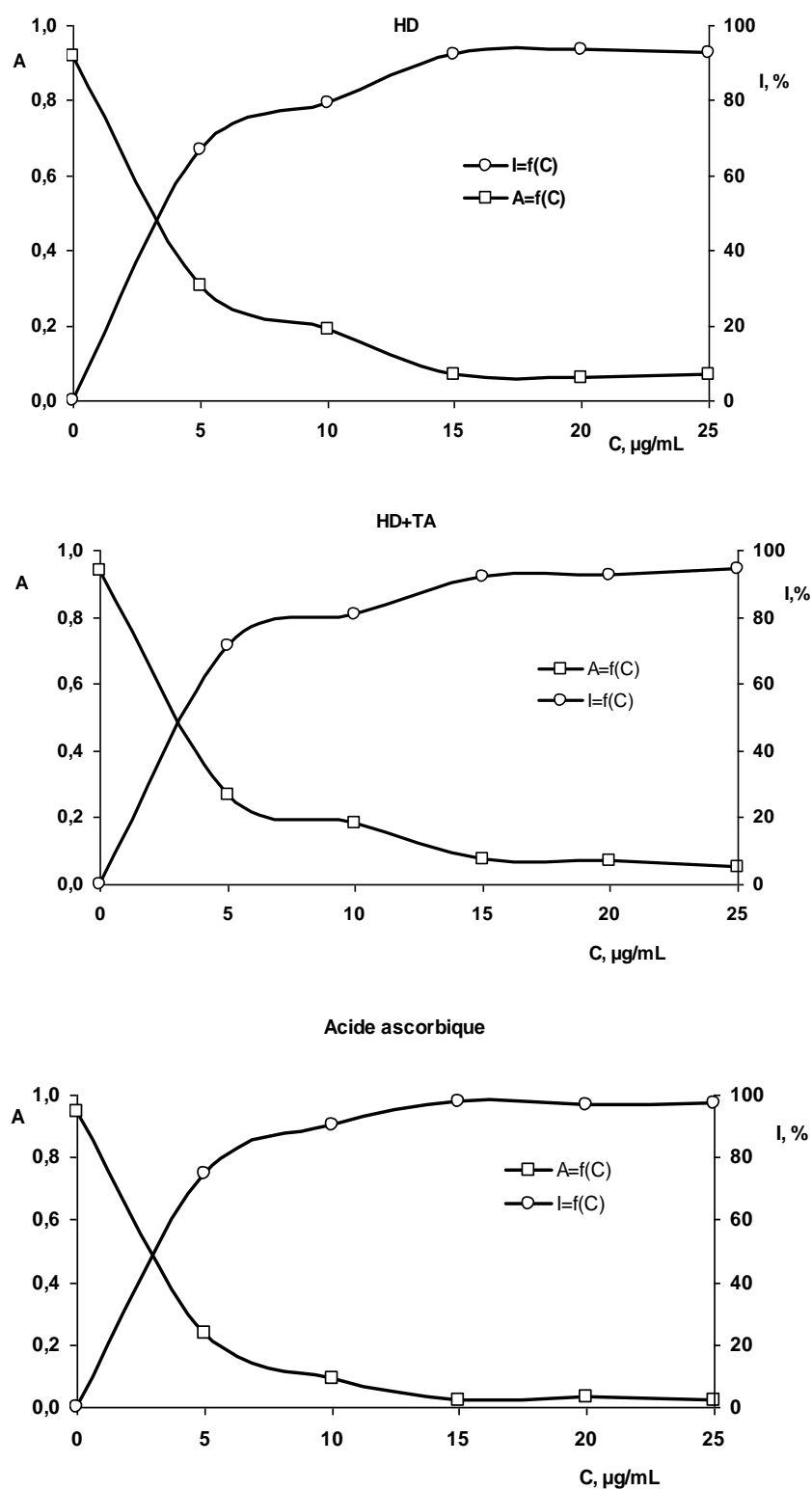


Figure III. 9 : Evolution de l'absorbance A et du pourcentage d'inhibition I du DPPH, en fonction de la concentration des échantillons HD, HD+TA et d'acide ascorbique

Nous remarquons que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration jusqu'à atteindre un palier, dans le cas de l'acide ascorbique. Par contre, les courbes  $I=f(C)$  des échantillons des eaux de distillation présentent deux paliers bien distincts. Cette allure pourrait correspondre à la composition plus complexe de ces échantillons et à une suite de réactions de leurs composants avec DPPH. En effet, il a été montré que l'acide carnosinique, l'antioxydant major du romarin, génère le carnosol et le rosmanol, eux-mêmes des antioxydants, capables d'inhiber les radicaux du DPPH (Site web [5]).

Comme précédemment, nous avons déterminé les valeurs d' $IC_{50}$  des trois échantillons analysés et les avons rapportés dans le tableau III.8 suivant.

**Tableau III. 7 : Concentrations inhibitrices  $IC_{50}$ , en  $\mu\text{g/mL}$ , des échantillons des eaux de distillation HD, HD+TA et d'acide ascorbique**

Echantillon	$I=k.C^*$	$IC_{50}^*$ , $\mu\text{g/mL}$	$IC_{50}^{**}$ , $\mu\text{g/mL}$
HD	$I=13,365.C$	3,7	7,4
HD+TA	$I=14,32.C$	3,5	7,0
Acide ascorbique	$I= 14,974.C$	3,3	6,6

\* Concentration de la solution au moment de la mesure de l'absorbance

\*\* Estimée à partir de la concentration de la solution au moment de la mesure de l'absorbance

Les valeurs d' $IC_{50}$  obtenus nous permettent de conclure que le pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique est supérieur à celui des échantillons des eaux de distillation, même si ces derniers montrent des pouvoirs notables. En effet, Moreno et *al.* (2006) ont évalué  $IC_{50}$  des extraits méthanolique, acétonique et aqueux de romarin à 18,0, 25,6 et 55,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement, nettement supérieurs à nos valeurs.

