

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



لمدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique

Département Génie Chimique

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

Thème

**Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.: extraction,
composition chimique, propriétés physiques et antimicrobiennes**

Proposé et dirigé par :
Pr. S. CHARCHARI

Etudié par :
M. ARAB Saïd
M. BEDDAR Boualem

Soutenu le 29 Juin 2011 devant le jury composé de :

M. T.AHMED ZAID
M. E-H. BENYOUSSEF
Mme A.MEFTI
Mme S. CHARCHARI

Professeur à l'ENP
Professeur à l'ENP
Maître de conférences à l'ENP
Professeur à l'ENP

Président
Examineur
Examinatrice
Rapporteur

Promotion : Juin 2011

REMERCIEMENTS

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.

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. AHMEDZAÏD, Professeur à l'ENP de nous avoir fait honneur de sa présence en qualité de président de jury d'évaluation de notre travail.

Pour avoir accepté de faire partie de notre jury de soutenance, Monsieur E-H. BENYOUSSEF, Professeur à l'ENP et Madame A. MEFTI, Maître de Conférences à l'ENP, veuillez trouvez ici le témoignage de nos remerciements les plus distingués.

Nous tenons à témoigner notre reconnaissance à Monsieur A. NEHITI, technicien au département de génie chimique de l'ENP, ainsi qu'à Monsieur B. ZMIT, Madame N. BERRAKI et Madame N. AIT OUFFROUKH, du laboratoire de microbiologie à l'entreprise Flash, sans qui ce travail n'aurait pu se dérouler dans des conditions aussi favorables.

DEDICACES

A mes parents et mes grands parents, pour leur amour, soutien, sacrifices,..., à qui je dois tout.

A toute ma famille.

A mes amis de ma région natale, Seddouk.

A mes amis de l'ENP.

A ceux qui me sont chers.

Je dédie ce modeste travail...

BOUALLEM

DEDICACES

J'avais assez pensé à leurs offrir quelque chose en signe de reconnaissance pour leurs sacrifices et encouragements durant toutes ces années, cette fois c'est l'aubaine : à toi papa et à toi maman que je dédie ce travail.

Je dédie ce travail:

A la mémoire de mes grands parents.

A mes frères tant aimés : Rachid, Mourad et Idir.

A mes adorables sœurs : Sabrina ainsi qu'à Nadia et son fils Anis.

A toute la famille ARAB.

A vous aussi mes amis de l'ENP, je tiens à vous dire que jamais je n'oublierai aucun de vous.

A mon binôme Boualem pour sa persévérance et son sens d'organisation, qui nous ont permis d'accomplir notre projet à temps.

A toi aussi Ali, pour ton aide précieuse.

A vous aussi Arezki et Noureddine, les futurs chercheurs, pour vos contributions.

Aux amis de mon village natal Aghbala.

Said

الزيت الأساسي لهبنة إكليل الجبل: استخراج, التركيبة الكيميائية, الخصائص الفيزيائية والنشاط الميكروبيولوجي.

ملخص: يتضمن هذا العمل عملية استخراج الزيت الأساسي من نبتة إكليل الجبل بطريقة الانجذاب ببخار الماء, على مستوى وحدة نصف صناعية. مخطط تجارب بثلاثة مستويات ذات معاملين أ و هما كمية المادة النباتية و سرعة تدفق بخار الماء, سمح لنا بوضع نموذج رياضي يصف تغيير المرودود بدلالة المعاملين. الدراسة الإحصائية لهذا النموذج بيونامج ستاتغرافيكس سانتريون 15, تبين أنه يصف بدقة الطريقة المستعملة. تم استخراج شروط العمل التي تعطي لنا ذروة المرودود من النموذج الرياضي, بطريقة تحليلية و ممثلة بمساحة إجابة. تجارب استخراج الزيت الأساسي, باستعمال مادة فعالة أو بدونها, أقيمت في الشروط العليا. تم تعيين التركيبة الكيميائية للزيوت المستخرجة بطريقة التحليل في الحالة الغازية و كذلك تم تعيين النشاط البيولوجي إزاء ثلاثة أنواع من الجراثيم و خميرة. الكثافة و إشارة الانكسار, المعينة بالطرق المعتادة, مطابقة تماما مع المعايير المتعاملة بها.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية, إكليل الجبل, الانجذاب ببخار الماء, مخطط تجارب, مادة فعالة, التركيبة الكيميائية, النشاط الميكروبيولوجي.

Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.: extraction, composition chimique, propriétés physiques et antimicrobiennes.

Résumé : Ce travail porte sur l'extraction, par entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle semi pilote, de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. Le plan d'expériences à trois niveaux de deux paramètres, en l'occurrence, la masse de la matière végétale et le débit de vapeur d'eau, a permis d'établir un modèle mathématique donnant l'évolution du rendement en huile, en fonction de ces deux paramètres. L'analyse statistique du modèle, menée à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XV, a montré qu'il décrit correctement le comportement du système étudié. Les conditions opératoires maximisant le rendement ont été déterminées, à partir de l'équation du modèle mathématique, par la méthode analytique et illustrées par la surface de réponse. Des essais d'extraction, avec et sans traitement avec un tensioactif, ont été réalisés dans les conditions optimales. La composition chimique des huiles ainsi obtenues a été déterminée par CPG et leur activité, vis-à-vis de trois bactéries et une levure, mis en évidence par les méthodes d'antibiogramme et de micro-atmosphère. Les densités et les indices de réfraction de l'ensemble des échantillons, déterminés par les méthodes d'usage, sont conformes aux normes en vigueur.

Mots clés: Huile essentielle, *Rosmarinus officinalis* L., entraînement à la vapeur d'eau, plan d'expérience, tensioactif, composition chimique, activité antimicrobienne.

Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.: extraction, chemical composition, physical and antimicrobial properties

Summary: This work concerns the extraction, by steam distillation on a pilot scale, of the *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. The experimental design with three levels of two parameters, namely, the mass of the vegetable matter and the steam flow, permitted to establish a mathematical model, giving the essential oil yield evolution, according to these two parameters. The statistical analysis of the model, carried out using the software Statgraphics Centurion XV, showed that it correctly describes the behavior of the studied system. The operating conditions maximizing the yield were determined, starting from the mathematical model equation, by the analytical method and were illustrated by the surface response. Extraction tests, with and without treatment with non ionic surfactant aqueous solution, were carried out under the optimal conditions. The chemical composition of obtained oils was determined by CPG and their activity, with respect to three bacteria and to yeast, was highlighted by the antibiogram and micro-atmosphere methods. The densities and the indices of refraction of the whole of the samples, determined by the methods of use, are in conformity with the standards.

Key words: Essential oil, *Rosmarinus officinalis* L., steam distillation, experimental design, surfactant, chemical composition, antimicrobial activity.

Table des matières

Introduction	01
Chapitre I : Etude bibliographique	
I.1. Les huiles essentielles	02
I.1.1. Historique	02
I.1.2. Définition	03
I.1.3. Localisation	04
I.1.4. Propriétés	04
I.1.5. Composants chimiques	07
I.1.6 Intérêt	07
I.1.7.Procédés d'extraction	08
I.2. Le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau	09
I.2.1. Schéma du principe	09
I.2.2. Mécanisme	10
I.2.3. Théorie	12
I.2.4. Extraction des huiles essentielles en présence de tensioactif	13
Chapitre II : Matériels et méthodes	
II.1. Matière végétale : <i>Rosmarinus officinalis</i> L	18
II.1.1. Historique	18
II.1.2. Utilisations	18
II.1.3. Description	19
II.1.4. Classification botanique	20
II.1.5. Structure sécrétrice du <i>Rosmarinus officinalis</i> L	20
II.1.6. Composition	23
II.1.7. Chémotypes du <i>Rosmarinus officinalis</i> L	23
II.1.8. Matière végétale utilisée	25
II.2. L'installation de l'entraînement à la vapeur d'eau	27
II.3. Tensioactif utilisé	29
II.4. Protocole expérimental	30

II.5. Plan d'expérience et modélisation mathématique	30
II.5.1. Réponse	31
II.5.2. Facteur	31
II.5.3. Domaine d'étude	31
II.5.4. Surface de réponse	32
II.5.5. Coordonnées centrées réduites	33
II.5.6. Notion de modélisation mathématique	33
II.5.7 Plan factoriel complet à trois niveaux de deux paramètres	34
II.6. Logiciel Statgraphics Centurion XV	34
II.7. Analyse par chromatographie en phase gazeuse	35
II.7.1 Chromatographe	35
II.7.2. Mode de fonctionnement	36
II.7.3. Conditions opératoires d'analyse par CPG	36
II.8. Détermination des propriétés physiques et biologiques de l'huile essentielle	37
II.8.1. Densité	37
II.8.2. Indice de réfraction	37
II.8.3. Activité antimicrobienne	37

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Taux d'humidité de la matière végétale	41
III.2. Mise en œuvre de l'installation	41
III.2.1. Mesure des débits de vapeur d'eau à blanc (extracteur vide)	42
III.2.2. Mesure des débits de vapeur d'eau au cours des extractions	46
III.3. Optimisation par planification des expériences de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	49
III.3.1. Les paramètres à optimiser et leurs domaines	49
III.3.2. Plan expérimental et établissement du modèle mathématique	49
III.3.3. Effets individuels et conjugués des paramètres	51
III.3.4. Evaluation statistique du modèle mathématique	52
III.3.5. Optimisation	53
III.4. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., en absence et en présence d'un tensioactif	55
III.5. Composition chimique des huiles essentielles du <i>Rosmarinus officinalis</i> L., obtenues par entraînement à la vapeur d'eau avec et sans tensioactif	56

III.6. Propriétés physiques et biologiques de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i>	
L.....	60
III.6.1. Aspect	60
III.6.2. Indice de réfraction	60
III.6.3. Densité	61
III.6.4. Activités antimicrobiennes	61
Conclusion	67
Bibliographie	69

Liste des figures

Figure I.1 : Schéma du principe de l'entraînement à la vapeur de l'eau.....	10
Figure II.1 : Vue d'ensemble du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	19
Figure II.2 : Micrographie lumineuse des trichomes non glandulaires de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	21
Figure II.3 : Trichome pelté bicellulaire de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Gr : 100 x 3.2).....	21
Figure II.4 : Trichome pelté pluricellulaire de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Gr : 100 x 3.2).....	22
Figure II.5 : Micrographie lumineuse des trichomes glandulaires de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	22
Figure II.6 : Trichome pelté de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. avant (A) et après (B) hydrodistillation	23
Figure II.7 : Appareil de Dean et Stark.....	26
Figure II.8 : Schéma de l'installation d'extraction de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. par entraînement à la vapeur d'eau	27
Figure II.9 : Ruban chauffant.....	28
Figure II.10 : Domaine du facteur	31
Figure II.11 : Domaine d'étude	32
Figure II.12 : Surface de réponse.....	32
Figure II.13 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse.....	35
Figure II.14 : Colonne capillaire.....	35
Figure II.15 : Chromatogramme	36
Figure III.1 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, sans isolation du col de cygne, pour le niveau inférieur.....	42
Figure III.2 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, sans isolation du col de cygne, pour le niveau de base.....	42
Figure III.3 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, sans isolation du col de cygne, pour le niveau supérieur.....	43
Figure III.4 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, avec isolation du col de cygne, pour le niveau inférieur.....	44

Figure III.5 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, avec isolation du col de cygne, pour le niveau de base.....	44
Figure III.6 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, avec isolation du col de cygne, pour le niveau supérieur.....	45
Figure III.7 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des extractions de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L, pour le niveau inférieur.....	46
Figure III.8 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des extractions de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L, pour le niveau de base.....	47
Figure III.9 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des extractions de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L, pour le niveau supérieur.....	47
Figure III.10 : Diagramme de Pareto.....	51
Figure III.11 : Effets individuels des paramètres sur le rendement en huile essentielle	51
Figure III.12 : Effet conjugué des deux paramètres sur le rendement en huile essentielle ...	52
Figure III.13: Surface de réponse estimée	54
Figure III.14: Iso-contours de la réponse estimée	54
Figure III.15: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., obtenu par entraînement à la vapeur d'eau sans utilisation de tensioactif.....	56
Figure III.16: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., obtenu par entraînement à la vapeur d'eau avec utilisation de tensioactif.....	57
Figure III.17 : Antibiogramme des deux échantillons d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif, vis-à-vis d' <i>E. Coli</i>	62
Figure III.18 : Antibiogramme des deux échantillons d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif, vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
Figure III.19 : Antibiogramme des deux échantillons d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L., obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif, vis-à-vis du <i>Staphylococcus aureus</i> ...	62
Figure III.20 : Antibiogramme des deux échantillons d'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif, vis-à-vis de la levure <i>osmophile</i>	63
Figure III.21 : Méthode de microatmosphère : activité de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. extraite sans tensioactif (échantillon 1) vis-à-vis des micro-organismes testés..	64
Figure III.22 : Méthode de microatmosphère : activité de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L. extraite avec tensioactif vis-à-vis des micro-organismes testés.....	65

Liste des tableaux

Tableau I.1 : HLB des tensioactifs	15
Tableau II.1 : Chémotypes de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	24
Tableau II.2 : Propriétés physico-chimiques du tensioactif utilisé.....	29
Tableau III.1 : Taux d'humidité de la matière végétale utilisée.....	41
Tableau III.2 : Analyse statistique de mesures des débits de vapeur lors des essais à blanc sans isolation du col du cygne.....	43
Tableau III.3 : Analyse statistique de mesures des débits de vapeur lors des essais à blanc avec isolation du col du cygne	45
Tableau III.4 : Analyse statistique de mesures des débits de vapeur d'eau au cours des extractions par entrainement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	48
Tableau III.5 : Niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser	49
Tableau III.6 : Conditions opératoires des essais programmés par le plan factoriel des expériences 3^2 et les rendements R en huile essentielle obtenus	50
Tableau III.7 : Evaluation statistique du modèle.....	53
Tableau III.8 : Valeurs optimales des deux paramètres	53
Tableau III.9 : Indices de rétention, teneurs relatives, en %, des composés identifiés dans les échantillons d'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> L. obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif ...	58
Tableau III.10 : Teneurs relatives, en %, des classes chimiques des composés identifiés dans les huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. obtenues sans (Echantillon 1) et avec tensioactif (Echantillon 2).....	59
Tableau III.11 : Indices de réfraction à 20°C des huiles essentielles obtenues dans différentes conditions opératoires	60
Tableau III.12 : Densités à 20°C des huiles essentielles obtenues dans différentes conditions opératoires	61
Tableau III.13 : Quantités minimales inhibitrices, QMI, obtenus par la méthode de microatmosphère	66

Introduction

Utilisées depuis des temps immémoriaux, les plantes aromatiques sont considérées comme une panacée. Les huiles essentielles extraites de ces plantes ont prouvé leur inestimable valeur pour la santé humaine, ce qui leur a fait mériter leurs places dans les officines. Ces produits naturels sont des mélanges complexes de divers composés organiques contenus dans les tissus végétaux et pouvant être récupérés par différentes techniques: entraînement à la vapeur d'eau, hydrodistillation...etc. Si ces techniques extractives ont gardé, au cours des siècles, leur principe de base, la recherche dans ce domaine s'est orientée vers des traitements particuliers du matériel végétal et l'optimisation des paramètres du procédé lui-même.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés d'optimiser le procédé d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle semi pilote de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. et de déterminer la composition, les propriétés physiques et antimicrobiennes des huiles obtenues dans les conditions optimales.

La première partie de ce travail est une étude bibliographique, relative aux huiles essentielles, au principe, mécanisme et à la théorie du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau et à l'utilisation de tensioactifs lors de l'extraction des huiles essentielles.

La présentation de la matière végétale, en l'occurrence, le romarin ou le *Rosmarinus officinalis* L., l'installation, le tensioactif utilisé, ainsi que le protocole expérimental et les différentes méthodes et outils utilisés, font l'objet du second chapitre.

La mise en œuvre de l'installation, les résultats des essais, réalisés dans le cadre de l'optimisation des paramètres du procédé par planification des expériences, la composition chimique des huiles essentielles extraites, dans les conditions optimales, avec et sans un traitement préalable avec une solution aqueuse d'un tensioactif et leurs propriétés physiques et antimicrobiennes sont présentés dans le troisième et dernier chapitre de ce travail.

Chapitre I

Etude bibliographique

I.1. Les huiles essentielles

I.1.1. Historique

L'histoire des aromates et des parfums remonte à la nuit des temps. Les huiles essentielles sont des substances extraites des plantes. Leur origine remonte à l'apparition des techniques d'extraction. Mais, ces méthodes étant plus ou moins compliquées et améliorées avec le temps.

Cependant, les trois grands berceaux géographiques de l'utilisation des plantes aromatiques sont l'Inde, la Chine et le bassin méditerranéen.

La technique la plus facile étant l'enfleurage, les huiles essentielles ont, à l'origine, probablement dû être extraites de cette manière.

En Inde, les plantes sont soit directement utilisées lors des prières, par simple combustion, soit utilisées sous forme d'huiles dans les médicaments. Cette « méthode de guérison » ne sera définie qu'en 1928, par René Gattefossé, sous le terme d'aromathérapie. Aujourd'hui cette forme de médecine est toujours employée dans différents pays.

Ainsi, en Chine, les huiles essentielles servent, conjointement à l'acupuncture, aux soins du malade. La médecine chinoise comptabilise environ 8 000 formules de médicaments à base de plantes. La pharmacopée chinoise est la plus vaste.

Puis, en Égypte, au temps des pharaons, les huiles essentielles deviennent des substances d'utilisation courante. Elles font l'objet d'un véritable commerce international. Toutefois, leur utilisation dans ce pays reste particulière : grâce à leurs propriétés antiseptiques et antibactériennes, elles servent à l'embaumement lors des momifications.

Le trafic de ces essences va alors les conduire en Grèce, à Rome, à Babylone, puis en Europe. C'est dans l'empire romain que ces composés trouvent de nouvelles applications comme le parfum ou l'huile de massage, de plus leurs effets thérapeutiques sont confirmés.

Pourtant, ces huiles ne connaissent pas au cours du temps les mêmes enchantements. Vient en effet la période des sorcières et de leurs « potions » qui effrayeront les populations pour un temps. Très vite, ces substances retrouvent leur acte de noblesse grâce aux chevaliers de retour des Croisades.

Une nouvelle technique d'extraction, la distillation, inventée par Avicenne, grand médecin arabe, les accompagne. Cette technique s'implanta rapidement dans le sud de la France, en particulier à Grasse. De nombreux parfumeurs européens viennent alors s'installer dans la région et les huiles essentielles subissent un essor extraordinaire.

Depuis, de nombreuses autres méthodes d'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques ont vu le jour. [1]

I.1.2. Définition

Une huile essentielle est la sécrétion naturelle de la plante. Elle est élaborée par ses organes sécréteurs qui sont localisés dans les différentes parties des plantes et des arbres aromatiques: semence, racine, bois, feuille, fruit et fleur. [2]

D'après le dictionnaire Larousse, une « huile essentielle » est « un mélange de substances terpéniques pour la plupart. Les huiles essentielles résultent du métabolisme secondaire ; elles ont des fonctions diverses : insecticide ou éloignement des herbivores ; responsables du parfum des fleurs, elles sont utilisées dans la fabrication des parfums ». [3]

La norme AFNOR NFT 75-006, de Février 1998, a donné la définition suivante d'une huile essentielle : «Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques, par exemple, redistillation, aération ..., n'entraînant pas de changement significatif de sa composition». [4]

La 8^{ème} 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. [5]

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». [6]

I.1.3. Localisation

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles s'effectuent dans des structures histologiques spéciales, différenciées et variables suivant la famille. Ces structures sont localisées soit à la surface des différents organes de la plante, sites exogènes, soit dans des canaux ou poches, sites endogènes.