Nous constatons, en outre, que l'échantillon HD+TA présente une capacité antioxydante supérieure à celle de l'échantillon HD, puisque la concentration nécessaire pour diminuer de 50% l'absorbance du DPPH est plus faible. Ce résultat, du à la teneur en antioxydants plus élevée dans cet échantillon, est en accord avec les résultats du dosage (Tableau III.4) et confirme la relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire, mise en évidence dans un grand nombre de travaux (Hua et *al.*, 2008 ; Makris et *al.*, 2007 ; Berrin Bozan et *al.* 2008 ; Baydar et *al.*, 2007; Yun Suk Huh, et *al.*, 2004).

### III.2.2.3 Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC<sub>50</sub>), exprimée en milligrammes d'extrait par gramme de DPPH

La concentration inhibitrice IC<sub>50</sub>, a été déterminée à partir des courbes DPPH<sub>res</sub> = f(AO/DPPH), donnant l'évolution de l'indice DPPH<sub>res</sub>, en fonction du rapport AO/DPPH des masses d'antioxydant et du DPPH, en posant DPPH<sub>res</sub> égal à 50%.

Pour tracer les courbes DPPH<sub>res</sub> = f(AO/DPPH), nous avons enregistré l'absorbance à 515 nm des mélanges de 2 mL de chacune des solutions méthanoliques des échantillons HD, HD+TA et de l'acide ascorbique, de concentrations 10, 20, 30, 40 et 50 µg/mL, respectivement, et 2 mL d'une solution du DPPH de concentration 0,1 mM et calculé le rapport des masses d'antioxydant et du DPPH dans le mélange.

La détermination de la concentration résiduelle du DPPH, DPPH<sub>res</sub>, a nécessité l'établissement d'une courbe d'étalonnage, donnant l'évolution de l'absorbance de la solution du DPPH, en fonction de sa concentration. La loi de Beer-Lambert est valable dans le domaine des concentrations allant de 5 à 30 µg/ml (Figure III.10).

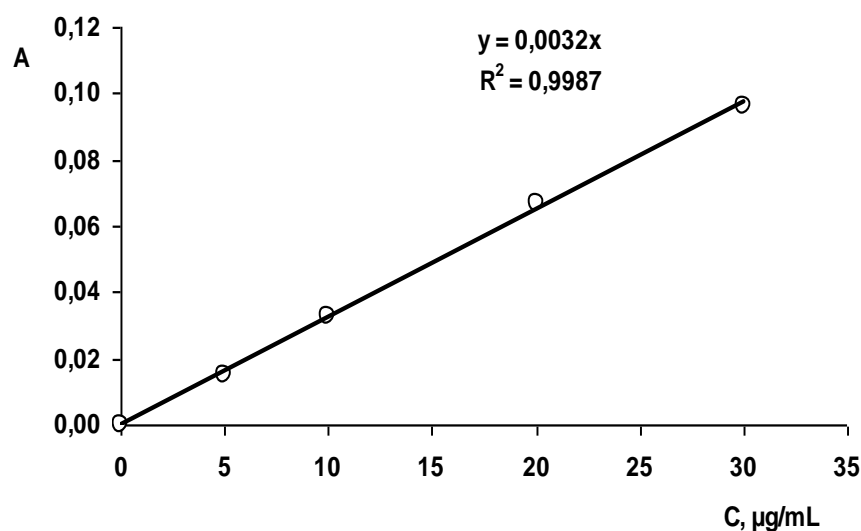


Figure III. 10 : Courbe d'étalonnage du DPPH.

Cette courbe est strictement identique à celle obtenu par Popovici et *al.* (2010). Ils ont étudié le domaine de concentrations entre 3,37 et 63,4 µM et trouvé que la loi de Beer Lamber est vérifiée pour des absorbances inférieurs à 1.

Les résultats obtenus sont présentés, dans le tableau III.8 suivant.



**Tableau III. 8 : Evolution de l'indice DPPH<sub>res</sub>, en fonction du rapport AO/DPPH des masses d'antioxydant et du DPPH, pour les échantillons HD, HD+TA et l'acide ascorbique**

Echantillon	Cp*, µg/mL	Cm**, µg/mL	Absorbance	AO/DPPH µg/µg	C <sub>DPPH</sub> µg/mL	DPPH <sub>res</sub> %
HD	0	0	0,918	0	286,88	99,99
	10	5	0,305	0,25	95,31	33,22
	20	10	0,189	0,50	59,06	20,59
	30	15	0,071	0,75	22,19	7,73
	40	20	0,061	1,00	19,06	6,64
	50	25	0,068	1,25	21,25	7,41
HD+TA	0	0	0,940	0	293,75	100,00
	10	5	0,267	0,25	83,44	28,40
	20	10	0,181	0,50	56,56	19,26
	30	15	0,075	0,75	23,44	7,98
	40	20	0,071	1,00	22,19	7,55
	50	25	0,052	1,25	16,25	5,53
Acide ascorbique	0	0	0,947	0	295,94	99,99
	10	5	0,238	0,250	74,38	25,13
	20	10	0,091	0,500	28,44	9,61
	30	15	0,022	0,750	6,88	2,32
	40	20	0,032	1,000	10,00	3,38
	50	25	0,024	1,250	7,50	2,53

\* Cp : concentration de la solution préparée ;

\*\* Cm : concentration de la solution au moment de la mesure de l'absorbance

Ces résultats ont permis de tracer les courbes, donnant l'évolution de l'indice DPPH<sub>res</sub>, en fonction du rapport AO/DPPH des masses d'antioxydant et du DPPH présentées à la figure III.11.

Nous constatons que, autour de la valeur de DPPH<sub>res</sub> égale à 50%, l'évolution de la concentration résiduelle du DPPH, en fonction du rapport AO/DPPH, est linéaire :

$$\text{DPPH}_{\text{res}} = a. (\text{AO/DPPH}) + b$$

Aussi, en déterminant la pente **a** de la droite et en posant DPPH<sub>res</sub>=50, nous avons accédé à la concentration IC<sub>50</sub>, exprimée en milligrammes d'antioxydant par gramme de DPPH.

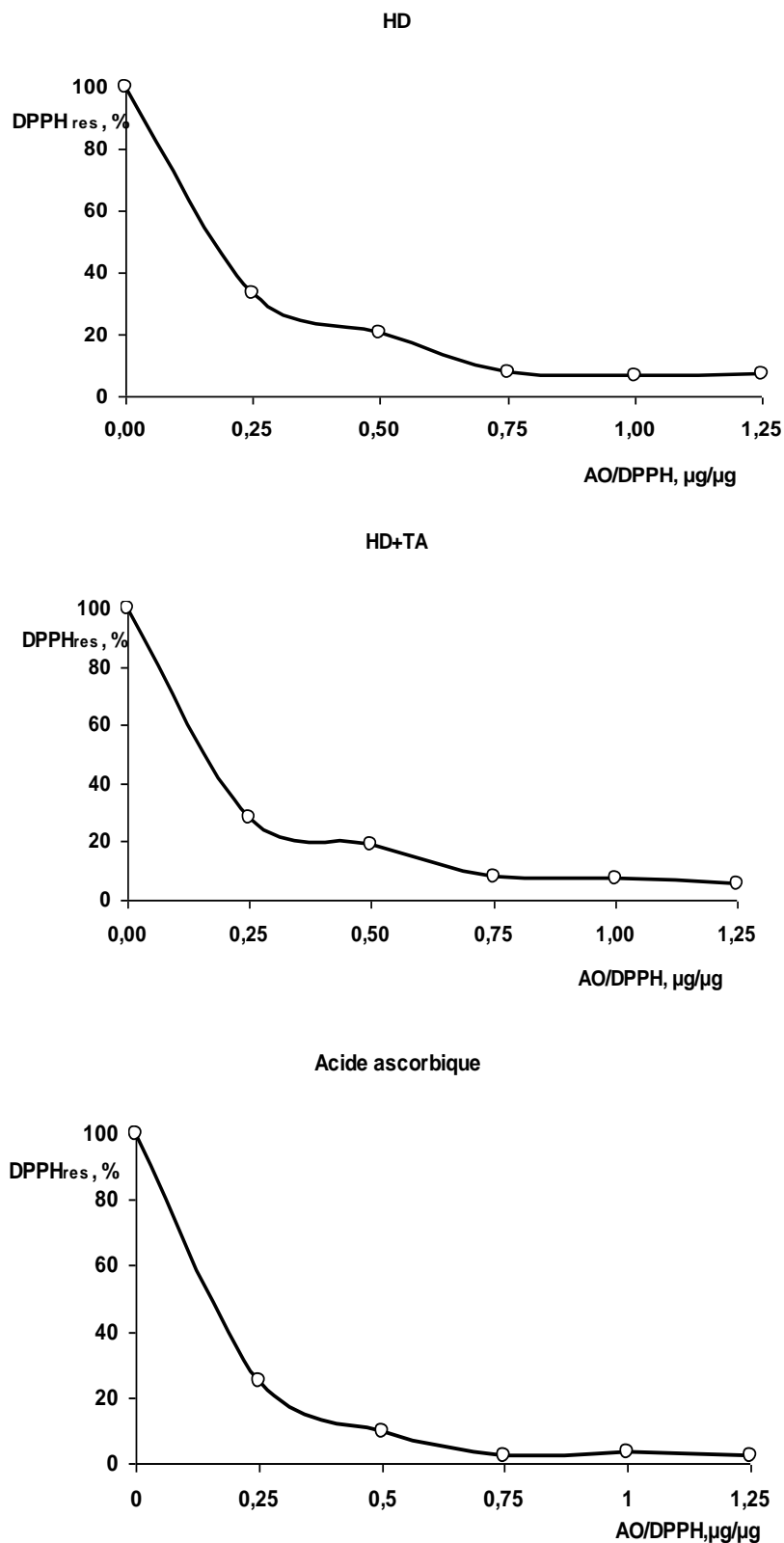


Figure III. 11 : Evolution de l'indice DPPH<sub>res</sub>, en fonction du rapport AO/DPPH des échantillons HD, HD+TA et d'acide ascorbique.

Les concentrations inhibitrices  $IC_{50}$  en mg AO/g DPPH sont regroupées dans le tableau III.9 suivant.