Les différents sites exogènes et endogènes sont les suivants :

- Les poils sécréteurs ou trichomes
- Les cellules épidermiques
- Les cellules sécrétrices internes
- Les poches sécrétrices
- Les canaux sécréteurs. [7]

I.1.4. Propriétés

I.1.4.1. Propriétés physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont :

- des liquides à température ambiante ;
- de consistance huileuse mais non grasse ;
- volatiles ;
- insolubles ou très peu solubles dans l'eau;
- solubles dans les huiles végétales et dans l'alcool jusqu'à un certain pourcentage ;
- de densité inférieure à celle de l'eau ;
- souvent odorantes [8]

I.1.4.2. Propriétés chimiques

- Les huiles essentielles s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient, en absorbant l'oxygène, en même temps que leur odeur se modifie, leur point d'ébullition augmente, leur solubilité diminue ;
- Les huiles essentielles réagissent avec le chlore, le brome, l'iode, avec dégagement de chaleur ;
- Les huiles essentielles peuvent se combiner avec l'eau pour former des hydrates. [9]

I.1.4.3. Propriétés biologiques [1]

Les propriétés des huiles essentielles diffèrent selon que l'essence est extraite de la fleur, la feuille, les racines ou la graine. D'une manière générale, les essences extraites des racines sont reconnues pour leur action sur le système nerveux, celles extraites des graines et des fleurs, pour leur impact sur l'ensemble du système digestif et celles issues des feuilles pour leur bienfait sur la respiration.

➤ **Propriétés Désodorisantes, parfumantes, antiseptiques et protectrices**

- En diffusion dans l'atmosphère ou diluées dans les produits de nettoyage, les huiles essentielles désinfectent, désodorisent et parfument agréablement et naturellement l'air qu'on respire ;
- Elles débarrassent l'air ambiant des germes pathogènes, cette pratique régulière prévient des affections microbiennes en renforçant les défenses immunitaires.
 - Les agrumes sont de remarquables antiseptiques ;
 - Le géranium éloigne les moustiques.

➤ **Propriétés Antibactériennes**

Les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus élevée sont les phénols: carvacrol, thymol, eugénol. Une molécule n'appartenant pas à ce groupe, mais proche par la présence d'un noyau benzénique est l'aldéhyde cinnamique (cannelle).

Bien utilisées, ces quatre molécules permettent de maîtriser la plus grande partie des infections courantes. Juste derrière les phénols on trouve les monoterpénols (alcools à 10 carbones) : géraniol, linalol, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol. Moins puissant, mais également utilisable comme antibactérien le groupe des aldéhydes : néral, géraniol, citronellal et cuminal. Les cétones présentent un intérêt dans le traitement des états infectieux : verbénone, thuyone, cryptone, menthone, D. carvone, bornéone, fenchone, mais leurs propriétés neurotoxiques et abortives les rendent délicates d'utilisation.

Dans une moindre mesure on retrouve comme antibactérien les éthers (estragole et anéthole), les oxydes, les phthalides et les hydrocarbures terpéniques. Ces derniers sont principalement utilisés en diffusion comme antiseptique atmosphérique.

➤ **Propriétés Antivirales**

Les huiles essentielles stoppent la progression virale. Dans la lutte contre les virus on retrouve en premier, comme pour les antibactériens, le groupe des dérivés hydroxylés,

phénols et monoterpénols, en sachant que les phénols sont plus puissants, mais à utiliser avec prudence. Pour l'usage à long terme les huiles monoterpénoliques sont préférables aux huiles phénoliques beaucoup plus agressives.

Le mélange de certaines huiles appliqué en friction a une action "immunostimulante" remarquable sur les infections respiratoires profondes, associé en diffusion dans l'atmosphère de l'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata*, par exemple.

➤ **Propriétés Antidouleurs**

- La douleur vive d'une migraine est anesthésiée par la menthe poivrée en application locale ;
- La douleur dentaire est éliminée par l'application de girofle sur la gencive ;
- Le cyprès calme les crampes musculaires et les rhumatismes ;
- Le niaouli calme les douleurs en engourdissant les nerfs.

➤ **Propriétés Respiratoires**

- En inhalation le niaouli a un puissant effet expectorant sur les voies respiratoires ;
- L'huile essentielle d'eucalyptus, en application cutanée, est un immunostimulant et un mucolytique (expectorant) puissant. Utilisées depuis longtemps, les HE riches en 1,8-cinéol sont très actives (*Eucalyptus globulus*, ravintsara, romarin), car elles stimulent les glandes bronchiques et mobilisent les cils de la muqueuse bronchique.

➤ **Propriétés Circulatoires**

- Le cyprès, stimulant du système circulatoire, réchauffe les mains et les pieds ;
- Le lemongrass favorise la circulation sanguine et l'élimination de l'acide lactique, il soulage, également, les douleurs musculaires et les pieds endoloris.

➤ **Propriétés Antifongiques**

Les huiles essentielles ont un grand pouvoir antifongique aérien et cutané. Les infections fongiques sont d'une actualité criante, car les antibiotiques, prescrits de manière abusive, deviennent inefficaces. Ici, en plus des groupes cités pour la lutte contre les bactéries, on utilise les alcools et les lactones sesquiterpéniques.

➤ **Propriétés Digestives**

L'huile essentielle de menthe poivrée est utilisée contre les problèmes digestifs : elle est efficace pour calmer coliques, constipation, brûlures d'estomac, indigestions et flatulences.

I.1.5. Composants chimiques

Les huiles essentielles sont constituées principalement des composés appartenant aux quatre classes chimiques suivants [10]:

- Terpènes et leurs dérivés oxygénés ;
- Hydrocarbures aliphatiques et leurs dérivés oxygénés ;
- Hydrocarbures aromatiques et leurs dérivés oxygénés ;
- Hydrocarbures contenant des atomes d'azote ou de soufre.

Les terpènes et leurs dérivés oxygénés sont les plus répandus, présents, souvent, à plus de 80% dans l'huile, alors que les dérivés d'azote et du soufre sont rares.

Les constituants des huiles essentielles peuvent être classés, selon leurs groupements fonctionnels, en classes chimiques distincts, ayant chacune des effets biologiques spécifiques.

Les principaux composants des huiles essentielles sont les suivantes [11] :

- ✓ Les hydrocarbures
- ✓ Les alcools
- ✓ Les phénols
- ✓ Les aldéhydes
- ✓ Les cétones
- ✓ Les acides et les esters

I.1.6. Intérêt [1]

I.1.6.1. En alimentaire

Les huiles essentielles donnent la saveur aux condiments (poivre, gingembre,...) et aux aromatisants (menthe, anis, oranger, thym, laurier, ...). Chacune de ces espèces doit, en effet, sa saveur à une ou plusieurs molécules aromatiques particulières entrant dans sa composition : apiol de l'essence de persil, anéthol du fenouil ou de l'anis, menthol des menthes, ... De plus, à faible dose, certaines substances ont un effet favorable sur la digestion, ce qui explique leur utilisation en liquoristerie (essence d'anis ou de badiane).

Les huiles essentielles entrent donc, pour leurs différentes propriétés, dans la composition des arômes employés de manière abondante aujourd'hui dans tous les produits alimentaires comme les plats cuisinés ou prêts à l'emploi.

I.1.6.2. En parfumerie et cosmétique

L'industrie de la parfumerie et des cosmétiques utilise d'importants tonnages d'essences, telles, celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine, de citron, ou de santal. Les huiles essentielles sont généralement utilisées en quantités très faibles dans la fabrication des crèmes anti-âge, des rouges à lèvres, des crèmes de jour, des laits de toilette, des gels, de l'huile solaire. L'enfleurage se révèle, souvent, la méthode d'extraction la plus appropriée.

I.1.6.3. En thérapeutique

Les huiles essentielles ont depuis longtemps été employées pour leurs effets thérapeutiques, notamment en aromathérapie, soit pour leurs propriétés aromatisantes (essence d'anis, d'orange amère), soit en raison de vertus curatives propres: action antiseptique des voies respiratoires des essences d'eucalyptus ou de niaouli, par exemple. Leur usage est réalisé alors par massages, par inhalations, par vaporisation ou dans le bain.

I.1.7. Procédés d'extraction

I.1.7.1. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau, consiste à déposer, dans l'extracteur, la matière végétale sur une grille perforée. La vapeur produite par un générateur de vapeur est introduite au dessous de la grille et elle entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. Le mélange des vapeurs d'huile et d'eau est condensé. L'huile est ainsi récupérée par la décantation. [12]

I.1.7.2. Hydrodistillation

Découverte au Xe siècle par Avicenne, elle est aujourd'hui la méthode d'extraction des huiles essentielles la plus utilisée et la plus répandue. Elle est employée pour les plantes peu sensibles à la chaleur, comme la lavande, convient pour le traitement des feuilles, des racines, des graines et des bois.

L'opération peut débuter par une préparation physique des matières premières, telle que le broyage, hachage, le rabotage en sciure, le trempage avec fermentation, ...

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau et à porter l'ensemble à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Les composés chimiques volatiles non miscibles à l'eau sont entraînés par la vapeur. Les vapeurs d'eau et d'huile essentielle sont condensées et l'huile est séparée des eaux de condensation par décantation. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage (recyclage) de ces derniers. L'huile essentielle brute peut alors être raffinée par distillation sous vide. [1]

I.1.7.3. Expression

Cette technique ne s'applique que pour les fruits à peau épaisse et cireuse comme les agrumes. Leurs écorces contiennent les essences dans de petites poches. Mais leur fragilité et leur sensibilité à la température, à l'oxygène, aux agents chimiques et aux acides demandent une expression, c'est-à-dire une pression effectuée à la main ou à l'aide d'une presse hydraulique. L'huile obtenue est généralement trouble en raison de la présence d'eau en suspension qu'elle contient. Elle doit, alors, être purifiée, soit par distillation, soit par filtration. Ce dernier procédé nécessite de laisser d'abord reposer la solution de façon à faciliter la séparation de l'eau puis l'essence est décantée à l'abri de l'air. [1]

I.2. Le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur est applicable aux composés peu ou pas solubles dans l'eau, dotés d'une tension de vapeur assez importante. Toutes les matières premières aromatiques naturelles ne peuvent pas donner de l'huile essentielle par ce procédé.

L'avantage de cette technique réside en l'abaissement de la température de distillation ; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition. Ainsi, des substances ayant de hauts points d'ébullition peuvent être extraites. [13]

I.2.1. Schéma du principe

Le schéma de principe du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles est présenté sur la figure I.1 suivante.

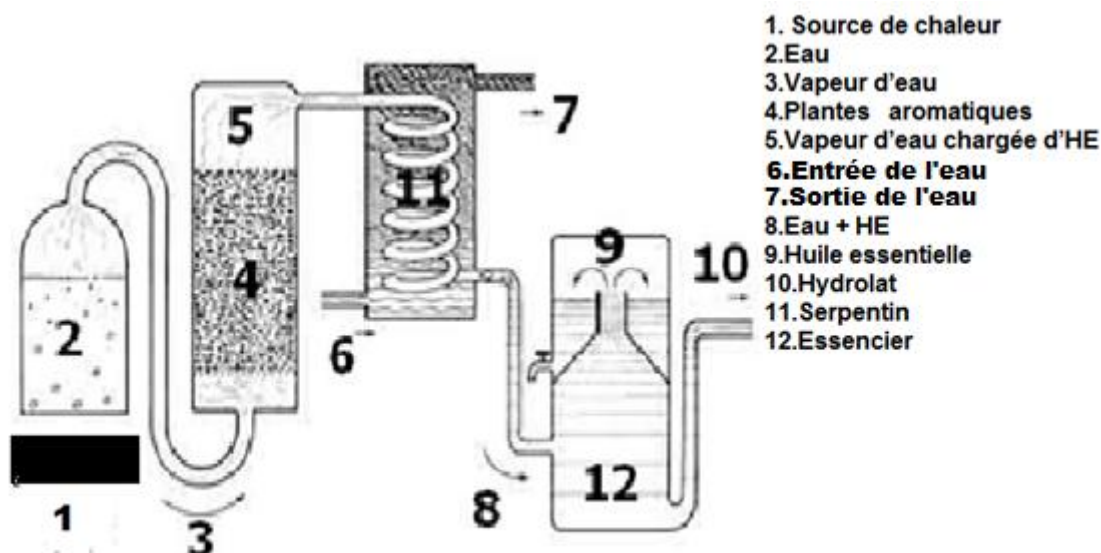


Figure I.1 : Schéma du principe de l'entraînement à la vapeur de l'eau

I.2.2. Mécanisme

Les phénomènes régissant l'entraînement à la vapeur d'eau sont complexes et très peu connus. 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 essentiels s'accumulent. [14]

Selon la théorie de Von Rochenberg [15], reprise par Guenther [16] stipule que le mode de récupération des huiles essentielles à partir des cellules végétales par l'entraînement à la vapeur d'eau, suit deux processus, l'osmose et la diffusion libre. Selon cette théorie, 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 autre étude [17], faite sur des graines confirme l'existence de deux étapes: l'osmose et la diffusion libre.

➤ **L'osmose** : dans le cas d'un matériel végétal intact, ce qui entraîne le ralentissement de la cinétique d'extraction par les parois cellulaires, ainsi les constituants distilleront dans l'ordre de leurs solubilités dans l'eau. Dans ce cas, le phénomène prédominant est l'osmose, la plus

grande partie de l'huile n'arrive à la surface qu'après une étape lente de diffusion à travers les parois cellulaires, étape qui régirait donc la vitesse d'extraction.

➤ **La diffusion libre** : dans le cas d'un matériel broyé, donc toute barrière entre l'huile essentielle et la vapeur d'eau est détruite, ainsi l'huile diffuse librement et ses constituants distillent dans l'ordre de leurs volatilités. Par conséquent, la durée totale d'extraction est considérablement réduite. Le recours au broyage est donc conseillé, car il évite les phénomènes de diffusion à cinétique lente.

D'autre part, d'après Garnero [18], il semblerait que, pour un matériel végétal intact, les composés polaires sont 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. Seule la théorie de Guenther trouverait une interprétation de ce phénomène. En effet, pour les composés oxygénés plus solubles dans l'eau, la vitesse de diffusion est plus grande. En revanche, la cinétique d'extraction des composés volatils moins solubles dans l'eau est ralentie. Ces résultats prouveraient que les composés de l'huile se solubilisent dans l'eau à l'intérieur de la plante.

Enfin, des études plus récentes [10] font état des phases suivantes de l'entraînement à la vapeur d'eau 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 la distillation. 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, opère 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.2.3. Théorie

Bien que les huiles essentielles soient des mélanges forts complexes de plusieurs constituants, mais la théorie des mélanges binaires semble convenir pour en expliquer le phénomène. [15]

• La loi de Dalton

Selon cette loi, la pression du mélange de vapeur est égale à la somme des tensions de vapeur de divers constituants du mélange. [19]

$$P_T = P_H + P_E \quad (\text{I.1})$$

En assimilant le système eau - huile essentielle à un mélange binaire de liquides non miscibles et en supposant que chaque constituant peut se vaporiser sans contrainte, la pression de vapeur système sera égale à la somme des pressions de vapeurs des constituants purs. Donc la relation (I.1) devient :

$$P_T = P_H^\circ + P_E^\circ \quad (\text{I.2})$$

Avec :

- P_T = Pression totale ;
- P_H° = Tension de vapeur de l'huile essentielle pur ;
- P_E° = Tension de vapeur de l'eau pur.

• La loi de Raoult

Selon laquelle, la pression partielle de chaque constituant de la solution est proportionnelle à sa fraction molaire en phase liquide. [19]

$$P_i = P_i^\circ X_i \quad (\text{I.3})$$

Où:

- P_i : Pression partielle du constituant i ;
- P_i° : Tension de vapeur du constituant i pur ;
- X_i : fraction molaire du constituant i en phase liquide.

La combinaison de ces deux lois nous donne respectivement la pression totale et la composition des vapeurs en fonction des pressions partielles, d'où le calcul du taux de corps entraîné appelé également rapport d'entraînement.

$$R = m_H / m_E \quad (\text{I.4})$$

Où :

- m_i : masses du constituant i ;
- R = rapport d'entraînement. [20]

La masse (m_i) de chaque constituant dans le distillat dépend de sa masse moléculaire (M_i) et de sa tension de vapeur (P_i°). Si on considère que l'eau et l'huile ne sont pas miscible le nombre de moles (n_i), selon la loi des gaz parfait, de chaque constituant en phase vapeur est proportionnel à sa tension de vapeur.

Par ailleurs, la somme ($P_e^\circ + P_h^\circ$) étant égale à la pression extérieure, il sera possible, lors de la distillation, de modifier partiellement le rapport eau/huile dans le condensât en changeant la pression de travail, la température de l'appareil s'ajuste automatiquement à celle d'ébullition du mélange. La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeurs de chacun des constituants purs est égale à la pression d'évaporation. Elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures.

I.2.4. Extraction des huiles essentielles en présence de tensioactif

Les premiers essais menés sur l'extraction des huiles essentielles par des tensioactifs sur le menthe, de lavande et de rose ont tous permis de constater une augmentation du rendement en huile de 30 à 40 % [22-25] sans changements significatifs dans la composition des huiles obtenues. 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 des pétales de rose, de *Rosa damascena* Mill et de *Rosa alba* L. [23-27]. Les auteurs constatent une augmentation du rendement en huile de 50 % pour *Rosa damascena* Mill. et de 130 à 316 % pour *Rosa alba* L. [28]. Ils attribuent cette augmentation du rendement au fait que les agents tensioactifs réduisent la tension entre la phase aqueuse et la surface hydrophobe de tissus végétaux et aussi, 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. En outre, ils préconisent la macération du matériel végétal nécessaire à un meilleur mouillage de la surface de pétale. 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 [29]. 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 [30, 31]. 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.

Les composés tensioactifs ou agents de surface, ont, du fait de leur structure, la propriété de s'adsorber aux interfaces et donc de diminuer les tensions interfaciales.

Le terme de composés amphiphiles s'applique aux molécules comportant deux parties de polarités différentes. Un tensioactif est toujours amphiphile ; par contre, un composé amphiphile n'est pas forcément tensioactif.

Les molécules tensioactives comportent deux parties de polarités différentes.

✓ *Une partie apolaire*, hydrophobe, lipophile, présentant une affinité pour les huiles (soluble dans l'huile).

✓ *Une partie polaire*, hydrophile, présentant une affinité pour l'eau (soluble dans l'eau).

La partie lipophile est constituée par une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées aliphatiques, linéaires ou ramifiées, ou aromatiques, ou encore, alkyl-aromatiques. En règle générale, le caractère hydrophobe croît avec le nombre d'atomes de carbone.

La partie hydrophile, ou tête polaire, est constituée par un ou plusieurs groupements polaires, ioniques ou non ioniques. [32]

Un agent tensio-actif est un corps qui, même utilisé en faible quantité, modifie de façon importante la tension superficielle, en particulier celle de l'eau. Cependant pour connaître leur caractère hydrophile ou hydrophobe majoritaire, on peut raisonner sur la valeur de leur HLB (balance hydrophile/hydrophobe) [33], proposée en 1949 par Griffin [34]. Cette méthode permet de déterminer des repères numériques qui chiffrent l'équilibre existant entre la partie hydrophile et la partie lipophile de la molécule de tensioactif, et qui sont liés à la solubilité dans l'eau. L'échelle varie de 0 à 40, donc, plus la valeur est élevée, plus la solubilité dans l'eau est grande.

D'après la méthode de Davies :

$$\text{HLB} = \sum \text{HLB}_{\text{groupe hydrophiles}} - \sum \text{HLB}_{\text{groupe hydrophobes}} + 7 \quad (\text{I.5})$$

Il existe des tables de HLB pour différents groupes classiques [35]. Si on obtient une HLB comprise entre 1 et 6, on a typiquement affaire à un tensioactif hydrophobe qui donnera préférentiellement des émulsions inverses. Pour une HLB supérieure à 10, il aura clairement un caractère hydrophile et donnera surtout des émulsions directes.