**Tableau III. 9 : Concentrations inhibitrices  $IC_{50}$  , en mgAO/gDPPH, des échantillons des eaux de distillation HD, HD+TA et d'acide ascorbique**

Echantillon	Equation de la partie linéaire	$IC_{50}$ mg AO/g DPPH
HD	$DPPH_{res} = -267,1. AO/DPPH + 99,99$	187,2
HD+TA	$DPPH_{res} -286,38 AO/DPPH + 100$	174,6
Acide ascorbique	$DPPH_{res} -299,46 AO/DPPH + 99,99$	166,9

Les valeurs du tableau III.9 permettent de classer les échantillons testés selon leur pouvoir antioxydant, dans l'ordre décroissant suivant: acide ascorbique > HD+TA > HD. Les valeurs d' $IC_{50}$  de nos échantillons, nettement inférieures à celles déterminées pour les antioxydants des pépins du raisin  $IC_{50} = 660$  mg/g DPPH par Bakkalbas et *al.*(2005), traduisent un pouvoir antioxydant environ trois fois supérieur.

Cependant, il est à noter que le test au DPPH n'est pas quantitatif. Il permet de comparer différents extraits entre eux, selon leur capacité à piéger le radical DPPH et ainsi, d'apprécier les variations qualitatives des composés phénoliques (Popovici et *al.*, 2010).

# *Conclusion*

Ce travail a porté, en premier lieu, sur l'extraction de l'huile essentielle du *Romarinus officinalis* L., provenant d'un lot cultivé à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger.

En dépit des nombreuses études sur ce sujet, nous nous sommes intéressés à quelques aspects, liés aussi bien aux procédés d'extraction, qu'à la matière végétale elle-même.

Les essais d'extraction, avec cohobage, ont été réalisés à l'échelle semi pilote, pour l'entraînement à la vapeur d'eau, et à l'échelle de laboratoire, pour l'hydrodistillation, sans et avec un traitement préalable de la plante par une solution aqueuse de tensioactif non ionique. L'augmentation du rendement en huile constatée en présence du tensioactif, de 21% pour l'hydrodistillation et de 12%, pour l'entraînement à la vapeur d'eau, a mis en évidence d'une part, la solubilisation sélective des membranes cellulaires par le tensioactif, les rendant plus perméables aux échanges de matière. Dans le cas de l'hydrodistillation, cette action solubilisante serait favorisée par un contact prolongé entre la matière végétale et le tensioactif à la température voisine à 100°C, conduisant à un meilleur rendement en huile essentielle. D'autre part, la miscellisation des constituants de l'huile par le tensioactif, favoriserait leur hydrodiffusion, quelque soit le procédé d'extraction.

L'extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle des échantillons de la plante récoltés à différentes périodes de son cycle végétatif, en l'occurrence, la période de floraison, la période de post floraison et celle de la croissance, a permis de constater que le rendement le plus élevé, 1,49%, est enregistré pour la plante en période de croissance, pendant laquelle la biosynthèse des principes odorants serait accélérée.

L'étude de l'influence de la durée et de la température du stockage de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle a montré que ce dernier est affecté par deux processus compétitifs, l'évaporation, accélérée avec l'élévation de la température et la formation, pendant le stockage, de métabolites secondaires, comme, entre autres, des composés terpéniques, qui dépend de la température et de la teneur en eau dans les tissus végétaux. Quelques soient la période de végétation et la température du stockage, une nette augmentation du rendement en huile, allant de 44 à 71%, a été observée au terme d'une semaine de stockage de la plante, traduisant ce phénomène, appelé respiration terpénique, rapporté dans la littérature.

Dans la deuxième partie de cette recherche, nous nous sommes intéressés à la valorisation des eaux de distillation, récupérées lors de l'hydrodistillation du romarin, en mettant en évidence la présence des composés phénoliques, ayant un pouvoir antioxydant. Le dosage de ces derniers, par la méthode de Folin-Denis, que nous

avons été amenés à adapter à nos échantillons, a permis d'évaluer leur teneur dans les eaux de distillation, obtenues lors de l'hydrodistillation de la plante en présence et en absence de tensioactif, respectivement, à 3,31% et 2,96%. Il est évident que le prétraitement de la matière végétale avec un tensioactif contribue à l'augmentation de la concentration de ces composés dans les eaux de distillation, pour des raisons déjà évoquées, concernant l'extraction de l'huile essentielle.

L'étude sur l'influence de la durée et de la température de stockage de la matière végétale sur la concentration des composés phénoliques, présents dans les eaux de distillation, a montré qu'après une semaine de stockage, la masse des antioxydants augmente de 24,5%, puis diminue de 21,27% et reste constante à 2,96%, à partir de dixième jour de stockage à 23°C. Nous avons attribué cette augmentation au métabolisme secondaire, dont ces produits sont issus et dont la formation continuerait après la récolte de la plante. Quant à la diminution de leur concentration au-delà de la première semaine de stockage, nous l'avons attribué au fait que lors du stockage de la plante, il se produirait un certain nombre de réactions conduisant à l'oxydation de ces composés, sous l'effet du stress hydrique, de la chaleur et de la lumière.

Enfin, nous avons évalué l'activité antioxydante des composés phénoliques, contenus dans les eaux de distillation, par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. La comparaison du pourcentage d'inhibition du radical, ainsi déterminé, est de même ordre de grandeur que celui des composés de référence, tels les acides ascorbique, gallique et tannique. Par ailleurs, les concentrations, nécessaires pour une inhibition de 50% du radical DPPH, ou  $IC_{50}$ , exprimées en  $\mu\text{g/mL}$  et en grammes d'antioxydant par gramme de DPPH, ont été déterminées. Elles se sont avérées proches de celles de l'acide ascorbique. Les  $IC_{50}$  des eaux de distillation, obtenues par l'hydrodistillation en présence du tensioactif, étant inférieures, traduisent une activité antioxydante supérieure par rapport à celles des eaux, obtenues sans utilisation de tensioactif.

Au terme de cette recherche, nous pouvons formuler les recommandations suivantes concernant l'hydrodistillation du romarin en vue d'une amélioration significative, aussi bien du rendement en huile essentielle que de la teneur en antioxydants dans les eaux de distillation:

- Récolter le romarin pendant la période de croissance ;
- Procéder à l'hydrodistillation de la plante après une semaine de stockage ;

- Macérer la matière végétale dans une solution aqueuse de tensioactif avant l'hydrodistillation.

Cette étude, loin d'être achevée, ouvre la voie de futures recherches, aussi bien dans le domaine des sciences appliquées que fondamentales, en vue de la valorisation de *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, ENP, Département de Génie chimique, Alger.
- ♣ **Abrassart J-L. (1997)** Aromathérapie essentielle: huiles essentielles : parfums pour le corps et l'âme. Ed Guy Trédaniel, p 271.
- ♣ **Abrassart J-L. (1988)** Mille et une vertus des huiles essentielles, Ed Guy Trédaniel.
- ♣ **AFNOR (1996)** Association Française de Normalisation, Recueil des normes françaises, Huiles essentielles, NF T 75-006, 5<sup>e</sup> édition, Paris, T2, p 4.
- ♣ **Alaux S (2005)** Fiche technique huile essentielle biologique romarin cinéole, *Rosmarinus officinalis* L., laboratoire Florame aromathérapie.
- ♣ **Alaux S (2006)** Fiche technique huile essentielle biologique romarin camphré, *Rosmarinus officinalis* L., laboratoire Florame aromathérapie.
- ♣ **Angnioni A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J.D., Arlorio M. (2004)** Chemical composition, pant genitic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol. 52, N° .1, p.p.3530-3535.
- ♣ **Arab S., Beddar B. (2011)** Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.: extraction, composition chimique, propriétés physiques et antimicrobiennes. Projet de fin d'études, ENP, Département Génie Chimique, Alger.
- ♣ **Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R., Loligers J. (1992)** Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosmmary constituents: Carnosol and carnosic acid, *Xenobiotica*, Vol. 22, p.p. 257-268.
- ♣ **Bachelot C., Blaise A., Corbel T., Le Guernic A. (2006)** Les huiles essentielles. Licence 2 Biologie, Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, France, 26 p.
- ♣ **Bakkalbas E., Yemis Oktay., Aslanova D., Artık N., (2005)** Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivars grown in Turkey. *Eur Food Res Technol.* 221, 792–797.
- ♣ **Baudrand-Alzieu V. (1995)** Synthèse des monoesters et diesters de tetraethyleneglycol, et des acides gras du ricin par estérification auto catalytique en milieu concentre. Thèse de l'INP Toulouse.
- ♣ **Baydar H., Baydar N. (2005)** Industrial Crops and Products, vol. 21, p.p. 251-255.

- ♣ **Baydar N.G., Özkan G., Yaşar S. (2007)** Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18 (9), 1131-1136.
- ♣ **Beauquesne B, Pinkas L, Tork M (1980)** Plantes médicinales des régions tempérées, Edition Masson.
- ♣ **Bensebia O., Barth D., Bensebia B., Dahmani A. (2009)** Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosemary: effect of extraction parameters and modeling. *The Journal of supercritical fluids*, Vol. 49, p.p. 161-166.
- ♣ **Benzie I.F., Strain J. (1996)** ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- ♣ **Berrin Bozan, Goksel Tosun, Derya Ozcan (2008).** Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxidant activity. *Food chemistry*, 209, p.p. 426-430.
- ♣ **Blois M.S. (1958)** Determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, p.p. 1199-1200.
- ♣ **Boelens M.H. (1985)** The essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. *perfumes Flavors*, Vol. 5, N°.10, p.p. 21-37.
- ♣ **Bouhoun Ali H., Laoufi M. (2010)** Conception, réalisation et mise en œuvre d'une installation semi pilote pour l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles. Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* L., projet de fin d'étude, ENP, Département de Génie chimique, 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.
- ♣ **Braga P.C, Dal Sasso M., Culici M., GaSastri L., Marceca M.X., Guffanti E.E.** on in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*, Vol. 76, p.p. 61 - 68.
- ♣ **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, vol 28, p.p. 25-30.
- ♣ **Bruneton J. (1993)** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 8<sup>ème</sup> édition, *Tech & Doc-Lavoisier*, Paris.
- ♣ **Bruneton J. (1995)** Pharmacologie, phytochimie, plantes médicinales. *Tech & Doc-Lavoisier*, Paris 526 P.