Le principal avantage de la HLB est son additivité, très utile lorsque deux tensioactifs doivent être utilisés en mélange pour obtenir une formulation stable. En effet, il existe une HLB requise par la phase hydrophobe pour une stabilité optimale. Par exemple, l'huile de paraffine nécessite une HLB de 11; s'il n'existe pas de tensioactif adéquat ayant cette valeur de HLB, il suffit de mélanger deux tensioactifs de manière à ce que la HLB du mélange soit à la valeur requise. En revanche, la HLB ne permet pas de tenir compte de l'ensemble des paramètres du système (température, proportion et nature de l'huile etc.). [34]

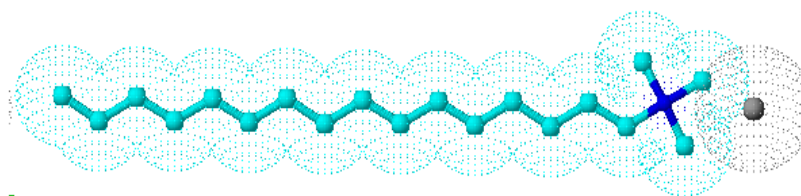
Tableau I.1 : HLB des tensioactifs [32]

HLB	application
1.5 - 3	Antimousse (eau / huile)
3 - 6	Emulsifiant
7 - 9	Agent mouillant
8 - 18	Emulsifiant (eau / huile)
13 - 16	Détergent
15 - 18	Solubilisant

❖ Les quatre classes de tensioactifs, sont les suivantes. [35]

➔ Tensioactifs cationiques

Ces tensioactifs sont susceptibles en milieu acide de fournir un cation. C'est le cas des amines protonées ou des ammoniums quaternaires :

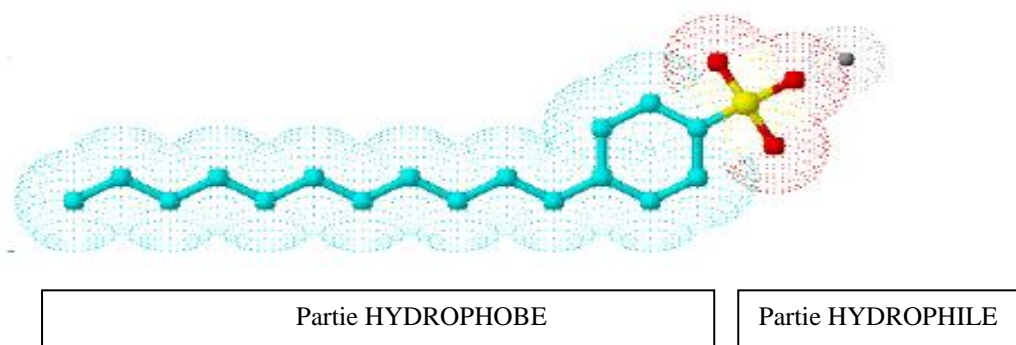


Partie HYDROPHOBE

Partie HYDROPHILE

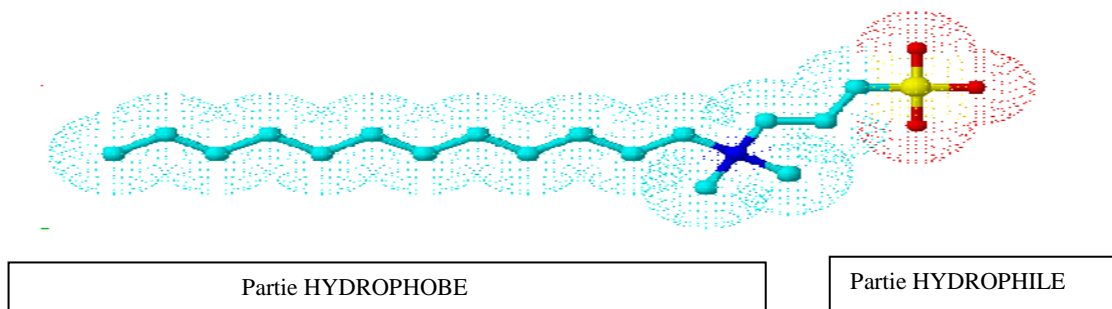
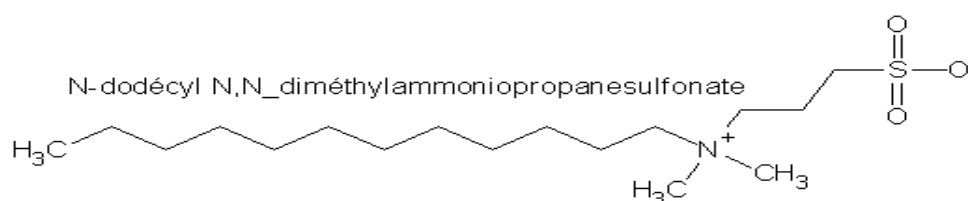
➔ Tensioactifs anioniques

Ces tensioactifs sont susceptibles en milieu acide de fournir un anion. On trouve par exemple le dodécyl-sulfonate de sodium ($C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3^- Na^+$).



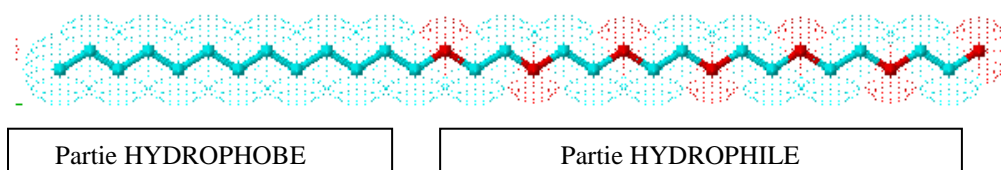
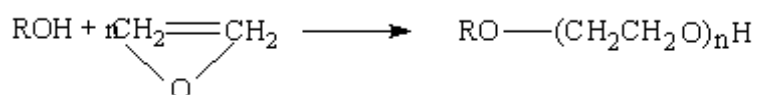
► Tensioactifs amphotères

On trouve par exemple : le N-dodécyl, N,N-diméthyl-ammonio-propan-sulfonate



► Tensioactifs non ioniques

Les molécules de ces tensioactifs ne s'ionisent pas dans l'eau et ne comportent aucune charge nette. Elles sont obtenues par polycondensation d'alcools gras et d'oxyde d'éthylène :



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 [36]. Les interactions plantes-eau induit des changements importants de la structure d'édifices supramoléculaires extracellulaires, telles les parois et les cuticules. Ces dernières étant en contact immédiat avec le milieu extérieur, leur nature chimique joue, évidemment, un rôle important dans les phénomènes d'étalement, de mouillage et de la pénétration de l'eau. Ce sont des surfaces hydrophobes, ayants un mauvais mouillage avec l'eau, mais un bon mouillage avec des solutions aqueuses contenant des agents tensioactifs convenablement choisis ce qui a justifié les premières utilisations des tensioactifs lors de l'extraction des huiles essentielles.

Chapitre II

Matériels et méthodes

II.1. Matière végétale : *Rosmarinus officinalis* L.

Le romarin, du latin « *Rosmarinus* » qui veut dire « *rosée de mer* » [37], est un arbrisseau de la famille des Lamiacées, poussant à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen, en particulier dans les garrigues arides et rocailleuses, sur terrains calcaires.[38]

Le romarin est aussi appelé : Rose marine, Encensier, Romarin des troubadours, Herbe aux couronnes. [39]

II.1.1. Historique

Le romarin fait l'objet de très nombreuses mentions historiques et légendaires. Les anciens lui vouaient une grande vénération. On s'en servait généreusement dans toutes les fêtes, qu'il s'agisse de cérémonies nuptiales, funéraires ou de célébrations profanes. 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. On mettait aussi des brins de romarin sous les oreillers pour chasser les mauvais esprits et les cauchemars.

Les Égyptiens plaçaient des rameaux de *romarin* dans la tombe des pharaons afin de fortifier leur âme. Le romarin est un symbole du souvenir et de l'amitié. Les étudiants grecs s'en confectionnaient des couronnes, qu'ils portaient durant les examens pour stimuler leur mémoire.

Durant les épidémies de peste, le romarin était très populaire : on en faisait brûler des rameaux pour purifier l'air et on portait des sachets sur soi, que l'on respirait lorsqu'on passait dans les endroits touchés par cette terrible maladie. L'histoire veut aussi que la reine de Hongrie, qui souffrait de rhumatismes chroniques, ait été délivrée de ses problèmes grâce à un remède à base de *romarin* lorsqu'elle était âgée de 72 ans. [40]

II.1.2. Utilisations

Le romarin est utilisé en parfumerie depuis très longtemps; il entre dans la composition des parfums masculins et des eaux de Cologne. [41]

Cette plante stimule le fonctionnement de la vésicule biliaire et est indiqué, à ce titre, dans le traitement de l'insuffisance hépatique et d'inflammation chronique de la vésicule. Elle agit sur les fermentations intestinales et sur les douleurs abdominales qu'elles entraînent, en calmant les spasmes d'origine digestive par son action spasmolytique sur les intestins et l'estomac. Par son effet relaxant sur les muscles lisses du système respiratoire et de la sphère

ORL, elle calme aussi la toux et contribue au confort de l'asthmatique, soigne les bronchites grâce à son huile essentielle antiseptique. [42]

Le romarin est utilisé pour ses effets détoxiquant, diurétique, expectorante, anti-inflammatoire, antinévralgique, astringent, aromatique. Utilisé en bouquet, ou en infusion dans le bain pour stimuler et tonifier l'organisme [43], il est aussi recommandé aux convalescents, aux surmenés, aux dépressifs, de même qu'aux personnes sujettes aux palpitations, aux migraines, aux angoisses et aux insomnies [39].

Le romarin agit, tant de façon externe qu'interne, sur le ralentissement de la vieillesse en piégeant les radicaux libres [41]. Il a été utilisé il y a des milliers d'années pour conserver les viandes. La capacité de conservation du romarin est comparable à celle des conservateurs commerciaux tels que BHA et BHT. Il contient des composés qui préviennent la baisse de l'acétylcholine qui survient lors de la maladie d'Alzheimer et améliore également la circulation sanguine dans le cerveau [44].

II.1.3. Description

Le romarin est un arbrisseau toujours vert de 0,50 à 1,50 m de haut aux branches couvertes d'une écorce écailleuse et fissurée portant des tiges ligneuses feuillées. Les petites feuilles coriaces sessiles persistantes, de couleur vert sombre dessus et blanchâtres dessous, sont étroitement lancéolées (presque comme des aiguilles) et à bords enroulés. Les fleurs bleu pâle maculées intérieurement de violet, à calice court en cloche et corolle longue avec deux étamines, sont en petites grappes denses axillaires en forme d'épis. Les fruits sont des tétrakènes bruns. Le romarin dégage une odeur d'encens légèrement camphrée. [39]



Figure II.1 : Vue d'ensemble du *Rosmarinus officinalis* L.

II.1.4. Classification botanique

Rosmarinus officinalis L. appartient à la famille des 110 *Labiées* qui comptent à leur tour six séries où le romarin est la 2^{ème} d'entre elles [45].

La classification botanique du *Rosmarinus officinalis* L. est la suivante [46]:

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

II.1.5. 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 [14] 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 II.2.A et II.2.B).



Figure II.2 : Micrographie lumineuse des trichomes non glandulaires de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. [14]

A: Section longitudinale des trichomes non glandulaires non ramifiés, bar=100 μ m ;
B: Section longitudinale des trichomes non glandulaire ramifiés, bar=100 μ m.

- Perrot [47] 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 [48] 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 sont localisés dans des dépressions épidermiques. Ils sont constitués d'une cellule épidermique basale, d'une large tige unicellulaire et d'une tête sécrétrice multicellulaire (figures II.3 et II.4).



Figure II.3: Trichome pelté bicellulaire de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. (Gr : 100 x 3.2) [49]

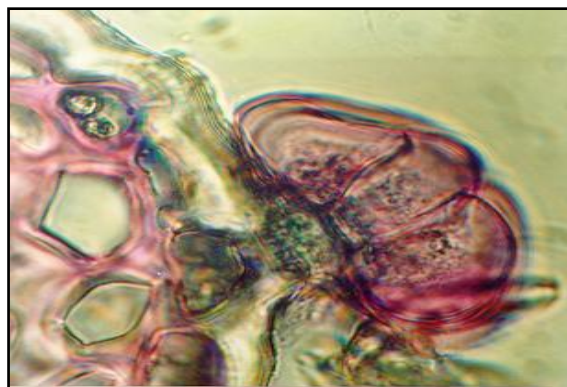


Figure II.4: Trichome pelté pluricellulaire de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L.
(Gr : 100 x 3.2) [49]

- 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 sécrétrice (figure II.5.D). 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 II.5.E).

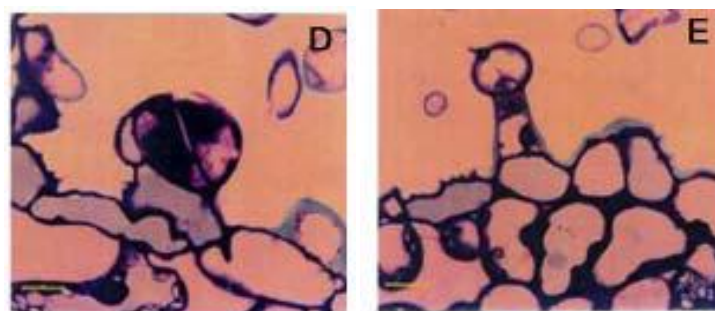


Figure II.5 : Micrographie lumineuse des trichomes glandulaires de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. [14]

D: section longitudinale d'un trichome glandulaire capité de type I, bar=100 μm ;

E: section longitudinale d'un trichome glandulaire capité de type II, bar=100 μm .

La cuticule couvrant la tête des trichomes sécréteurs est très résistante et ne peut être détruite que mécaniquement ou sous l'action des microondes [10, 48], mais pas dans les conditions de l'entraînement à la vapeur d'eau.

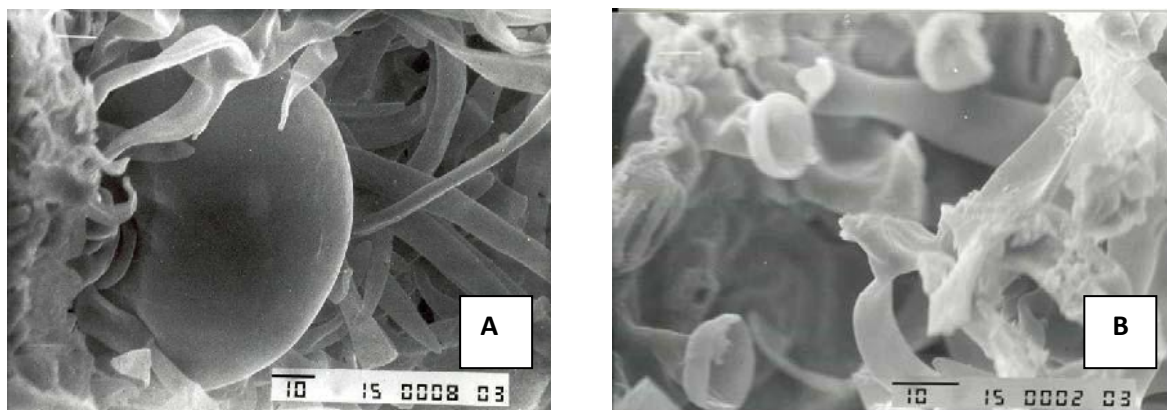


Figure II.6 : Trichome pelté de *Rosmarinus officinalis* L. avant (A) et après (B) hydrodistillation [50]

En effet, des observations à l'aide de microscope électronique à balayage des trichomes peltés du *Rosmarinus officinalis* L. avant et après hydrodistillation, illustrées par la figure II.6, montrent une déformation des cuticules des trichomes vidés de leur huile essentielle, sans que ces dernières soient rompues.

II.1.6. Composition

Les sommités fleuries et les feuilles de romarin contiennent essentiellement :

- Des flavonoïdes, comme apigénine et diosmine qui sont à l'origine de son action spasmolytique ;
- Des acides-phénoliques, en particulier de l'acide rosmarinique, puissant antioxydant, responsable de ses actions cholérétique et cholagogue ;
- Une huile essentielle, 1 à 2.5 %, à laquelle il doit son action stimulante ;
- Des tanins, des diterpènes et le rosmaricine. [39]

II.1.7. Chémotypes du *Rosmarinus officinalis* L.

M. Raskin [51] rapporte que 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 [51]:

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

A titre d'exemple, nous présentons, dans le tableau II.1, les compositions chimiques des huiles essentielles de cette plante, appartenant aux différents chémotypes.

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

Type Composés	Teneurs (%)					
	à camphre [52]	à 1,8-cinéole [53]	à verbénone [54]	à myrcène [55]	Algérie	
					[49]	[30]
α -pinène	20,21	11,37	17,66	11,2	0,4	15,5
camphène	8,33	4,69	6,03	3,4	0,3	10,5
β -pinène	4,26	7,84	2,67	2,9	0,3	4,03
myrcène	5,63	1,13	1,66	31,5	tr	1,5
α -phellandrène	0,46	0,21	—	1,4	—	0,4
α -terpinène	0,57	0,61	0,56	0,9	—	1,1
p-cymène	3,24	0,53	1,22	1,4	tr	4,0
1,8-cinéole	19,13	44,48	8,06	14,9	31,9	—
limonène	4,47	2,25	4,15	3,2	—	2,1
cis- β -ocimène	0,14	—	—	0,7	—	1,8
γ -terpinène	0,75	0,9	1,31	1,8	tr	2,7
terpinolène	0,59	0,42	1,24	0,6	tr	1,5
linalol	0,76	0,53	1,96	1,2	3,9	2,1
camphre	18,67	10,07	14,46	14,4	19,7	15,2
bornéol	2,46	3,57	3,06	1	12,1	3,9
γ -terpinéol	0,11	—	—	—	—	—
terpinène-4-ol	0,14	0,96	1,00	1	4,0	1,1
α -terpinéol	2,6	2,08	1,09	1,4	12,8	0,8
verbénone	0,23	0,02	10,08	2,6	—	1,0
acétate de bornyle	1,3	1,5	11,19	0,2	3,1	3,6
β -caryophyllène	1,49	4,55	1,33	0,5	3,0	—
α -humulène	—	—	0,41	0,1	tr	0,7
verbéol	—	—	—	—	—	—
cis- α -bisabolène	—	—	—	0,1	—	—
oxyde de caryophyllène	—	0,16	—	0,2	tr	0,8

On note que les huiles du *Rosmarinus officinalis* L. d'Algérie appartiennent, respectivement, au chémotype à 1,8-cinéole [49] et à camphre [30].

II.1.8. Matière végétale utilisée

La matière végétale, objet de ce travail, provient d'un lot cultivé à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. Les parties de la plante utilisées sont les sommités aériennes, constituées des feuilles et des tiges. La récolte a été effectuée au début (Lot n°1) et à la fin (Lot n°2) du mois d'Avril 2011.

La plante a été identifiée au Département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger, comme étant le *Rosmarinus officinalis* L.

II.1.8.1. Echantillonnage

L'utilisation des échantillons représentatifs d'un lot mère de matière végétale, constitué des feuilles et des tiges de forme et de poids différents est indispensable, car lors de son conditionnement, ces derniers se répartissent de manière aléatoire.

Nous avons effectué l'échantillonnage de chacun des deux lots étudiés, avant de procéder à l'extraction de l'huile essentielle, afin d'obtenir des échantillons représentatifs. Ce qui revient à considérer que chaque élément de la population a une chance égale d'appartenir à un même échantillon [56].

Pour avoir des échantillons représentatifs, nous avons suivi la procédure suivante [10]:

- 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.1.8.2. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé par distillation azéotrope au xylène, dans un appareil de Dean et Stark (figure II.7), 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.

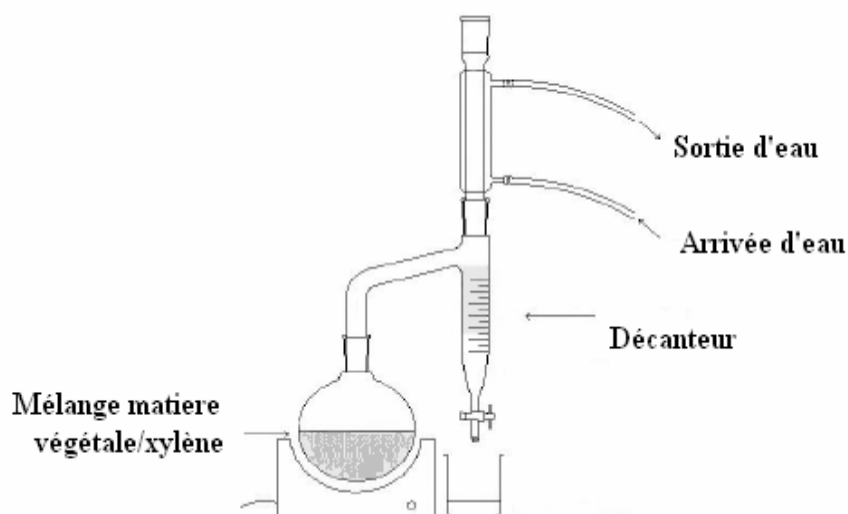


Figure II.7 : Appareil de Dean et Stark [57]

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. À 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.

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

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

Avec:

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

II.2. L'installation de l'entraînement à la vapeur d'eau

Les essais d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. ont été effectués dans une installation réalisée [58] au Département de Génie chimique, ENP, en utilisant des éléments de récupération en verre spécial (EIVS).

L'installation est schématisée sur la figure II.8 suivante.

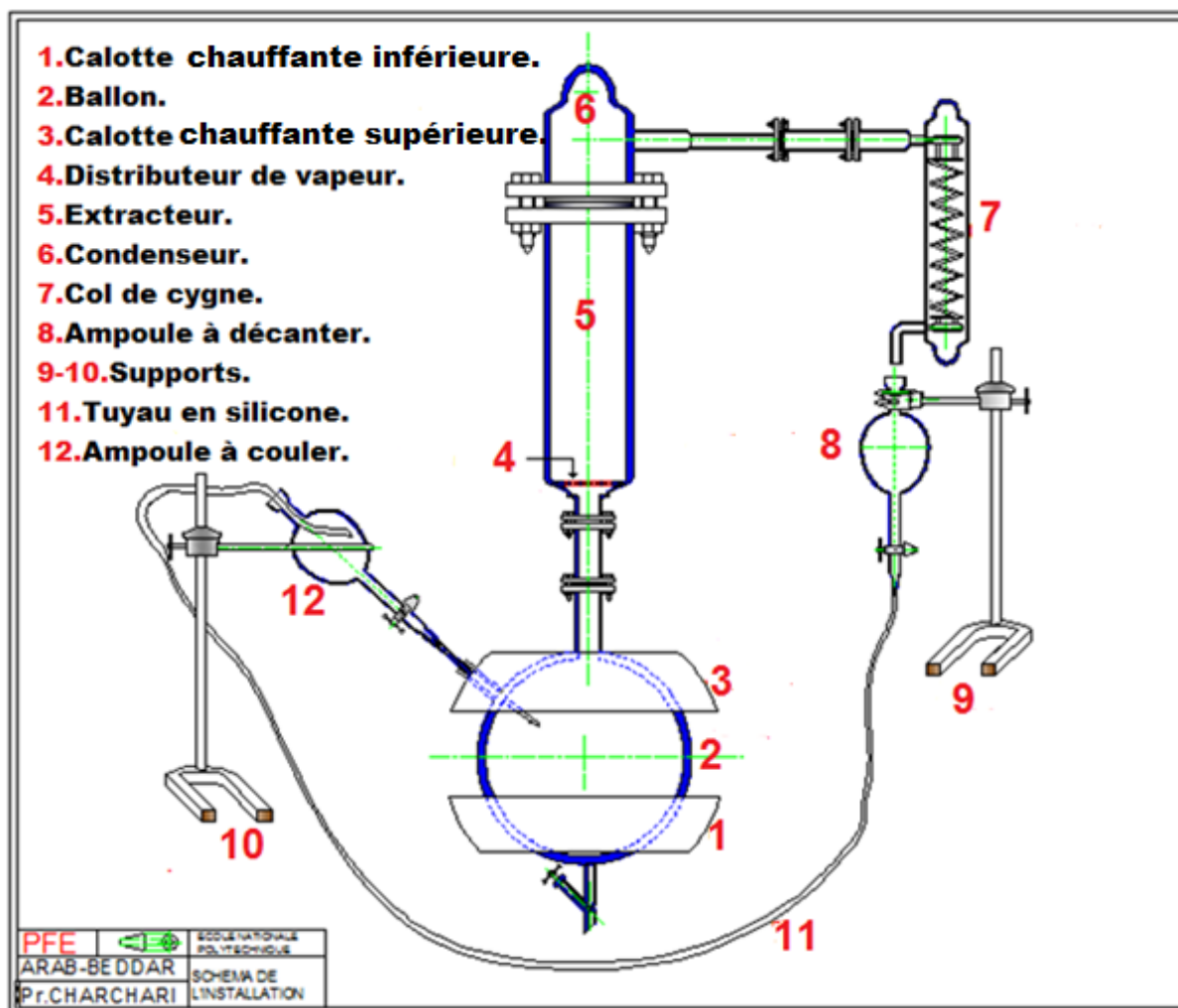


Figure II.8 : Schéma de l'installation d'extraction de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. par entraînement à la vapeur d'eau

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 à la 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.9), 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.



Figure II.9 : Ruban chauffant

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

Dans les installations industrielles, la séparation des deux phases, huile essentielle et eau, issues de l'entraînement à la vapeur d'eau se fait dans un vase florentin, dont le

fonctionnement est basé sur la différence des densités et l'immiscibilité des huiles essentielles et l'eau [59]. Une ampoule à décanter, de capacité 250 ml, a été utilisée comme vase florentin.

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.

II.3. Tensioactif utilisé

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.2 suivant :

Tableau II.2: Propriétés physico-chimiques du tensioactif utilisé

Aspect	Liquide visqueux clair de couleur jaune à jaune vert
Masse volumique	1,1 g/ml
Température d'ébullition	>100° C
H.L.B.	>16
CMC*	8,04.10 ⁻⁵ M

*Concentration micellaire critique

Le choix de ce tensioactif est basé sur les résultats des études antérieures [30, 31] et est 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.

II.4. Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L.

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. [30, 31, 58]

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.5. Plan d'expériences et modélisation mathématique

Réaliser des expériences, afin d'étudier et de comprendre un phénomène, est une démarche qui remonte à la nuit des temps. Dès le moyen-âge Nicolas Oresme (1325-1382) aborde cette question dans ses écrits. Inspirateur de Descartes et Leibnitz, Francis Bacon (1561-1626) est un des précurseurs de la méthode expérimentale.

A l'époque actuelle, bon nombre de procédés de fabrication ou d'expériences en laboratoire deviennent de plus en plus complexes, car ils dépendent d'un grand nombre de variables difficiles à régler intuitivement.

Seule la réalisation d'expériences va permettre d'appréhender et de modéliser de tels phénomènes complexes. Si ces expériences sont effectuées sans une méthodologie rigoureuse il est fort probable qu'elles vont soit conduire à des impasses, soit à des résultats de qualité décevante. C'est pourquoi la méthode des plans d'expérience est préconisée afin d'optimiser ce type de démarche.

L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise : « *obtenir un maximum d'information avec un minimum d'expériences* ». [60]

Un expérimentateur qui lance une étude s'intéresse à une grandeur qu'il mesure à chaque essai. Cette grandeur est appelée grandeur d'intérêt ou réponse du système étudié. La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs paramètres qu'on appelle facteurs. [61]

II.5.1. Réponse

On qualifie de réponse la grandeur qui est obtenue pour chaque expérience réalisée. Elle doit être quantitativement mesurable et statistiquement reproductible. Il appartient aux spécialistes du phénomène étudié de cerner au mieux ce qui les intéresse et de fournir le type de réponse, ainsi que l'objectif souhaité vis-à-vis de celle-ci. Cet objectif est, dans la plupart des cas, une recherche d'extremum. [60]

II.5.2. Facteur

On qualifie de facteur toute variable, obligatoirement contrôlable, susceptible d'influer sur la réponse observée. La différence fondamentale entre la notion classique de variable et celle de facteur tient, donc, dans le fait que tout facteur doit pouvoir être modifié sans difficulté.

Les facteurs peuvent être quantitatifs, lorsqu'ils sont naturellement exprimés à l'aide de valeurs numériques, ou bien, qualitatifs, dans le cas contraire. [60]

II.5.3. Domaine d'étude

Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut.

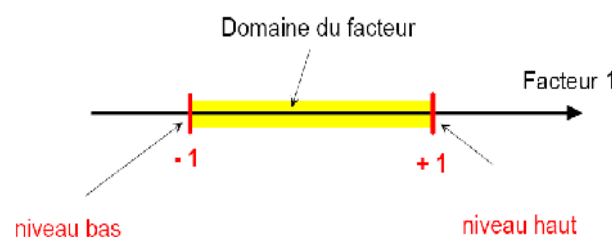


Figure II.10 : Domaine du facteur

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur.

Le regroupement des domaines des facteurs définit le domaine d'étude. Ce domaine est la zone de l'espace expérimental choisie par l'expérimentateur pour faire ses essais. Les

résultats d'une étude, c'est-à-dire, ceux de plusieurs expériences, réalisées dans des conditions opératoires bien définies, sont représentés par des points répartis dans le domaine d'étude (Figure II.11). [61]

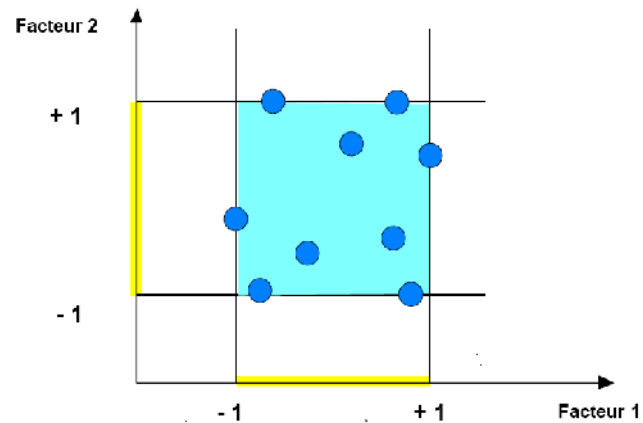


Figure II.11 : Domaine d'étude

II.5.4. Surface de réponse

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

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure II.12). [61]

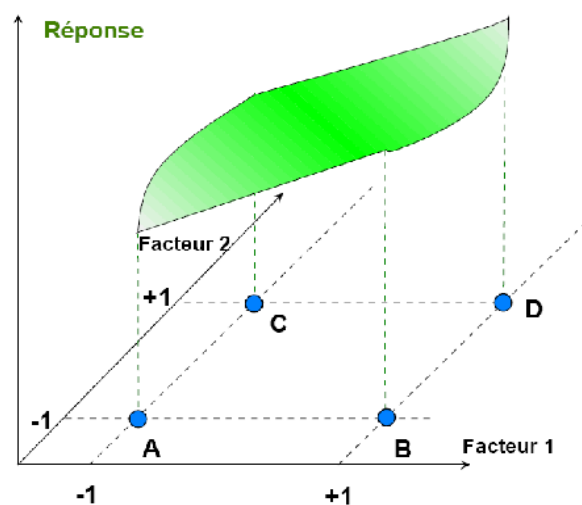


Figure II.12 : Surface de réponse

II.5.5. Coordonnées centrées réduites

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

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

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

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

$$x = \frac{A - A_0}{Pas} \quad (\text{II.2})$$

L'intérêt des variables centrées réduites est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines d'étude retenus et quels que soient les facteurs. La théorie des Plans d'Expériences présente ainsi une grande généralité.[61]

II.5.6. Notion de modélisation mathématique

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

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z \quad (\text{II.3})$$

Où :

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

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer, d'une part, toutes les réponses dans le domaine d'étude sans être obligé de réaliser les expériences et, d'autre part, de rechercher l'extremum de la fonction mathématique. [61]

II.5.7 Plan factoriel complet à trois niveaux de deux paramètres

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

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 \quad (\text{II.4})$$

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

II.6. Logiciel Statgraphics Centurion XV

STATGRAPHICS Centurion XV est la 15ème version du logiciel STATGRAPHICS pour micro-ordinateurs. La première version est apparue en 1982.

C'est un logiciel d'analyse statistique et graphique largement utilisé pour les statistiques descriptives et exploratoires, les modélisations, l'amélioration de la qualité et le Six Sigma. Il contient plus de 160 procédures, dont :

- Analyses exploratoires des données ;
- Analyses de la variance et régressions ;
- Ajustements de lois ;
- Maîtrise Statistique des Procédés (SPC) ;
- Plans d'expériences ;
- Six Sigma ;
- Fiabilité et méthodes de survie ;
- Analyses de séries temporelles et prévision ;
- Méthodes multivariées ;
- Méthodes non paramétriques. [62]

II.7. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est une technique très répandue, dont les premières applications ont concerné le contrôle des fractions légères des raffineries de pétrole.

Son développement, qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui argumente encore plus son intérêt.

Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la CPG à grande vitesse ou multidimensionnelles rendent cette technique toujours plus attractive. [63]

II.7.1 Chromatographe

Un chromatographe comprend trois modules spécifiques : injecteur, une colonne et un détecteur, réunis dans un bâti unique et un four.

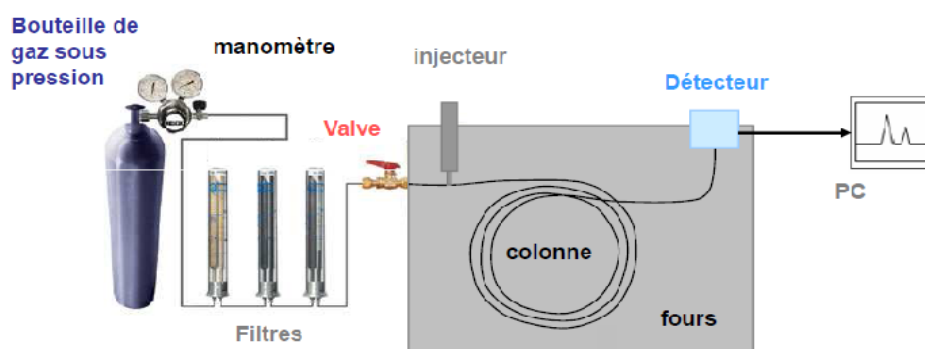


Figure II.13: Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse [64]

La bouteille sous pression renferme un gaz (He, N₂....), appelé gaz vecteur qui entraîne l'échantillon dans la colonne.



Figure II.14 : Colonne capillaire. [64]

La colonne contient un support poreux et inerte, ayant une surface spécifique de 2 à 8 m²/g, imprégné d'un film de la phase stationnaire. A sa sortie du four la colonne est reliée à un détecteur. [63]

II.7.2. Mode de fonctionnement

L'analyse commence à l'instant où l'on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeux, dans l'injecteur à l'aide d'une micro-seringue.

L'injecteur a la double fonction de porter l'échantillon à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. La séparation des constituants de l'échantillon, effectué dans la colonne, est conservée sur un enregistrement particulier appelé chromatogramme, qui n'est autre qu'une trace décrivant l'évolution, en fonction du temps, d'un paramètre qui dépend de la concentration instantanée du soluté à la sortie de colonne. Le temps d'élution est porté en abscisse et l'intensité du signal du détecteur, en ordonnée. [63]

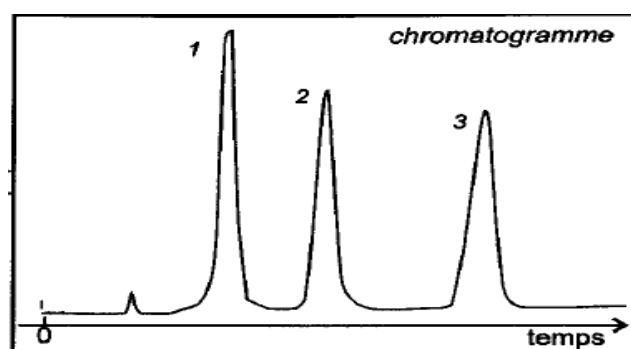


Figure II.15 : Chromatogramme [63]

II.7.3. Conditions opératoires d'analyse par CPG

Les échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., obtenus dans les conditions optimales, avec et sans tensioactif, ont été analysées, à l'aide d'un appareil Agilent 6890N, dans les conditions opératoires suivantes :

- Colonne capillaire: en silice fondu, de longueur 30m et diamètre inférieur 0,32mm ;
- Phase stationnaire : HP5, épaisseur du film 0,25µm ;
- Gaz vecteur : hélium ;
- Détecteur : FID ;
- Débit de gaz vecteur : 1 mL/mn ;
- Température de colonne : 60 à 220°C à raison de 3°C/mn ;
- Température de l'injecteur : 250°C ;

- Température du détecteur : 250°C ;
- Volume injecté : 1µl ;
- Mode d'injection : split 1/80.

II.8. Détermination des propriétés physiques et biologiques de l'huile essentielle

II.8.1. Densité

La densité de l'huile essentielle a été déterminée à l'aide de deux pycnomètres, l'un de 5mL et l'autre de 5,496 mL, en se référant aux recommandations de la norme AFNOR NF T 75-111 [65], à la température ambiante de 23°C, puis calculés pour 20°C par la formule suivante [66]:

$$d^{20} = d^t \pm 0,00073 (T-20) \quad (\text{II.5})$$

Avec :

d^{20} : densité à 20°C ;

d^t : densité à la température ambiante ou de mesure ;

T : température ambiante ou de mesure.

II.8.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre, en se reportant à la norme AFNOR NF T 75-112 [65], à la température ambiante de 23°C, puis calculés pour 20°C par la formule suivante [66]:

$$\eta^{20} = \eta^t + 0,0004 (T-20) \quad (\text{II.6})$$

Avec :

η^{20} : indice de réfraction à 20°C ;

η^t : indice de réfraction à la température ambiante ou de mesure ;

T : température ambiante ou de mesure.

L'eau distillée a été utilisée comme produit étalon pour la réfractométrie ($\eta = 1,3333$).

II.8.3. Activité antimicrobienne

Les effets antimicrobiens de différentes espèces de plantes aromatiques sont connus depuis longtemps et mis à profit de manière empirique pour l'assainissement de l'air

(encensoir) ou pour augmenter la durée de vie des aliments. Les huiles essentielles ont un spectre d'action biocide très large puisqu'elles inhibent la croissance de moisissures, levures et bactéries, ainsi les propriétés antimicrobiennes sont essentiellement dues à la fraction d'huiles essentielles contenues dans ces plantes [67].

L'objectif de cette partie de notre travail est l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L., en ayant recours à la détermination de la quantité minimale inhibitrice (QMI). Cette dernière est définie comme étant la plus petite quantité de produit pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible.

Les échantillons de l'huile essentielle testés ont été extraites par entraînement à la vapeur d'eau de *Rosmarinus officinalis* L. du lot N°2, avec et sans tensioactif.

L'activité antimicrobienne de l'huile a été évaluée pour trois souches bactériennes de référence ATCC (American typing culture collection), en l'occurrence, *Escherichia coli* (ATCC 2592), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et pour une levure osmophile (isolât). Nous avons utilisé deux méthodes, à savoir, la méthode de microatmosphère et la méthode de l'antibiogramme.

II.8.3.1. Micro-organismes étudiés

➤ *Escherichia coli* (*E. coli*)

C'est une bactérie du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. *Escherichia coli*, également appelé *colibacille*. Découverte en 1885 par *Théodore Escherich*, dans des selles de nourrissons, c'est un coliforme fécal généralement commensal. La plupart des souches d'*E. coli* sont sans danger [68]. Cependant, certaines souches peuvent engendrer de graves problèmes de santé et parfois la mort, comme les souches entérohémorragiques (ECEH), qui peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires graves [69].

➤ *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré)

C'est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. C'est un germe très important, aussi bien dans les infections communautaires que nosocomiales. Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Le site de colonisation préférentielle du *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale [70].

La septicémie staphylococcique, c'est-à-dire, une entrée et une multiplication de la bactérie dans la circulation sanguine, est la forme la plus dangereuse de l'atteinte staphylococcique. Elle engendre, le plus souvent, et en absence de traitement adéquat, la mort [71].

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, plus communément appelé le bacille pyocyanique, est un germe ubiquitaire, vivant dans les sols, en milieu humide et sur les végétaux. Il résiste peu à la dessiccation. Il peut vivre à l'état commensal dans le tube digestif de l'homme. C'est un agent pathogène opportuniste [72]. Il est de plus en plus souvent à l'origine d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement [73].