- ♣ **Bruneton J. (1999)** Pharmacosie, phytochimie, plantes médicinales. *Tech & doc-Lavoisier*, Paris 585 P.
- ♣ **Bruneton J. (2009)** Pharmacognosie, phytochimie, plante médicinale, 4ème édition, *Tech & Doc-Lavoisier*, Paris, 570 p.
- ♣ **Caccionni D., Guizzardi M., Biondi D., Agantio R., Guisepe R. (1998)** Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on penicillium digitatum and penicillium italicum. *International J. Food Microbiol.* 43(12), p.p. 73-79.
- ♣ **Chalchat J.C., Garry R.P., Michet A., Benjilali B., Chabat J.L. (1993)** Essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The chemical composition of oils of various origins (Marocco, Spain, France). *Journal of Essential Oils Research*, 5, p.p. 613-618.
- ♣ **Chamel A., Gaillardon P., Gauvrit C. (1991)** Les herbicides: modes d'action et principes d'utilisation. Rene Scalla INRA. 7 - 31.
- ♣ **Charchari S., Boudina N., Benhalla A. (2011)** 4ème Symposium International sur les plantes aromatiques et médicinales, Mohammedia, Maroc, 12-13 Mai 2011.
- ♣ **Chaumont J.P., Leger D. (1989)** Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin. Relation structure –activité. *Plant Med. Phyto.* 23(2), p.p. 124-126.
- ♣ **Chen J., Dickinson E. (1995)** Food Hydrocolloids, 9, p. 35.
- ♣ **Chen Q., Shi H., Ho C-T. (1992)** Effects of rosmmary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity, *J am oil chimsoc* 69, p.p. 999-1002.
- ♣ **Clarck R.O.J, Menery R.C., (1980)** Environmental and cultural factors affecting de yield and composition of peppermint oil (*Mentha pepireta*), XIII congrés international des huiles. France, N° special.
- ♣ **Cohen M. (2002)** Stress oxidant, glycation protéique, vieillissement et maladies liées à l'âge. *La phitothérapie européenne*, Vol. 6, p.p. 18 - 26.
- ♣ **Conner D.E (1993)** Naturally occurring compound: antimicrobials in food. Ed. Davidson, New York, 468p.
- ♣ **Cuvelier 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.*, Vol. 73, p.p. 645-652.

- ♣ **Dagnelle J.P. (1981)** Principe d'expérimentation, Ed. Presses agronomiques de Gembloux, Belgique.
- ♣ **De Gaulejac Saint-Cricq, Provost N., Vivas N. (1999)** Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47, p.p. 425-431.
- ♣ **Dellacassa E., Lorenzo D., Moyna P., Frizzo C.D., Atti-Serafini L., Dugo P. (1999)** *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential Oils from the South of Brazil and Uruguay. *Journal of Essential Oils Research*, Vol. 11, p.p. 27-30.
- ♣ **Dobрева A., Kovatcheva N. (2007)** Travaux scientifiques de l'Université des Technologies Alimentaires, vol. LV, N°1, p.p. 303 -307, Polvdiv, Bulgarie.
- ♣ **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* Vol52, p.p. 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*. Vol. 133, p.p. 1286-1290.
- ♣ **Ducerf G. (2007)** L'encyclopédie des plantes bio-indicatrices, Alimentaire et médicinales, Guides de diagnostic des sols, Volume 2, édition promonature Fiche n° 454 « Romarin », 251p.
- ♣ **Edris A.E. (2007)** Pharmaceutical and therapeutic potentiels of essential oils and their individual volatile constituents. *Phytotherapy research*, Vol. 21, p.p. 308 - 323.
- ♣ **Escuder O. (2007)** Plantes médicinales mode d'emploi, Les reconnaître dans la nature, les utiliser, les cultiver au jardin, Ed Eugen Ulimer, 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, 4-4.
- ♣ **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*, Vol. 50, p.p. 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- 115.
- ♣ **Fluck H. (1963)** Chemical Plant Taxonomy, T. Swain Academic, London.
- ♣ **Franchomme P., Pénoel D. (1990)** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Ed. Roger Jallois. Limoges. 445 p.
- ♣ **Gantchev G., Petkov L., Koupenov L. (1978)** Travaux scientifiques de l'Université des Technologies Alimentaires, vol. 25, N3, pp. 193- 196, Polvdiv, Bulgarie.
- ♣ **Gilly G. (2005)** Les plantes aromatiques et huiles essentielles à grasse : botanique, culture, chimie, production et marché. Ed l'Harmattan, Paris, 405 p.
- ♣ **Gokhale N. Masada Y. (1997)** Proceedings of VII International congress of Essential Oils, Singapore.
- ♣ **Granger R., Passet J., Geneviève A. (1973)** L'essence de *Rosmarinus officinalis* L.: influence du mode de traitement du matériel végétal. Parfum cosmétique. Savon de France, Vol. 3, N°. 6, p.p. 307- 312.
- ♣ **Guenther C. (1972)** The Essential Oils, Tome 1, Ed. Krifger.
- ♣ **Gueorguiev E. (1995)** Technologie des produits aromatiques naturels et synthétiques, Ed. Zemizdat, Sofia.
- ♣ **Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (1994)** Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press, Oxford, UK.
- ♣ **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.
- ♣ **Hernandez Ochoa L.R. (2005)** Substitution des solvants et matières actives de synthèses par un combine «solvant/actif» d'origine végétale, thèse de doctorat : L'institut polytechnique de Toulouse, octobre2005.
- ♣ **Hua Li., Xiaoyu Wang, Peihong Li., Yong Li., Hua Wang, (2008)** Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6), 67-73.
- ♣ **Huang D., Ou B., Prior R.L. (2005)** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