➤ *Levure osmophile*

La levure osmophile est un champignon unicellulaire apte à provoquer la fermentation des matières organiques animales et végétales. Ces micro-organismes se multiplient par bourgeonnement ou par fission (scissiparité). Ils sont souvent capables d'accomplir une sporulation, soit dans un but de dormance en milieu défavorable, soit dans un but de dispersion.

Ces levures sont osmophiles parce qu'elles s'adaptent aux environnements à forte pression osmotique, telles que les concentrations en sucre élevée. Une forte concentration de sucre représente un facteur limitant la croissance osmotique de nombreux micro-organismes, mais les levures osmophiles se protègent contre cette haute pression par la synthèse d'osmoprotectants, tels que les alcools et les acides aminés. [74]

II.8.3.2. Méthode de microatmosphère

Des déterminations des quantités minimales inhibitrices (QMI) ont été réalisées, dans les années 1980, par Pellecier [75] et Benjilali [76], en utilisant la méthode en micro-atmosphère, dérivée de la méthode originale de Kellner et Kober [77].

Cette méthode repose sur l'évaluation de l'activité inhibitrice de croissance des composés volatils des huiles essentielles à une température d'incubation donnée.

Des boîtes de Pétri, de 90 mm de diamètre, sont préparées par dépôt de 20 ml de gélose nutritive de Mueller-Hinton en surfusion. L'inoculation est réalisée en surface, sous forme de dépôts de 1 µL de culture de 24 heures de chaque microorganisme dans des spots, creusés dans la gélose. Un papier-filtre Watmann n° 5 est placé au fond du couvercle de chaque boîte de Pétri. Juste avant fermeture de la boîte, le l'huile essentielle à tester est déposée au centre du papier. Pour chaque huile, les dépôts sont de zéro (témoin de croissance), 10, 20, 40, 80 et 160 µL. Immédiatement, les boîtes sont fermées de sorte que le dépôt de produit soit en position inférieure, sur le couvercle de la boîte de Pétri.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, la croissance est comparée à celle du témoin.

II.8.3.3. Méthode d'antibiogramme

Des disques en papier Watmann, de 6mm de diamètre, imprégnés des huiles essentielles à tester avec différentes quantités (1, 2, 5 et 10 µL), sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (Mueller-Hinton), préalablement ensemencé par inondation avec 1mL d'une culture de 24 heures de la souche à étudier [78]. Après incubation à 37°C pendant 24h, la croissance est comparée à celle du témoin (sans dépôt de l'huile essentielle). Deux essais répétitifs ont été réalisés pour chaque microorganisme.

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1. Taux d'humidité de la matière végétale

Les échantillons représentatifs du Lot 1, dix au total, ont été conservés dans des sachets en plastique entrouverts et remués régulièrement, afin d'empêcher l'assèchement à la surface et l'accumulation d'eau de condensation au fond. Le taux d'humidité a été mesuré à trois reprises : en début, au milieu et au terme des dix essais, réalisés dans le cadre du plan des expériences. Les résultats sont regroupés dans le tableau III.1 suivant.

Tableau III.1 : Taux d'humidité de la matière végétale utilisée

Mesure	Taux d'humidité H (%)
1	63,9
2	58,6
3	58,3
H moyen (%)	60,3

On constate que cette manière de stocker la plante a permis d'éviter une variation importante de son taux d'humidité et nous autorise de considérer un taux moyen de 60,3 %.

Le taux d'humidité des échantillons du Lot 2, mesuré avant leur extraction, a été de 59,3%.

III.2. Mise en œuvre de l'installation

Après avoir contrôlé l'étanchéité des différentes jonctions et constaté aucune perte en vapeurs et liquides, nous avons procédé aux mesures du débit de vapeur d'eau à blanc (extracteur vide), afin de définir le domaine de ce paramètre. Le débit de vapeur d'eau a été contrôlé, aussi, pour l'ensemble des essais d'extraction de l'huile essentielle. En absence de dispositif permettant d'obtenir différentes valeurs du débit de vapeur et les maintenir constantes pendant toute la durée de l'extraction, nous avons fait varier l'apport de chaleur au moyen des rubans chauffants et d'isolation thermique avec la laine de verre, pour obtenir les trois différents niveaux de débits de vapeur d'eau, exigés par le plan d'expériences :

➤ **Niveau inférieur :**

- ✓ chauffage du ballon avec deux calottes chauffantes.

➤ **Niveau de base :**

- ✓ chauffage du ballon avec deux calottes chauffantes
- ✓ chauffage de la conduite de vapeur d'eau avec un ruban chauffant.

➤ *Niveau supérieur:*

- ✓ chauffage du ballon avec deux calottes chauffantes ;
- ✓ chauffage de la conduite de vapeur d'eau avec un ruban chauffant ;
- ✓ chauffage de la partie basse de l'extracteur avec un ruban chauffant.

III.2.1. Mesure des débits de vapeur d'eau à blanc (extracteur vide)

III.2.1.1. Mesure des débits de vapeur d'eau à blanc, sans isolation du col de cygne

Nous avons d'abord mesuré les débits de vapeur d'eau à blanc, sans isoler la calotte supérieure de l'extracteur, ou le col de cygne.

Les débits de vapeur d'eau mesurés, pour les trois niveaux, sont illustrés sur les figures III.1, III.2 et III.3 suivantes.

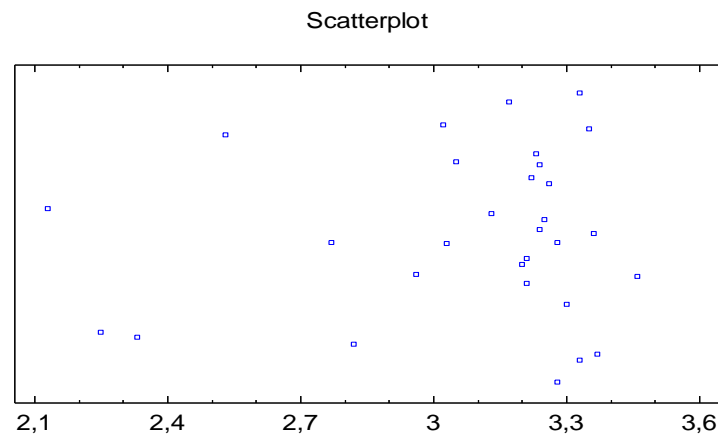


Figure III.1 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, sans isolation du col de cygne, pour le niveau inférieur

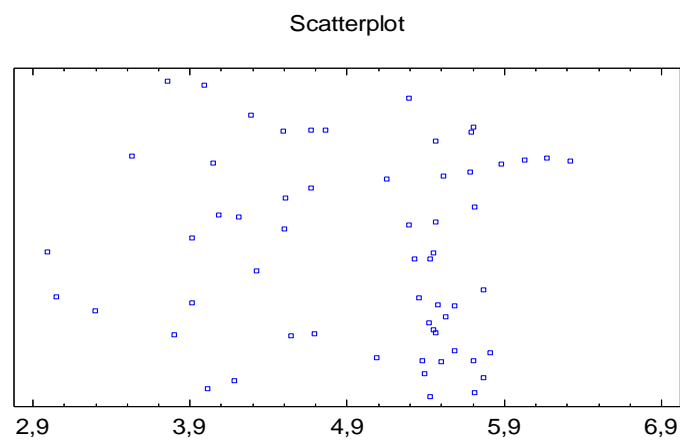


Figure III.2 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, sans isolation du col de cygne, pour le niveau de base

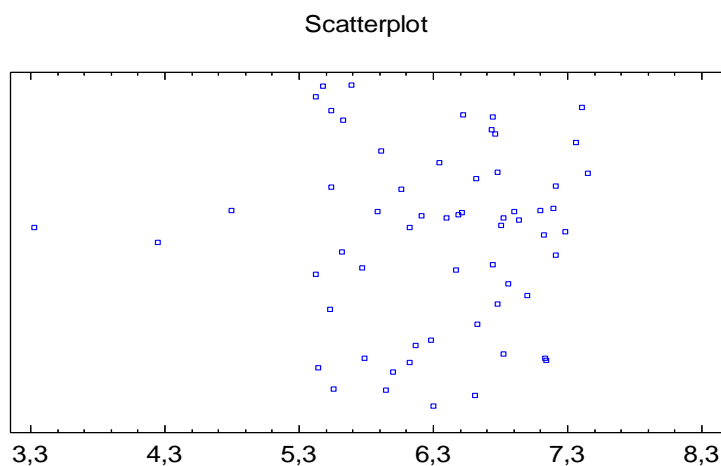


Figure III.3 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, sans isolation du col de cygne, pour le niveau supérieur

L'analyse statistique, de ces mesurés lors des essais à blanc, sans isolation du col de cygne, est présentée sur le tableau III.1 suivant.

Tableau III.2 : Analyse statistique de mesures des débits de vapeur lors des essais à blanc sans isolation du col du cygne

	Niveau -1	Niveau 0	Niveau +1
Nombre de mesures	30	59	60
Moyenne (mL/min)	3,08	4,97	6,31
Déviatoin standard	0,35	0,82	0,79
Coefficient de variation (%)	11,27	16,56	12,53
Erreur standard	0,06	0,11	0,10
Variance	0,12	0,68	0,63
Maximum (mL/min)	2,13	2,99	3,33
Minimum (mL/min)	3,46	6,32	7,45
Gamme	1,33	3,33	4,12
Intervalle de confiance pour la moyenne (mL/min)	[2,95 ; 3,21]	[4,75 ; 5,18]	[6,11 ; 6,51]
(Probabilité de 95%)	3,08 ± 0,13	4,97 ± 0,21	6,31 ± 0,20

Nous constatons que les débits de vapeur d'eau obtenus sont relativement faibles et de plus, en dépit des intervalles de confiance relativement restreints, la valeur du débit pour le niveau de base ne correspond pas à la valeur moyenne du domaine de ce paramètre.

Pour y remédier, nous avons isolé le col de cygne, avec la laine de verre, afin de limiter les condensations de vapeur observées à cet endroit.

III.1.2.2. Mesure des débits de vapeur à blanc, avec isolation du col de cygne

Les débits de vapeur d'eau obtenus, pour les trois niveaux, sont illustrés sur les figures III.4, III.5 et III.6 suivantes.

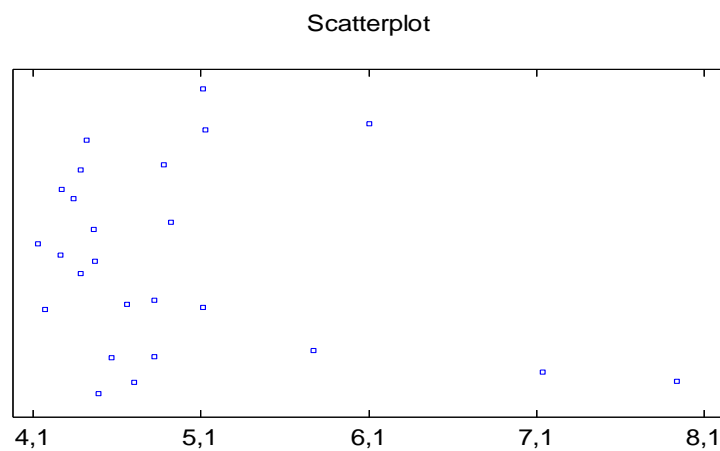


Figure III.4 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, avec isolation du col de cygne, pour le niveau inférieur

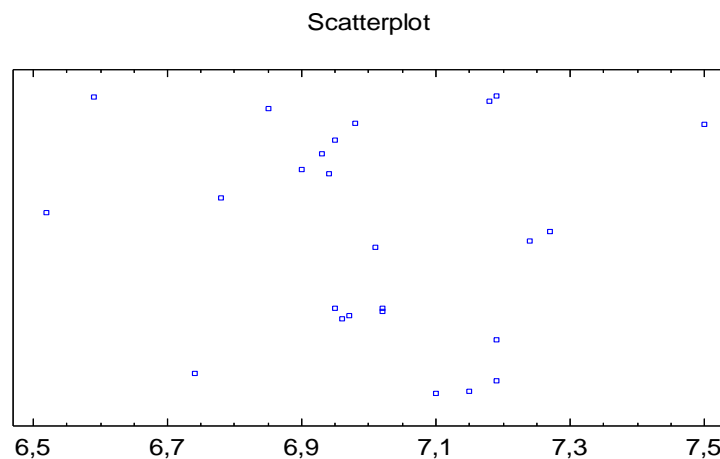


Figure III.5 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, avec isolation du col de cygne, pour le niveau de base

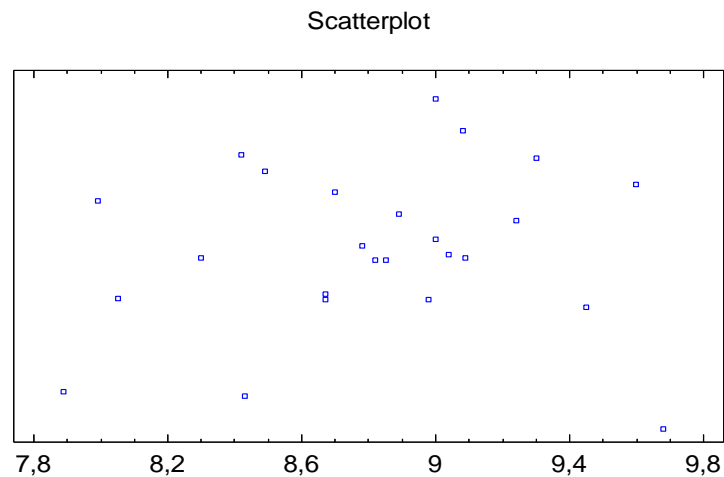


Figure III.6 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, avec isolation du col de cygne, pour le niveau supérieur

L'analyse statistique des débits de vapeur d'eau mesurés lors des essais à blanc, avec isolation du col de cygne, est présentée sur le tableau III.2 suivant.

Tableau III.3 : Analyse statistique de mesures des débits de vapeur lors des essais à blanc avec isolation du col du cygne

	Niveau -1	Niveau 0	Niveau +1
Nombre de mesures	25	25	25
Moyenne (mL/min)	4,94	7,00	8,82
Déviatation standard	0,92	0,22	0,47
Coefficient de variation (%)	18,65	3,08	5,35
Erreur standard	0,18	0,04	0,09
Variance	0,85	0,05	0,22
Maximum (mL/min)	4,13	6,52	7,89
Minimum (mL/min)	7,94	7,50	9,68
Gamme	3,81	0,98	1,79
Intervalle de confiance pour la moyenne (mL/min)	[4,56 ; 5,32]	[6,91 ; 7,09]	[8,62 ; 9,01]
(Probabilité de 95%)	4,94 ± 0,38	7,00 ± 0,09	8,82 ± 0,19

En examinant les résultats obtenus lors des essais à blanc avec isolation du col de cygne, on constate que :

- Les débits de vapeur d'eau sont supérieurs à ceux obtenus sans isolation du col de cygne;
- Les intervalles de confiance sont relativement restreints ;
- Les valeurs moyennes des bornes inférieures et des bornes supérieures des intervalles de confiance des débits, obtenus pour les niveaux inférieur et supérieur, définissent un intervalle de confiance de [6,59 ; 7,16] pour le niveau de base et la valeur moyenne obtenue pour ce niveau appartient bien à cet intervalle de confiance.

Aussi, pour l'ensemble des essais d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L., nous avons retenu cette manière de procéder pour obtenir les trois niveaux de débit de vapeur.

III.2.2. Mesure des débits de vapeur d'eau au cours des essais d'extraction

Au cours des essais d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* L., nous avons mesuré les débits de vapeur d'eau pour chaque niveau et pendant chaque essai.

Les débits de vapeur d'eau obtenus, pour les trois niveaux, sont illustrés sur les figures III.7, III.8 et III.9 suivantes.

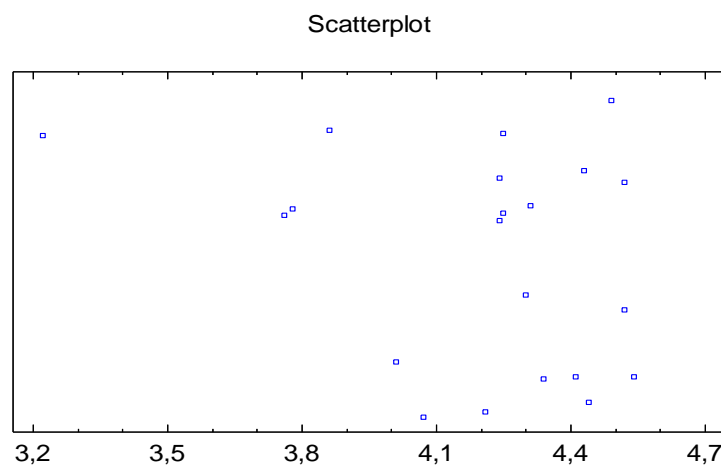


Figure III.7 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des extractions de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L, pour le niveau inférieur

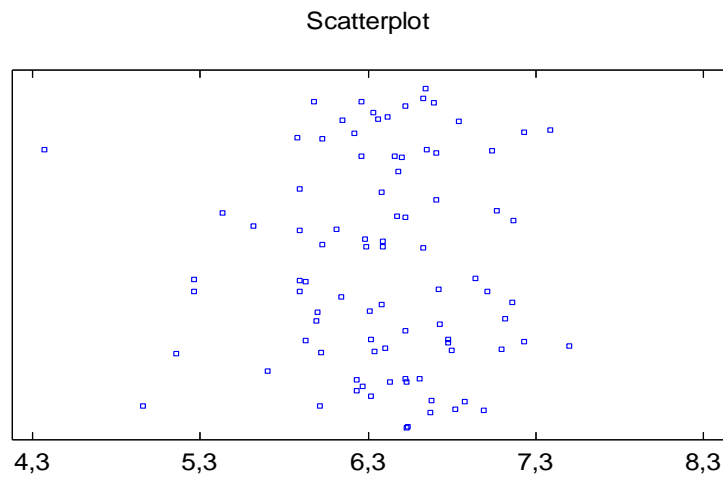


Figure III.8 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des extractions de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L, pour le niveau de base

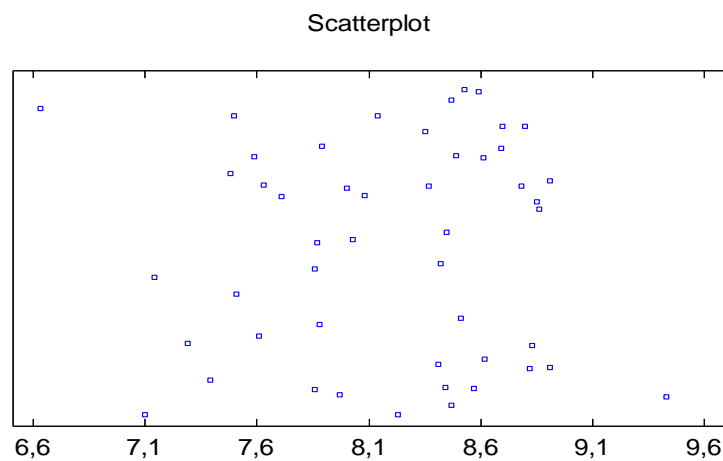


Figure III.9 : Débits de vapeur d'eau mesurés lors des extractions de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L, pour le niveau supérieur

L'analyse statistique des débits de vapeur d'eau mesurés, lors des extractions de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L, est présentée sur le tableau III.3 suivant.

Tableau III.4 : Analyse statistique de mesures des débits de vapeur d'eau au cours des extractions par entrainement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.