- ♣ **Jiao Z., Liu J., Wang S., (2005)** Antioxidant Activities of Blackberry Pigment Extract. *Food Technology and Biotechnology*, Zhengzhou, v. 43, n. 1, p. 97-102
- ♣ **Kocchilin-Ramonatxo C. (2006)** Oxygen oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*, Vol. 20, p.p. 165-177.
- ♣ **Koller E. (2001)** Aide-mémoire de l'ingénieur, Ed. DUNOD, Paris, pp58-59.
- ♣ **Krägel J., Wüstneck R., Husband F., Wilde P., Makievski A., Grigoriev D., Li J. (1999)** *Colloids and Surfaces B*, 12, p. 399.
- ♣ **Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. (1998)** The synergistic preservative effects of essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora- *Letter Applied Microbiology*, Vol. 26, N° 3, p.p. 209- 214.
- ♣ **Lardy J.M., Haberkorn V. (2007)** Les huiles essentielles: principes d'utilisation. *Kinesither Review*, N° 61, p.p. 18-23.
- ♣ **Lawrence B. (1995)** *Progress in Essential Oils*. Perfumer and Flavorist, 20, 47-54.
- ♣ **Lucchesi E.M. (2005)** Extraction sans solvant Assistée par Micro-ondes: Conception et Application à l'extraction des huiles essentielle. Thèse de doctorat, Université de la Réunion. 143 p.
- ♣ **Makris D.P., Boskou G., Andrikopoulos N.K. (2007)** Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, 98, 2963-2967.
- ♣ **Marin M., Koko V., Duletic-Lausevic S. (2006)** Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry, *South African Journal of Botany*, 72: 378–382.
- ♣ **Marion D. (2005)** Structure, fonction biologique et technologique des protéines de transfert de lipides; Unité de Biopolymères Interactions Assemblages; INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, Angers-Nantes.
- ♣ **Maruyama N., Sekimoto N., Ishibashi H. (2005)** Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *Journal of inflammation*. Vol. 2, p.p. 1-11.
- ♣ **Mateus E.M, Lopes C., Nogueira T. (2006)** Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal, *Silva Lusitana* 14(2): 203 - 217, Portugal.

- ♣ **Minkov E., Mihailova D., Trandafilov T. (1967)** Die Pharmazie, vol. 22, pp 213-215.
- ♣ **Mizrahi I. Juarez M. A, Bandoni A. L (1991)** The essential oil of *Rosmarinus officinalis* growing in Argentina. *Journal of Essential Oils Research*, 3, p.p. 11-15.
- ♣ **Moll M., Moll N. (1998)** Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, Paris, 218 p.
- ♣ **Molyneux P. (2004)** The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26 (2), p.p. 211-219.
- ♣ **Moreno S., Scheyer T., Romano C. S., Vojnov A., (2006)** Free Radical Research, 40(2): p.p. 223–231.
- ♣ **Munne-Bosch S., Alegre L. (2000)** Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210: p.p. 925–931.
- ♣ **Munne-Bosch S., Schwarz K., Alegre L. (1999)** Enhanced formation of a-tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water-stressed rosemary plants. *Plant Physiol* 121: p.p. 1047–1052.
- ♣ **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), p.p. 895-902.
- ♣ **Paris R.R., Moyse H. (1976)** Matière médicale, Ed Masson, Paris.
- ♣ **Paume M-C. (2008)** Sauvages et médicinales Plante remèdes pour nos petits maux, Éd Édisud, Romarin, p 212.
- ♣ **Pellecuer J., Roussel J.L., Andary C. (1980)** Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. *Rivista Italiana Essenzo (EPPOS)*. 23, p.p. 45-50.
- ♣ **Penchev P.I. (2010)** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, Doctorat de l'université de Toulouse, Génie des Procédés et de l'Environnement.
- ♣ **Perrot E. (1968)** Plantes médicinales, Tome 1, Ed St Hubin D'Escroville, Paris.
- ♣ **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: p.p. 1645-1651.

- ♣ **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2000)** Antioxidant in food: practical applications. Ed. Woodhead, 388 p.
- ♣ **Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001)** Antioxidant in food: practical applications. Ed. Woodhead, p 17, p.p. 43-44.
- ♣ **Popovici C., Saykova I., Tylkowski B. (2010)** e-Revue de Génie Industriel, Revue électronique internationale pour la science et la technologie, N°4.
- ♣ **Porter N. (2001)** Essential oils and their production. Corp & Food Research, N°. 39.
- ♣ **Quezel P., Santa S. (1963)** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris, CNRS, Tome 1 et 2, 1170 p.
- ♣ **Rao L.J., Singh M., Raghavan B., Abraham K.O. (1997)** Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Impact of drying on its flavor quality. Journal of Food Quality, 21, p.p. 107-115.
- ♣ **Raskin (2003)** Chémotype ou race chimique, Edition du Laboratoire Orau Honnelles, Belgique.
- ♣ **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice- Evans C. (1999)** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26, p.p. 1231-1237.
- ♣ **Reverts R.F. (2006)** Esau's Plant Anatomy, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc.
- ♣ **Ricardo da Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S. (1991)** Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, p.p. 549-1552.
- ♣ **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, p.p. 507-514.
- ♣ **Robert G. (2000)** Les sens du parfum. Ed Osman Eroylls, Paris, 224 p.
- ♣ **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., Larrauri Jose A., Saura-Calixto F. (1998)** A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), p.p. 270-276.
- ♣ **Sarni-Manchado P., cheynier V. (2006)** Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Tec & Doc - Lavoisier, 368 p.
- ♣ **Scherer R., Godoy H.T. (2009)** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, p.p. 654-658
- ♣ **Sell C. S. (2006)** The chemistry of fragrance. From perfumer to consumer. Ed. *Royal society of chemistry*. Cambridge, 329 p.
- ♣ **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: p.p. 7749 -7759.
- ♣ **Sharma Om P., Bhat T.K. (2009)** DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113 (4), p 1202.
- ♣ **Sharma S., Sangwan N.S., Sangwan R.S. (2003)** Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current science*, Vol.84, N°. 25, p.p.544\_550
- ♣ **Sherwin E.R. (1976)** Antioxydants for vegetable oils. *Journal of American oil chemical society*, Vol.53, p.p.340 – 436
- ♣ **Silou T., Taty-Loumbou F., Chalchat J.C. (2002)** Etude de l'effet du séchage solaire sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles d'Eucalyptus citriodora. *Ann. Fals. Exp. Chim. Toxi.*, Vol. 95 n° 960. p.p. 287-301.
- ♣ **Sivropoulou A., papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1996)** Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 44, p.p. 1202-1205.
- ♣ **Smallfield B. (2001)** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Corp & food Research*, N°.45, 4p.
- ♣ **Spiro M., Chen S.S. (1994)** Kinetics of solvent extraction of essential oil from rosemary leaves, Flavour, *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, Vol. 29 N°4
- ♣ **Staikov V., Zotovitch G. (1963)** *Rivista Italiana*, N° 12, p.p. 547-549.
- ♣ **Stevens P.J.G, Baker E.A (1987)** *Pest. Sci.* 19, 265-281.

- ♣ **Stolzenberg G.E (1989)** Adjuvants and Agrochemicals. Ed. Chow P.N.P, Boca Raton, Floride, USA, Vol.1, p.p. 17-25.
- ♣ **Svoboda K.P., Deans S.G. (1992)** A Study of the Variability of Rosemary and Sage and their Volatile Oils on the British Market: their Antioxidative Properties. *Flavour and Fragrance*
- ♣ **Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., Dommes J., 2009** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, p.p. 1226-1233.
- ♣ **Tadros T. F. (1994)** Surfactant in Agrochemicals, Vol. 54, Ed. Marcel Dekker, New York, p.p. 101-102.
- ♣ **Tamura H., Yamasaki K., Isomoto K., Yoshikawa H. (2002)** Effect of the polyoxyethylene chain length of Triton X surfactants on the adsolubilisation of reconstituted wax model compound, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(2), p.p. 293-297.
- ♣ **Telpon T (2003)** ABC des huiles essentielles. Ed. Grancher, 358 p.
- ♣ **Teuscher, Anton R., Lobstein A. (2005)** Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Lavoisier, Paris, 522p
- ♣ **Tewari R., Virmani O. P. (1987)** Chemistry of Rosemary Oil: A Review. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 9, p.p. 185-197.
- ♣ **Thompson J.D., Chalchat J.C., Michet A., Linhart Y.B., Ehlers B. (2003)** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of chemical Ecology*, Vol. 29, p.p. 859-880.
- ♣ **Tifaoui F., Si Mehand M. (2007)** Mise en oeuvre d'une installation d'extraction solide/vapeur et solide/liquide à l'échelle semi-pilote. Projet de fin d'études, ENP, Département Génie Chimique, Alger.
- ♣ **Trandafilov T., Minkov E. (1969)** Die Pharmazie, vol.24, p.p. 327-328.
- ♣ **Tuker A.O., Maciarello M.J. (1986)** The essential oils of some rosemary cultivars. *Flavour and Fragrance Journal*, 1, p.p. 137-142.
- ♣ **Varags I., Sanz I., Prima-Yufer E. (1999)** Antimicrobial and antioxidant compounds in the nonvolatile fraction of expressed range essential oil. *Journal of food protection*, vol. 62, N°:8, p.p. 929-932
- ♣ **Vareltzis K., Koufidis D., Gavriliidou 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.
- ♣ **Viollon C., Chaumont J.P. (1994)** Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 128(3), p.p. 151-153.
  - ♣ **Von Rechenberg C. (1910)** Théorie de séparation de l'huile étherée par distillation, Ed. Selbot.
  - ♣ **Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W. (2004)** New approaches for studying and exploiting an old protuberance: the plant trichome. *Annals Botany*, Vol.93, N°.01, p.p.3-11.
  - ♣ **Wang, J.W., Hashimoto K., Shibamoto T. (1995)** antioxidant activities of rosmarinic acid and vitamin E in model meat system, *J agric food chim* 43: p.p. 2707-2712
  - ♣ **Wenkert E., Fuchs A., McChesney J.D. (1965)** Chemical artifacts from the family *labiatae*, *J. Org. Chem.* 30: p.p. 2931-2934.
  - ♣ **Wichtl M., Anton R. (2003)** Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème édition, Tec & Doc.
  - ♣ **Willem J.P. (2002)** Les huiles essentielles: médecine d'avenir. Ed. Dauphin, Paris, 311 p.
  - ♣ **Yesil Celiktas O., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C. (2007)** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food chemistry*, Vol. 100, p.p.553-559.
  - ♣ **Yun Suk Huh, Tae Hee Hong, Won Hi Hong (2004)** Effective extraction of oligomeric proanthocyanidin (OPC) from wild grape seeds. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 9(6), p.p. 471-475.
  - ♣ **Zheng, W. & Wang, S.Y. (2001)** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49: p.p. 5165-5170.

# *Webographie*

- [1] Site web: [www.abcdelanature.com/huiles-essentielles-qz.html](http://www.abcdelanature.com/huiles-essentielles-qz.html). (Consulté le 10.06.2012)
- [2] Site web: [www.passeportsanté.net](http://www.passeportsanté.net). (Consulté le 12.06.2012)
- [3] Site web: [www.agro-média.fr](http://www.agro-média.fr). (Consulté le 05.06.2001)
- [4] Site web: [http://fr.wikipedia.org/wiki/Appareil\\_de\\_Dean\\_Stark](http://fr.wikipedia.org/wiki/Appareil_de_Dean_Stark). (Consulté le 26.05.2012)
- [5] Site web: <http://www.aor.ca> Advanced Orthomolecular Research Inc (Consulté le 13.06.2012).