	Niveau -1	Niveau 0	Niveau +1
Nombre de mesures	21	88	49
Moyenne (mL/min)	4,20	6,38	8,19
Déviatation standard	0,32	0,54	0,58
Coefficient de variation (%)	7,73	8,45	7,14
Erreur standard	0,07	0,06	0,08
Variance	0,11	0,29	0,34
Maximum (mL/min)	3,22	4,37	6,63
Minimum (mL/min)	5,54	7,50	9,43
Gamme (mL/min)	1,32	3,13	2,8
Intervalle de confiance pour la moyenne (mL/min)	[4,05 ; 4,35]	[6,27 ; 6,49]	[8,02 ; 8,36]
(Probabilité de 95%)	4,20 ± 0,15	6,38 ± 0,11	8,19 ± 0,17

En examinant les débits de vapeur d'eau obtenus, ainsi que les intervalles de confiance des différents niveaux, on remarque que :

- Les intervalles de confiance sont relativement restreints ;
- Les débits de vapeur moyens obtenus sont légèrement inférieurs à ceux obtenus lors des essais à blanc avec isolation du col de cygne.
- Les valeurs moyennes des bornes inférieurs et des bornes supérieurs des intervalles de confiances des débits, obtenus pour les niveaux inférieur et supérieur, sont égales respectivement à 6,04 et 6,36mL/min. Par contre, la valeur moyenne de 6,38mL/min des débits, obtenus pour le niveau de base, dépasse de 0,02mL/min, soit de 0,31%, la borne supérieure. Cette erreur est tout à fait acceptable, si l'on tient compte de la difficulté d'assurer un débit constant.

III.3. Optimisation par planification des expériences de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.

III.3.1. Les paramètres à optimiser et leurs domaines

Les paramètres choisis, pour optimiser l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L, sont :

- Le débit de vapeur d'eau ;
- La masse de la matière végétale à traiter

Les niveaux inférieur, de base et supérieur du débit de vapeur d'eau, ont été fixés sur la base des résultats des essais à blanc.

Pour définir le domaine du paramètre masse de matière végétale à traiter, nous avons introduit dans le volume utile de l'extracteur, compris entre le support-distributeur de vapeur et la jonction avec le col de cygne, une masse de plante sans tasser et une autre, avec un tassement maximal. Ces deux masses, respectivement, 500 et 900g, ont été retenues comme niveaux inférieur et supérieur de ce paramètre, le niveau de base correspond, dans ce cas, à 700g. Les niveaux inférieurs, de base et supérieurs des deux paramètres à optimiser sont réunis dans le tableau III.5 suivant.

Tableau III.5: Niveaux inférieurs, de base et supérieurs des paramètres à optimiser

Paramètre \ Niveau	Niveau inférieur	Niveau de base	Niveau supérieur
Débit de vapeur d'eau, mL/min	4,94 ± 0,38	7,00 ± 0,09	8,82 ± 0,19
Masse de matière végétale humide, g	500	700	900
Masse de matière végétale sèche, g	198,5	277,9	357,3
Masse de plante humide par unité de volume utile de l'extracteur, Kg/m ³	91,11	127,55	163,99

Dans ce tableau III.5 la masse de matière végétale par unité de volume utile de l'extracteur exprime le degré de tassement de celle-ci, pour les trois niveaux.

III.3.2. Plan expérimental et établissement du modèle mathématique

Le plan factoriel à trois niveaux des deux paramètres 3^2 prévoit, neuf essais. Pour les besoins de l'évaluation statistique du modèle, un dixième essai a été réalisé dans les conditions opératoires définies par le point central du domaine expérimental.

Les deux paramètres à optimiser, indépendants, de nature et d'unités de mesure différentes, ont été remplacés par des variables réduites adimensionnelles, respectivement x_1 , variable réduite de la masse de la matière végétale (M_{mv}) et x_2 , variable réduite du débit (D) de vapeur d'eau. Les valeurs des variables réduites x_1 et x_2 évoluent dans l'intervalle, allant de -1 à $+1$.

Les conditions opératoires des essais programmés et réalisés par la suite, ainsi que les masses M_{HE} et les rendements R en huile essentielle obtenus, sont regroupés dans le tableau III.6 suivant.

Tableau III.6: Conditions opératoires des essais programmés par le plan factoriel des expériences 3^2 et les rendements R en huile essentielle obtenus

Essai	$x_1(M_{mv})$	$x_2(D)$	M_{HE} , g	R, %
1	+1	-1	7,4022	2,07
2	0	-1	5,9583	2,14
3	-1	-1	4,6217	2,33
4	+1	+1	8,0808	2,26
5	0	+1	6,3182	2,27
6	-1	+1	4,2950	2,16
7	+1	0	8,8212	2,47
8	0	0	7,3796	2,66*
9	-1	0	4,6878	2,36
10	0	0	7,3941	2,66**

Les valeurs précises sont respectivement 2,655* et 2,661**

La variation du rendement R en huile essentielle est exprimée par une fonction polynomiale du second ordre en x_1 et x_2 , dont les coefficients de régression, sont déterminés à l'aide du logiciel Statgraphics centurion XV.

L'équation du modèle mathématique obtenu s'écrit comme suit :

$$\mathbf{R = 2,59 - 0,008*x_1 + 0,025*x_2 - 0,105*x_1^2 + 0,090*x_1*x_2 - 0,315*x_2^2} \quad \text{(III.1)}$$

Le rendement en huile essentielle au point central du domaine expérimental, calculé à partir de l'équation de ce modèle, égal à 2,59%, est proche de celui obtenu expérimentalement 2,66%, l'erreur estimée étant de 2,70%.

III.3.3. Effets individuels et conjugués des paramètres

Les valeurs des coefficients du modèle permettent d'évaluer l'influence, sur le rendement en huile essentielle, des effets individuels de chacun des paramètres étudiés et de leur interaction. Le diagramme de Pareto, présenté sur la figure III.10 suivante, affiche les valeurs absolues des effets dans un ordre décroissant.

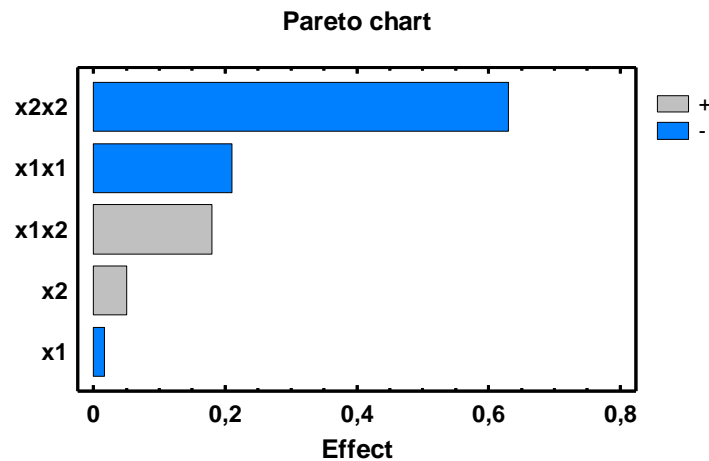


Figure III.10 : Diagramme de Pareto

On constate que les effets quadratiques des deux paramètres sont négatifs et celui du débit de vapeur est le plus important. Par contre, l'effet individuel du débit de vapeur sur le rendement en huile essentielle est positif et supérieur à celui de la masse de matière végétale. De même, l'effet conjugué des deux paramètres est positif et plus important que leurs effets individuels. Ces effets sont présentés sur les figures III.11 et III.12 respectivement.

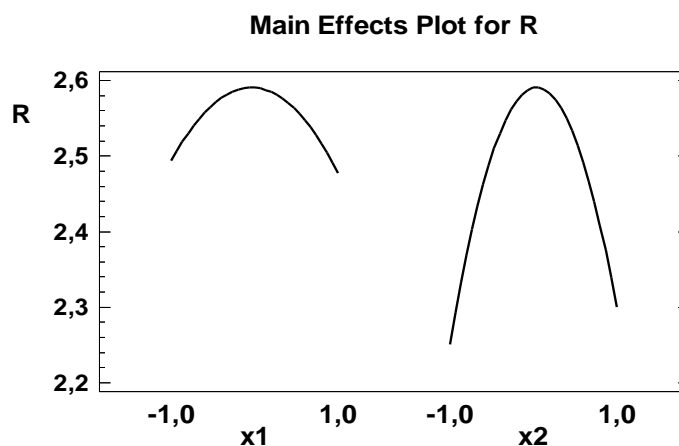


Figure III.11 : Effets individuels des paramètres sur le rendement en huile essentielle

Les graphiques des effets individuels montrent que le rendement en huile essentielle R présente un maximum, lorsque chacun des facteurs passe de son niveau inférieur à son niveau supérieur, l'autre facteur étant maintenu au centre du domaine expérimental, à mi-chemin entre le niveau inférieur et le niveau supérieur.

Les courbes de la figure III.12 donnent l'évolution du rendement en huile essentielle prévue lorsque l'un des facteurs passe de sa valeur inférieure à sa valeur supérieure, pour chaque niveau de l'autre facteur.

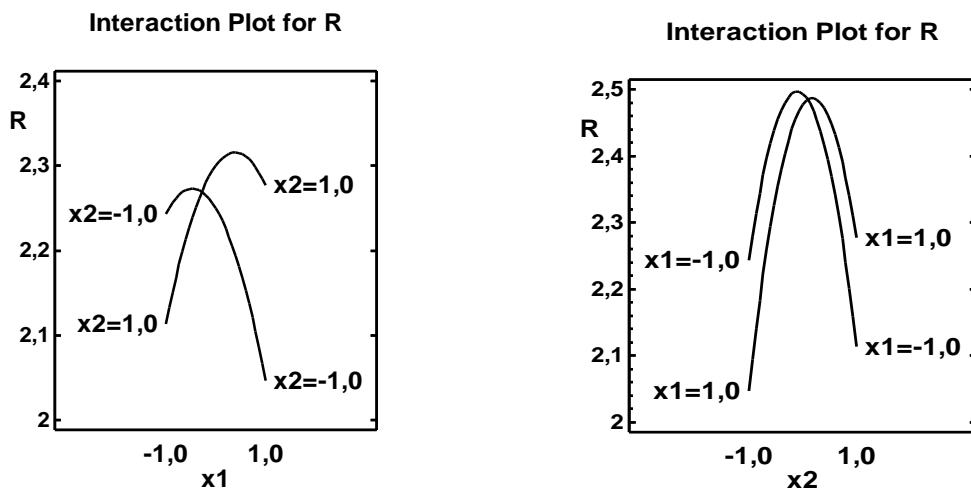


Figure III.12 : Effet conjugué des deux paramètres sur le rendement en huile essentielle

On observe que le rendement en huile le plus faible est obtenu pour le niveau inférieur du débit de vapeur d'eau et le niveau supérieur de la masse de matière végétale. En effet, dans ce cas, le tassement de la plante dans l'extracteur est important, ce qui impose à la vapeur des chemins préférentiels. Ces chemins préférentiels sont créés, aussi, lorsque le débit de vapeur est élevé et la masse de matière végétale faible. Dans ces cas, le contact intime entre la vapeur et la totalité de la masse de matière végétale n'est pas assuré, ce qui provoque une diminution du rendement.

III.3.4. Evaluation statistique du modèle mathématique

Les résultats de l'évaluation statistique du modèle, obtenus à l'aide du logiciel Statgraphics centurion XV, sont présentés sur le tableau III.7 suivant.

Tableau III.7 : Evaluation statistique du modèle

R ²	86,50%
Erreur standard de l'estimation	0,11
Erreur moyenne absolue	0,06

La statistique du R-carré mesure la qualité de l'ajustement du modèle aux valeurs observées de la réponse et indique que le modèle explique 86,50 % de la variabilité du rendement en huile essentielle.

L'erreur standard de l'estimation indique l'erreur expérimentale, alors que l'erreur moyenne absolue représente l'erreur moyenne dans la prévision de la réponse en utilisant le modèle ajusté. Ces deux erreurs, respectivement, 0,11 et 0,06, sont très faibles et par conséquent le modèle établi peut être utilisé pour prévoir le comportement du système étudié.

III.3.5. Optimisation

III.3.5.1. Optimisation par la méthode analytique

Les valeurs optimales des deux paramètres ont été calculées, par la méthode analytique d'optimisation, en annulant les dérivées partielles de l'équation du modèle mathématique par rapport à chacune des variables x_1 et x_2 . Ces valeurs sont présentées dans le tableau III.8 suivant.

Tableau III.8 : Valeurs optimales des deux paramètres

Paramètre Variable	Masse de matière végétale humide	Débit de vapeur d'eau
Variables réduites	-0,021	+0,042
Variables réelles	699,58 g	6,28 mL/min

Le point stationnaire est situé au centre du domaine expérimental et correspond au maximum de la fonction, puisque le déterminant d'ordre impair est négatif et celui d'ordre pair est positif.

III.3.5.2. Optimisation par la surface de réponse

La surface de réponse est un graphique représentant la réponse du système étudié prévue par le modèle, comme une fonction des deux paramètres expérimentaux [61]. La figure III.13, suivante, présente la surface de réponse estimée par le modèle.

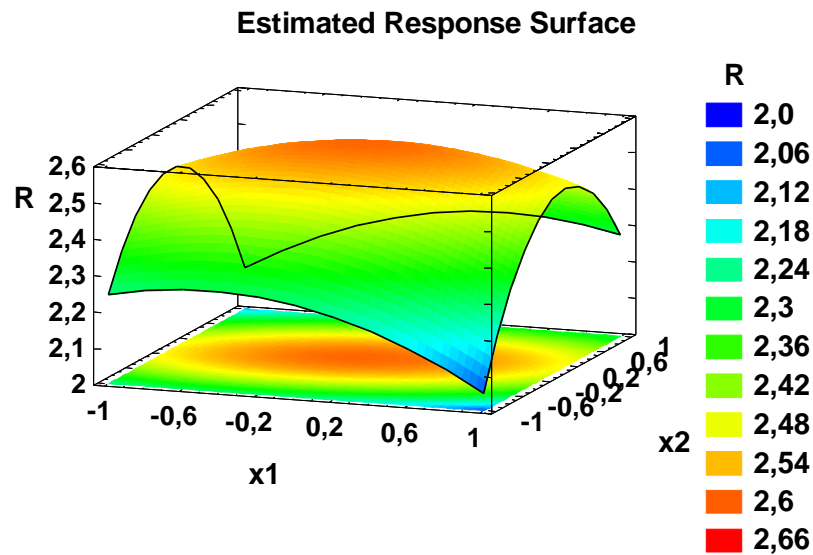


Figure III.13: Surface de réponse estimée

La projection de la surface de réponse estimée sur un plan horizontal, donne un graphique d'iso-contours, présenté sur la figure III.14, qui affiche des lignes ou des régions colorées basées sur les valeurs de la réponse prévue.

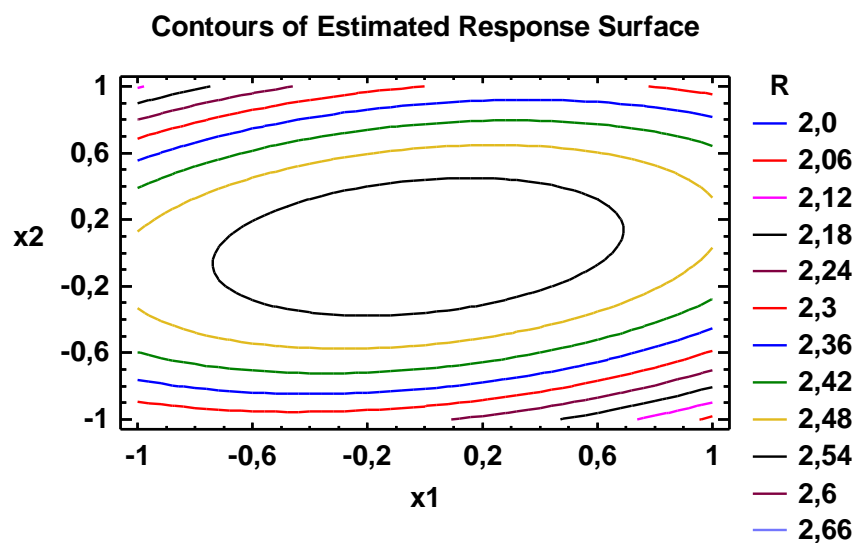


Figure III.14: Iso-contours de la réponse estimée

L'examen des figures III.13 et III.14 montre que le meilleur rendement est obtenu pour des valeurs des variables réduites tendant toutes les deux vers 0. Aussi, le modèle prévoit un maximum du rendement en huile pour l'essai réalisé dans les conditions opératoires au voisinage du point [0, 0], soit, en coordonnées réelles, [699,58 g ; 6,28 mL/min]. En effet, le meilleur rendement en huile essentielle, 2,66%, a été obtenu expérimentalement dans ces conditions opératoires.

III.4. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., en absence et en présence d'un tensioactif

Deux échantillons de *Rosmarinus officinalis* L., représentatifs du Lot 2 ont été soumis à entraînement à la vapeur d'eau dans les conditions optimales. L'échantillon 1 n'a subi aucun traitement préalable, alors que l'échantillon 2 a été immergé pendant 24 heures dans une solution aqueuse du tensioactif non ionique. La masse du tensioactif à utiliser a été calculée à partir du rapport masse du tensioactif / masse de matière végétale sèche (M_{TA}/M_{mvs}) indiqué comme optimal par les travaux antérieurs [30].

Les résultats, relatifs aux rendements en huile de ces deux essais, nous semblent être entachés d'erreur expérimentale, car le rendement obtenu en présence de tensioactif, égal à 2,57%, s'est avéré inférieur à celui, de 2,87%, obtenu en absence de tensioactif. Or, lors de l'hydrodistillation de la plante du même lot, une augmentation du rendement en huile de 30% a été observée [30] en présence de tensioactif. On pourrait, éventuellement, envisager une différence des rendements en huile, obtenus par les deux techniques d'extraction en présence de tensioactif, par le fait qu'au cours de l'hydrodistillation la matière végétale est en contact permanent avec la solution aqueuse du tensioactif en ébullition, pendant toute la durée d'extraction, alors que ce n'est pas le cas lors de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau. Toutefois, à notre avis, il serait peu probable que la diminution du rendement soit provoquée par la présence du tensioactif. Il est évident que ce résultat doit être confirmé ou infirmé par des essais supplémentaires.

III.5. Composition chimique des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* L., obtenues par entraînement à la vapeur d'eau avec et sans tensioactif

Les chromatogrammes des échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. obtenus sans (échantillon 1) et avec (échantillon 2) tensioactif présentés sur les figures III.15 et III.16, respectivement, ont des allures qui suggèrent des compositions qualitatives similaires.

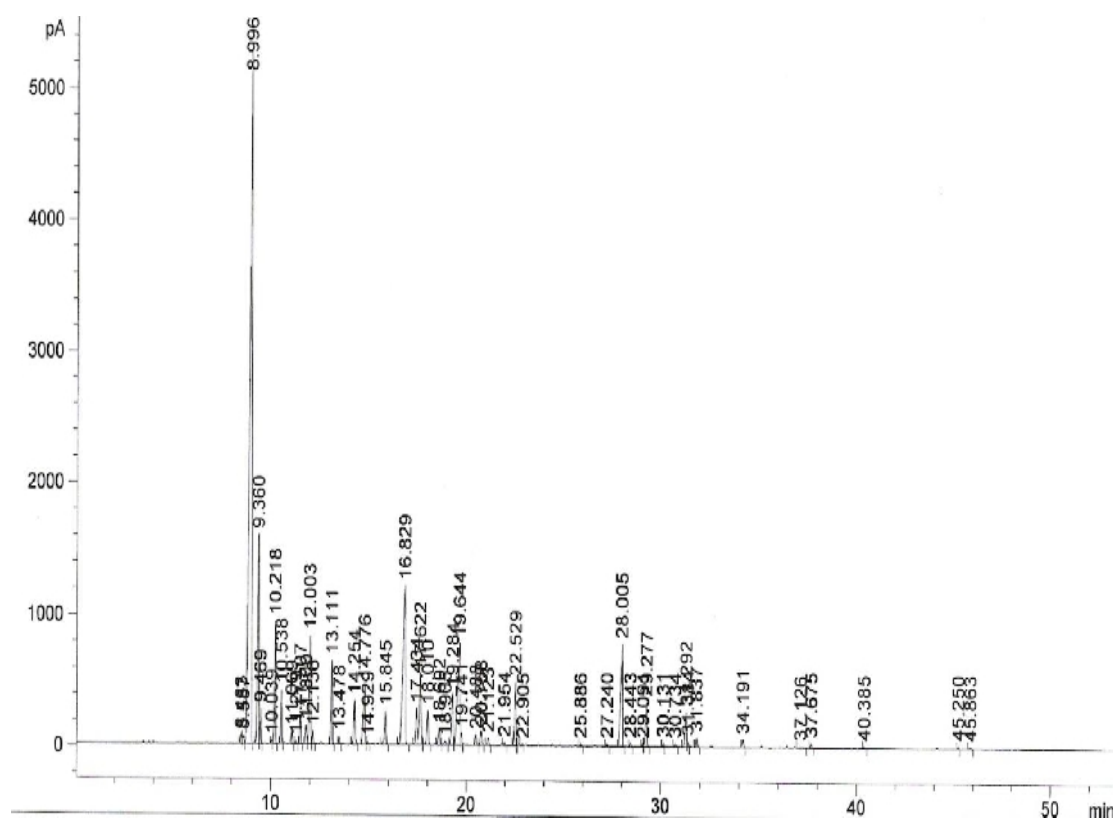


Figure III.15: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., obtenu par entraînement à la vapeur d'eau sans utilisation de tensioactif (échantillon 1)

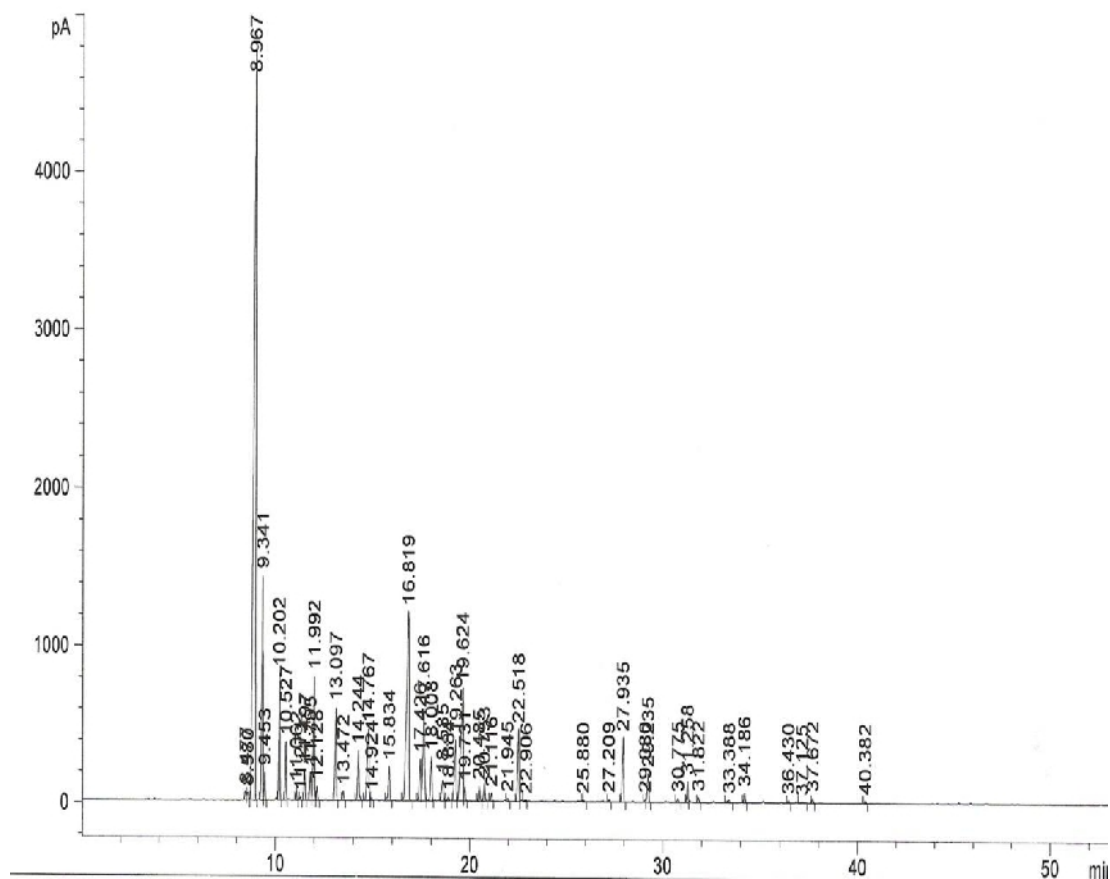


Figure III.16: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., obtenu par entraînement à la vapeur d'eau avec utilisation de tensioactif (échantillon 2)

L'identification des constituants des huiles essentielles a été réalisée par comparaison de leurs indices de rétention à ceux publiés dans la littérature [79] et à ceux de la banque de données constituée dans notre laboratoire par des recherches antérieures.

A cet effet, un mélange, constitué de n-alcanes, contenant 9 à 22 atomes de carbone, a été analysé dans les mêmes conditions opératoires. Les indices de rétention ont été calculés par la formule suivante :

$$I = 100 n + 100 \frac{t_i - t_n}{t_{n+1} - t_n} \quad (\text{III.2})$$

Où: t_i , t_n , t_{n+1} sont les temps de rétention des constituants i , n et $n+1$ respectivement.

Avec i : constituant à identifier; n : alcane élué avant le constituant i ; $n + 1$: alcane élué après le constituant i .

Les constituants identifiés dans les deux échantillons, leurs indices de rétention et leurs teneurs relatives sont réunis dans le tableau III.9 suivant.

Tableau III.9: Indices de rétention, teneurs relatives, en %, des composés identifiés dans les échantillons d'huile essentielle de *R. officinalis* L. obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif

N°	Nom du composé	Indices de rétention			Teneur relative, %	
		IR réf.	IR Ech. 1	IR Ech. 2	Echantillon 1	Echantillon 2
1	tricyclène	919	920	920	0,34	0,27
2	alpha-pinène	934	934	933	37,74	36,76
3	camphène	948	947	946	5,82	5,95
4	1-octen-3-ol	951	951	950	0,77	0,59
5	sabinène	969	970	-	0,10	-
6	beta-pinène	975	976	976	3,38	3,35
7	beta-myrcène	988	987	987	1,34	1,38
8	alpha-phellandrène	1004	1004	1004	0,32	0,29
9	3-carène	1008	1010	1010	0,08	0,08
10	alpha-terpinène	1015	1016	1016	0,77	0,76
11	p-cymène	1027	1024	1024	0,55	0,78
12	D-limonène	1029	1029	1029	3,47	3,83
13	beta-ocimène	1035	1033	1033	0,33	0,34
14	gamma-terpinène	1057	1059	1059	2,59	2,67
15	beta-terpinène	1071	1069	1069	0,23	0,25
16	alpha-terpinolène	1087	1090	1090	1,38	1,52
17	linalol	1101	1104	1103	2,64	3,15
18	campholenal	1128	1129	1128	1,19	1,17
19	camphre	1150	1152	1152	9,26	10,82
20	pinocarvone	1163	1166	1166	1,23	1,38
21	bornéol	1175	1171	1171	3,01	3,59
22	terpinen-4-ol	1185	1180	1180	1,20	1,49
23	trans-verbénol	1193	1194	1193	0,70	0,86
24	alpha-terpinéol	1201	1201	1200	0,16	0,16
25	D-verbénone	1212	1209	1209	2,15	2,46
26	isobornéol	1215	1217	1217	6,35	6,44
27	E-carvéol	1230	1236	1236	0,36	0,49
28	D-carvone	1242	1242	1242	0,48	0,57
29	acétate de bornyle	1279	1281	1281	2,22	2,36
30	2-undécane	1289	1289	1290	0,08	0,10
31	copaène	1369	1369	1369	0,06	0,06
32	gamma-caryophyllène	1389	1390	1392	0,07	0,08
33	méthyl-eugénol	1408	1411	1410	4,45	2,20
34	butyrate de linalyle	1422	1422	-	0,08	-
35	aromandendrène	1436	1438	1438	0,09	0,09
36	humulène	1451	1453	1452	1,69	0,94
37	2-dodécenal	1467	1464	-	0,09	-
38	germacrène-D	1480	1479	1480	0,09	0,14
39	trans-méthylisoeugenol	1491	1492	1492	1,13	0,61
40	α-muuroolène	1498	1495	-	0,12	-
41	beta-bisabolène	1506	1506	1506	0,28	0,15
42	germacrène-B	1556	-	1556	-	0,14
43	acide laurique (C12)	1571	-	1574	-	0,28
44	cubenol	1632	1633	1634	0,08	0,10
45	acide myristique (C14)	1720	1723	1723	0,06	0,08

Si l'on se réfère à la définition des chémotypes de *Rosmarinus officinalis* L., l'huile essentielle appartient au chémotype de camphre, identifié comme majoritaire, après l' α -pinène [52].

Dans le tableau III.10 sont réunies les teneurs des constituants identifiés dans les deux échantillons analysés, selon leur appartenance à une classe chimique.

Tableau III.10: Teneurs relatives, en %, des classes chimiques des composés identifiés dans les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. obtenues sans (Echantillon 1) et avec tensioactif (Echantillon 2)

Total, %	Echantillon 1	Echantillon 2
Identifiés	98,53	98,73
Monoterpènes	57,89	57,45
Sesquiterpènes	2,40	1,60
Monoterpènes oxygénés	30,95	34,94
Dérivés aromatiques	6,13	3,59
Acides carboxyliques	0,06	0,36

Les résultats présentés dans le tableau III.10 montrent que près de 98% des constituants des deux échantillons ont été identifiés. Les monoterpènes représentent près de 57% dans les deux échantillons. Par ailleurs, les teneurs en sesquiterpènes et en aromatiques sont plus élevées dans l'échantillon obtenu sans tensioactif. Par conséquent, l'huile essentielle de cet échantillon 1 a un caractère hydrophobe supérieur à celui de l'échantillon 2. En effet, ce dernier contient 4% de plus de monoterpènes oxygénés et 6 fois plus d'acides carboxyliques.

Cette différence de composition des huiles extraites avec et sans tensioactif a été déjà rapportée par des travaux antérieurs [30] et attribuée aux propriétés mouillantes, solubilisantes et émulsifiantes du tensioactif. Selon un mécanisme hypothétique proposé [30] pour expliquer l'action du tensioactif dans l'extraction des huiles essentielles, il interviendrait de la manière suivante:

- Il contribuerait, en premier lieu, au mouillage par l'eau de la surface hydrophobe de la matière végétale, en diminuant la tension superficielle.
- Il faciliterait, ensuite, la pénétration de l'eau à travers les cuticules des trichomes peltés et capités, contenant l'huile essentielle, en solubilisant la bicouche lipidique présente dans les cuticules. L'hydrolyse des lipides libère des alcools et acides des gras. Parmi ces derniers, certains sont entraînés à la vapeur d'eau et se retrouvent dans l'huile essentielle.

- Il favoriserait, enfin, la formation d'une émulsion eau-huile à l'intérieur des trichomes. La pression dans les trichomes, ou pression de turgescence, augmentée par la présence d'eau, permettrait l'acheminement de l'émulsion eau-huile vers la surface de la cuticule, où l'huile est entraînée par le flux de vapeur.

III.6. Propriétés physiques et biologiques de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L.

Les propriétés physiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité d'une huile essentielle. L'aspect, l'indice de réfraction et la densité, ont été déterminées pour l'ensemble des échantillons, d'huile essentielle, obtenus.

III.6.1. Aspect

L'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. est un liquide mobile, limpide, presque incolore à jaune pâle et d'odeur caractéristique fraîche, plus ou moins camphrée.

III.6.2. Indice de réfraction

Les indices de réfraction mesurés, pour chaque échantillon de l'huile essentielle, à la température de 23°C, ensuite ramenés à 20°C, sont présentés sur le tableau III.11 suivant.

Tableau III.11 : Indices de réfraction à 20°C des huiles essentielles obtenues dans différentes conditions opératoires

	Mesure	(x ₁ ; x ₂)	Indice de réfraction à 20°C
Lot n°1	1	(+1 ; -1)	1,4702
	2	(0 ; -1)	1,4702
	3	(-1 ; -1)	1,4682
	4	(+1 ; +1)	1,4692
	5	(0 ; +1)	1,4702
	6	(-1 ; +1)	1,4702
	7	(+1 ; 0)	1,4667
	8	(0 ; 0)	1,4702
	9	(-1 ; 0)	1,4712
	10	(0 ; 0)	1,4702
Lot n°2	1	(0 ; 0)	1,4702
	2	(0 ; 0)	1,4672

Nous constatons que les indices de réfraction mesurés, varient en fonction des conditions opératoires d'extraction, mais sont conformes à la norme AFNOR NF T 75-114, qui limite l'indice de réfraction de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. du chémotype à camphre entre 1,4660 et 1,4740. [65]

III.6.3. Densité

Les densités mesurées, pour chaque échantillon de l'huile essentielle, à la température de 23°C, ensuite ramenés à 20°C, sont présentées sur le tableau III.12 suivant.

Tableau III.12 : Densités à 20°C des huiles essentielles obtenues dans différentes conditions opératoires

	Mesure	(x ₁ ; x ₂)	Densité à 20°C
Lot n°1	1	(+1 ; -1)	0,8893
	2	(0 ; -1)	0,8916
	3	(-1 ; -1)	0,8863
	4	(+1 ; +1)	0,8849
	5	(0 ; +1)	0,8772
	6	(-1 ; +1)	-
	7	(+1 ; 0)	0,8845
	8	(0 ; 0)	0,8879
	9	(-1 ; 0)	0,8898
	10	(0 ; 0)	0,8879
Lot n°2	1	(0 ; 0)	0,8855
	2	(0 ; 0)	0,8866

Nous constatons que les densités mesurées, sont conformes à la norme AFNOR NF T 75-111, qui limite la densité de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L entre 0,860 et 0,920. [65]

III.6.4. Activités antimicrobiennes

III.6.4.1. Méthode d'antibiogramme

Les antibiogrammes réalisés pour les deux échantillons de l'huile essentielle, obtenus sans, échantillon 1, et avec tensioactif, échantillon 2, vis-à-vis de chacun des microorganismes étudiés, sont présentés dans les figures III.17, III.18, III.19 et III.20 suivantes.

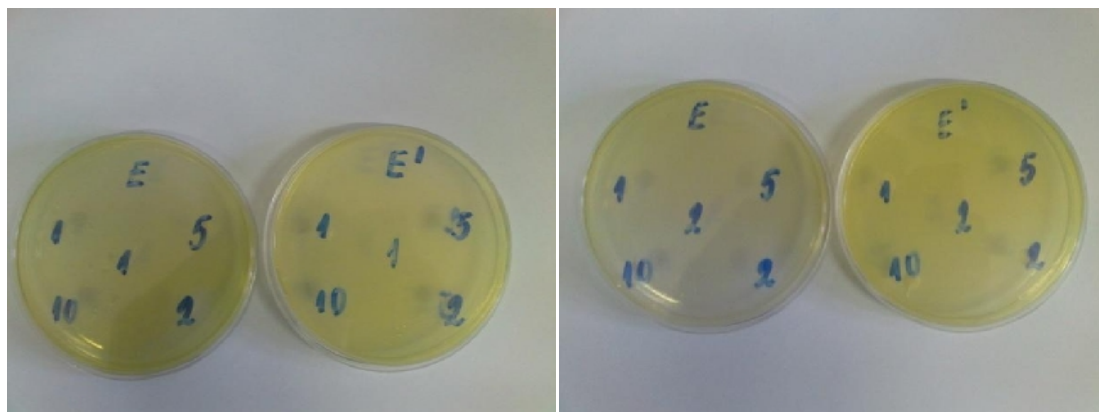


Figure III.17 : Antibiogramme des deux échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif, vis-à-vis d'*E. coli*

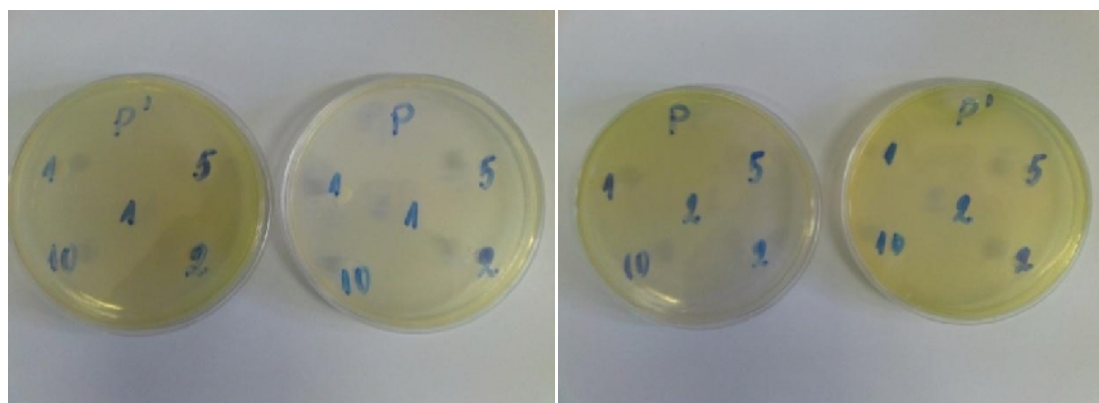


Figure III.18 : Antibiogramme des deux échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif, vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

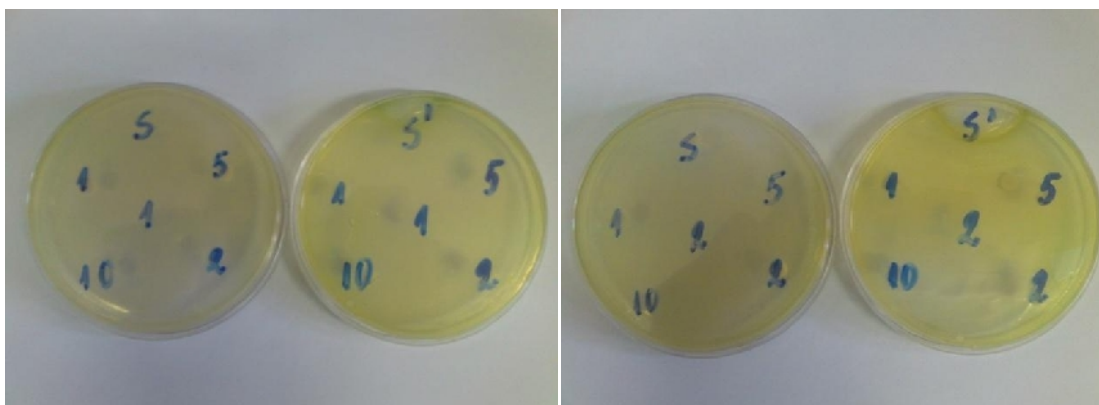


Figure III.19 : Antibiogramme des deux échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L., obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif, vis-à-vis du *Staphylococcus aureus*

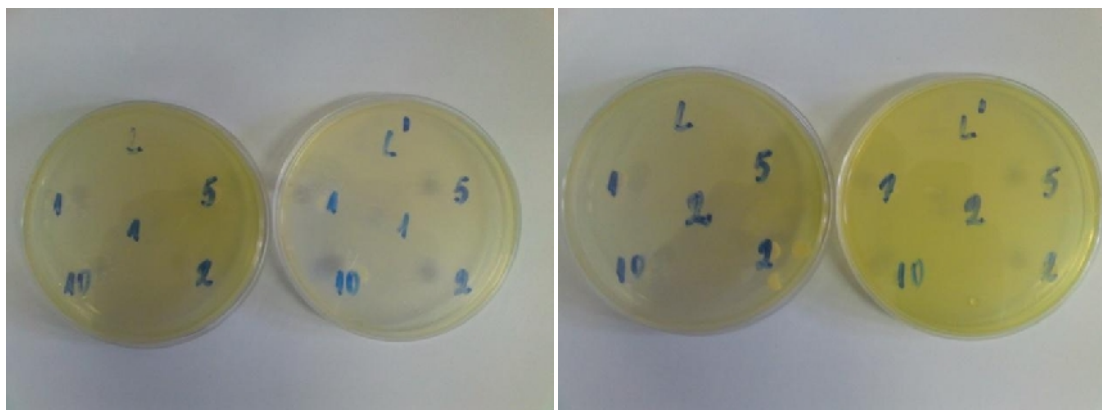


Figure III.20 : AntibioGramme des deux échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. obtenus sans (1) et avec (2) tensioactif, vis-à-vis de la *levure osmophile*

L'examen de l'ensemble des boîtes de Pétri a montré que les colonies de micro-organismes se sont développées au contact des disques, imprégnés d'huile essentielle. Un tel résultat peut signifier, soit une absence d'activité antimicrobienne des huiles testées, soit une mauvaise diffusion de l'huile dans le milieu nutritif. Nous sommes tentés à retenir la seconde hypothèse, en se référant au caractère hydrophobe des huiles testées, dont la teneur en hydrocarbures terpéniques et aromatiques, apolaires, voisine les 65%, alors que le milieu nutritif est un milieu aqueux. Dans un tel cas, certains auteurs [80] recommandent l'ajout d'un tensioactif au milieu nutritif pour favoriser la diffusion de l'huile. Cette façon de procéder pourrait faire objet des futures recherches.

Par ailleurs, cette seconde hypothèse semble être confortée par les résultats positifs des essais d'évaluation des propriétés antimicrobiennes des deux échantillons 1 et 2 vis-à-vis des mêmes microorganismes, mais en utilisant la méthode de microatmosphère.

III.4.4.2. Méthode de microatmosphère

Les résultats obtenus par cette méthode, pour les deux échantillons de l'huile essentielle extraite sans (1) et avec (2) tensioactif vis-à-vis des micro-organismes testés, sont illustrés par les photos des figures III.21 et III.22.

Sur ces photos sont désignés par :

1: échantillon de l'huile essentielle extraite sans utilisation de tensioactif ;

2: échantillon de l'huile essentielle extraite avec utilisation de tensioactif ;

T : témoin

S: *Staphylococcus aureus*

E: *Echerichia. coli*

P: *Pseudomonas aeruginosa*

L: *Levure osmophile*

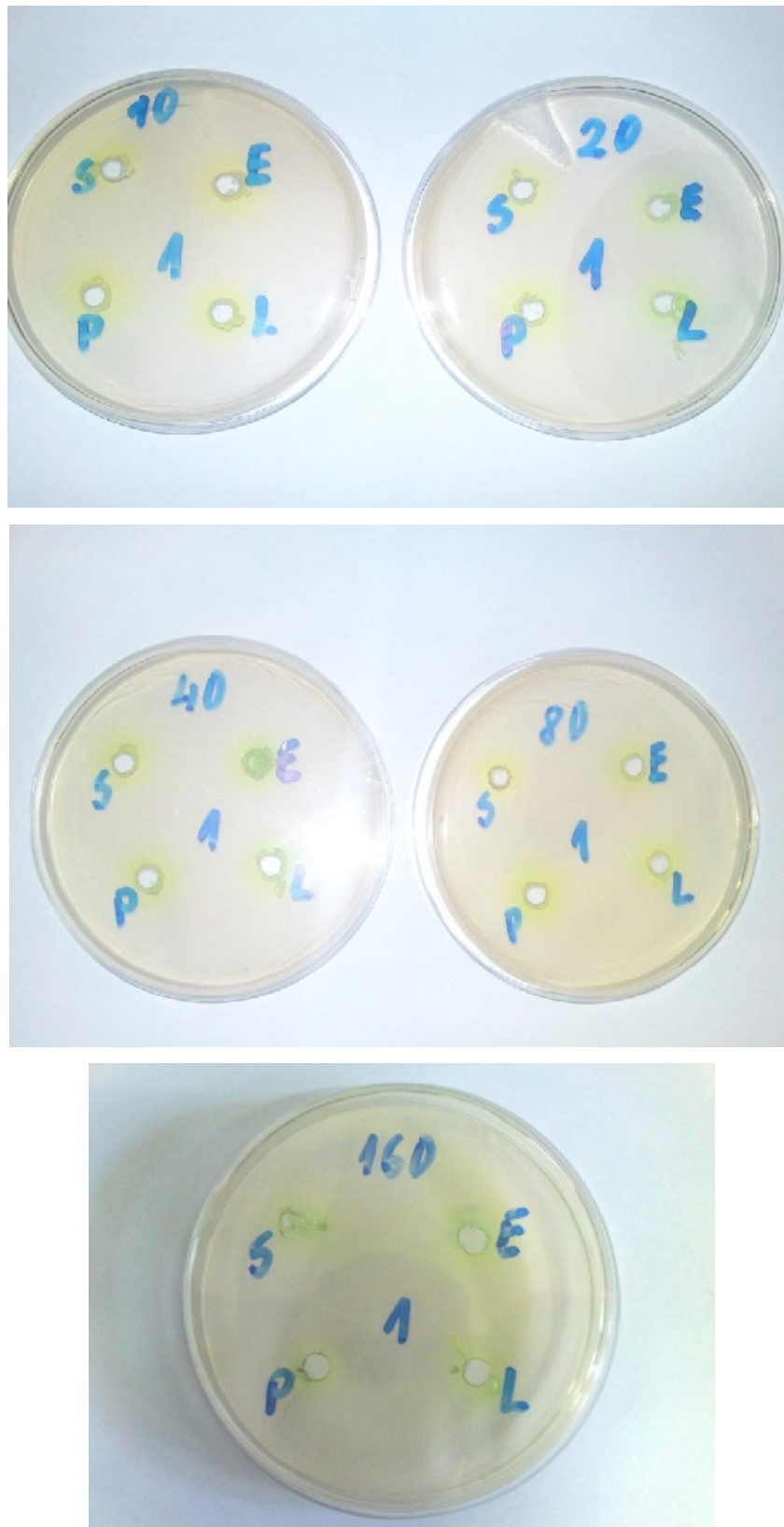


Figure III.21 : Méthode de microatmosphère : activité de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. extraite sans tensioactif (échantillon 1) vis-à-vis des micro-organismes testés

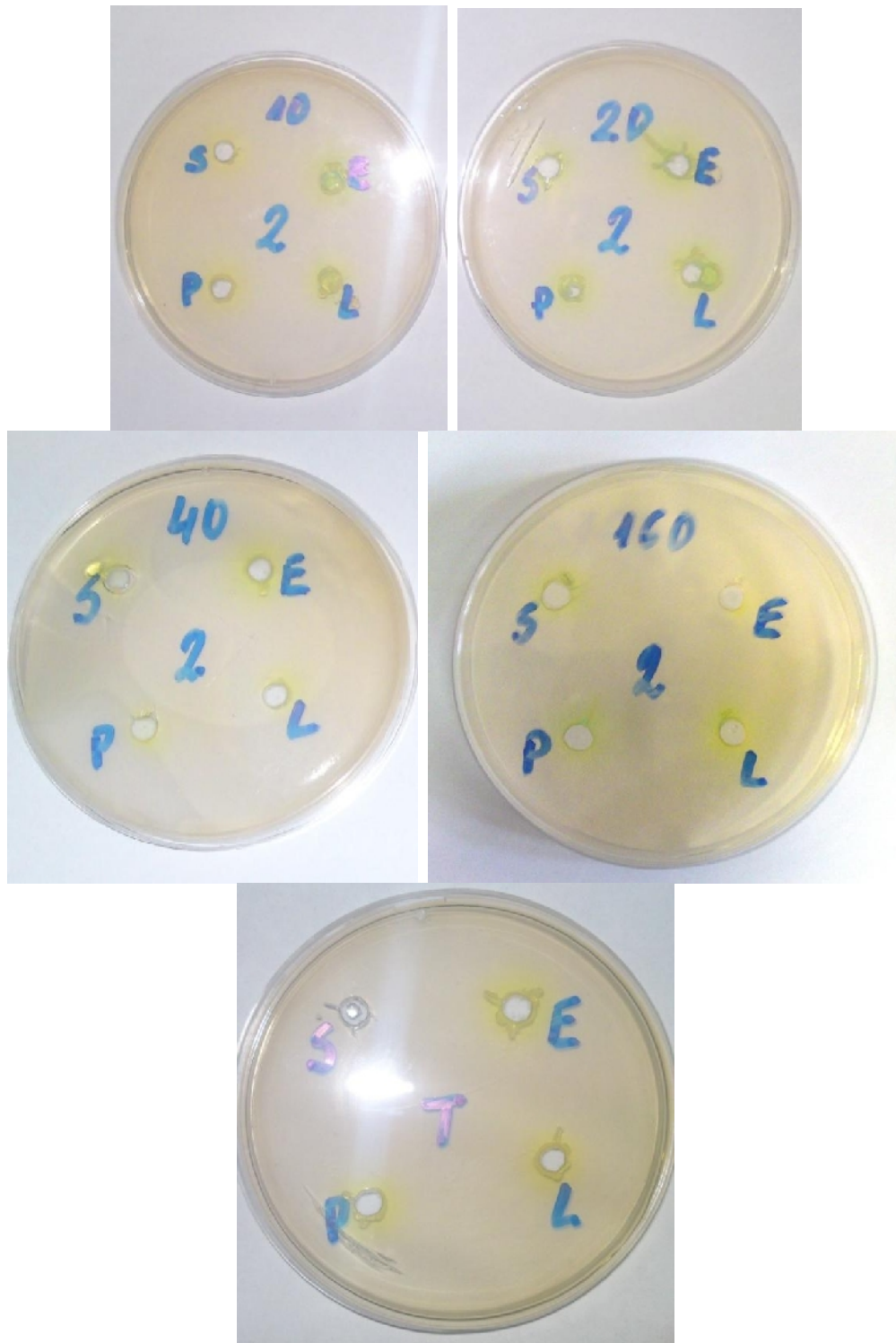


Figure III.22 : Méthode de microatmosphère : activité de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. extraite avec tensioactif vis-à-vis des micro-organismes testés

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau III.13 suivant, où figurent, aussi, les résultats d'une étude antérieure [67].

Tableau III.13 : Quantités minimales inhibitrices, QMI, obtenus par la méthode de microatmosphère

Micro-organisme étudié	QMI (µL)			
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 303 [67]	Echantillon 505 [67]
<i>Escherichia coli</i>	160	160	40 40	80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	160	40	>160	>160
<i>Staphylococcus aureus</i>	80	40	40	40
<i>Levure osmophile</i>	160	40	-	-

L'échantillon 303 contient des huiles essentielles de géranium, lavande, sauge et thym rouge. L'échantillon 505 contient des huiles essentielles de cannelle, thym rouge, eucalyptus et citronnelle. Les deux échantillons contiennent un émulsifiant non ionique E 40. Ils ont été préparés au Laboratoire COMPAL et testés au Laboratoire AIR PHARMA.

L'examen des résultats nous permet de conclure que l'échantillon 2, obtenu après un traitement préalable de la matière végétale avec tensioactif, présente une activité vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa* et de la *Levure osmophile* supérieure à celle de l'échantillon 1, obtenu sans traitement préalable avec tensioactif, puisque les QMI obtenus pour cet échantillon sont plus faibles. Par ailleurs, ils sont les mêmes que ceux trouvés pour le *Staphylococcus aureus* des échantillons 303 et 505. Par contre, l'*Escherichia coli* s'est avéré plus résistant à nos échantillons, QMI égal à 160µL, contre 40 et 80µL, respectivement pour les échantillons 303 et 505.

Ces résultats nous permettent, donc, d'envisager l'utilisation de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. en tant qu'agent d'assainissement du système de traitement de l'air en milieu hospitalier, par micronisation dans les réseaux de climatisation au niveau des services cliniques, salles blanches, des bureaux, halls de réception et locaux administratifs.

Conclusion

Ce travail porte sur l'extraction, par entraînement à la vapeur d'eau, de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. provenant d'un lot cultivé à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger. Les essais d'extraction ont été réalisés dans une installation semi pilote, avec cohobage.

L'optimisation des paramètres du procédé, en l'occurrence, la masse de la matière végétale et le débit de vapeur d'eau, a été menée par planification des expériences, en adoptant le plan factoriel à trois niveaux des deux paramètres, 3^2 .

L'installation étant dépourvue de régulation du débit de vapeur, des mesures des débits à blanc ont été effectuées, en faisant varier l'apport de chaleur à l'aide des rubans chauffants, afin de fixer les trois niveaux de ce paramètre. Les niveaux inférieur et supérieur de la masse de matière végétale correspondent, respectivement, aux tassements minimal et maximal de la plante dans le volume utile de l'extracteur.

Les essais programmés par le plan factoriel ont été réalisés, en utilisant des échantillons représentatifs d'un même lot de matière végétale. Les résultats obtenus, traités à l'aide du logiciel Statgraphics centurion XV, ont permis d'établir un modèle mathématique de second ordre, donnant l'évolution du rendement, en fonction des paramètres étudiés, et de localiser les conditions opératoires maximisant le rendement en huile, dans le domaine d'étude, comme suit :

- Masse de la matière végétale : 700 g
- Débit de vapeur d'eau : 6,28 mL/min
- Rendement maximal : 2,66%

Des essais supplémentaires ont été réalisés dans les conditions optimales, avec un second lot de matière végétale, sans et avec un traitement préalable de la plante par une solution aqueuse de tensioactif non ionique. Les rendements en huile, ainsi obtenus sont, respectivement, 2,87 et 2,57%. Ce résultat, en contradiction avec les résultats des travaux antérieurs, nous semble entaché d'erreur expérimentale et nous amène à recommander sa confirmation.

L'analyse par CPG des deux échantillons d'huile, obtenus sans et avec utilisation de tensioactif, a montré une composition qualitative similaire, mais du point de vue quantitatif, des différences sensibles ont été constatées. A l'origine de ces différences quantitatives, déjà rapportées par des travaux antérieurs, serait l'interaction entre le tensioactif et les tissus végétaux, où il intervient par ses propriétés mouillantes, solubilisantes et émulsifiantes.

L'activité antimicrobienne des échantillons de l'huile essentielle obtenus, avec et sans utilisation de tensioactif, a été évaluée in vitro vis-à-vis de trois souches bactériennes:

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et une levure osmophile, par deux méthodes, à savoir, la méthode de l'antibiogramme et la méthode de micro atmosphère.

Les résultats des tests, réalisés par la méthode d'antibiogramme, se sont révélés tous négatifs, car une croissance des colonies des micro-organismes étudiés a été observée au contact des disques imprégnés d'huile essentielle. Par contre, la méthode de micro atmosphère a permis de déterminer des quantités minimales inhibitrices, en particulier pour l'huile obtenue avec utilisation de tensioactif, comparables à ceux observés pour des mélanges commerciaux d'huiles essentielles recommandés, notamment, pour assainissement de l'air dans des locaux hospitaliers pour lutter contre les maladies nosocomiales.

A notre avis, « l'inefficacité » de l'huile essentielle, constatée par la méthode d'antibiogramme, est à attribuer au protocole expérimental utilisé. En effet, la nature hydrophobe de l'huile, mise en évidence par l'analyse CPG, l'empêche de diffuser dans le milieu aqueux de la gélose nutritive et d'inhiber la croissance des microorganismes. En s'inspirant des études antérieures, nous recommandons l'addition d'un émulsifiant dans le milieu nutritif qui favoriserait la diffusion de l'huile.

Enfin, les propriétés physiques, en l'occurrence, la densité et l'indice de réfraction, de l'ensemble des échantillons de l'huile essentielle, déterminés par les méthodes normalisées, sont conformes aux normes en vigueur.

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.

Bibliographie

- [1] **Site web:** [http://www.petitpanda.info/les huiles essentielles](http://www.petitpanda.info/les_huiles_essentielles).
- [2] **Site web:** <http://www.penntybio.com/huiles/extraction-huile-essentielle.htm>.
- [3] **DICTIONNAIRE LAROUSSE**, édition 2000.
- [4] **ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION**,
Huiles essentielles, Tome 2, 5^{ème} édition, Paris, Février 1998.
- [5] **M. WICHTL, R. ANTON**,
Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2^{ème} édition,
Ed. TEC et DOC, 2003.
- [6] **J. BRONETON**,
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 8^{ème} édition, 1993.
- [7] **P. BLACK**,
The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species, Chapter one, Ed White house, UK,
1997.
- [8] **Site web:** <http://www.notes-de-provence.comconseil2.html>.
- [9] **Site web:** [http://www.comment utiliser les huiles essentielles.htm](http://www.comment_utiliser_les_huiles_essentielles.htm).
- [10] **E. GUEORGUIEV**,
Technologie des produits aromatiques naturels et synthétiques, Ed. Zemizdat, Sofia, 1995.
- [11] **J. P. WILLEM**,
Les huiles essentielles, médecine d'avenir, Ed. Dauphin, Belgique, 2004.
- [12] **M. SAWAMURA**,
Citrus essential oils: flavor and fragrance, Groupe de recherche en eco-extraction de produits
naturels, Ed. de l'Université d'Avignon, 2009.
- [13] **Y. R. NAVES**,
Technologie des parfums naturels, Ed. Masson, 1974.
- [14] **M. MARIN, V. KOKO, S. DULETIC-LAUSEVIC**,
Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and
histochemistry, South African Journal of Botany, 72: 378–382, 2006.
- [15] **C. VON ROCHENBERG**,
Théorie de séparation de l'huile étherée par distillation, Ed. Selbot, 1910.
- [16] **C. GUENTHER**,
The Essential Oils, Tome 1, Ed. Krifger, 1972.
- [17] **N. GOKHALE, Y. MASADA**,
Proceedings of VII International congress of Essential Oils, Singapore, 1977.

- [18] **J. GARNERO**,
Terpenoïdes et esters polyacétyléniques de l'huile essentielle d'*Erigeron naudini*,
Phytochemistry, Octobre 1980.
- [19] **J. VIDAL**,
Thermodynamique méthodes appliquées au raffinage et au génie chimique, Société des
éditions Technip & IFP, Paris, 1973.
- [20] **D. L. PAVIDA, G. M. LAMPMAN et G. S. KRIZ**,
Introduction to organic laboratory techniques, Ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, USA,
1976.
- [22] **T. TRANDAFILOV, E. MINKOV**,
Die Pharmazie, vol.24, pp. 327-328, 1969.
- [23] **E. MINKOV, D. MIHAILOVA, T. TRANDAFILOV**,
Die Pharmazie, vol. 22, pp 213-215, 1967.
- [24] **D. MIHAILOVA, E. MINKOV, T. TRANDAFILOV**,
Die Pharmazie, 21, pp 483-485, 1966.
- [25] **E. MINKOV, D. MIHAILOVA, T. TRANDAFILOV**,
Die Pharmazie, vol.21, pp 611-613, 1966.
- [26] **G. GANTCHEV, L. PETKOV, L. KOUPENOV**,
Travaux scientifiques de l'Université des Technologies Alimentaires, vol. 25, N3, pp. 193-
196, Plovdiv, Bulgarie, 1978.
- [27] **H. BAYDAR, N. BAYDAR**,
The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil
content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.), Industrial Crops and
Products, vol. 21, 2005.
- [28] **A. DOBREVA, N. KOVATCHEVA**,
Travaux scientifiques de l'Université des Technologies Alimentaires, vol. 55, N°1, pp 303 -
307, Plovdiv, Bulgarie, 2007.
- [29] **V. STAIKOV, G. ZOTOVITCH**,
Risvista Italiana, N° 12, pp 547-549, 1963.
- [30] **M. ABDELLI**,
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, 2010.
- [31] **S. CHARCHARI, N. BOUDINA A. BENHALLA**,
4^{ème} Symposium International sur les plantes aromatiques et médicinales, Mohammedia, Maroc,
12-13 Mai 2011.

- [32] **T. F. TADROS**,
Surfactant in Agrochemicals, Ed. Marcel Dekker, New York, Vol. 54, 1994.
- [33] **J. T. DAVIES**,
A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent, Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface. Proceedings of the International Congress of Surface Activity, 1957.
- [34] **W. C. GRIFFIN**,
Classification of Surface-Active Agents by 'HLB, Journal of the Society of Cosmetic Chemists 1, 1949.
- [35] **Site web**: <http://www.surface.akzonobel.com/bulletins/newlogoemulsions.pdf>.
- [36] **R. F. REVERTS**,
Esau's Plant Anatomy, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- [37] **A. SCHELER**,
Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne. 1862.
- [38] **J. C. RAMEAU**,
Flore forestière française: Région méditerranéenne, Ed. Institut pour le développement forestier / Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2008.
- [39] **Y. DONADIEU**,
Les thérapeutiques naturelles, plantes médicinales, romarin, 2001-2008.
Site web: <http://www.01sante.com/xoops/modules/icontent/index.php?page=655>.
- [40] **P. LEFRANÇOIS, F. RUBY**,
Société canadienne de recherche sur les PSN, octobre 2009.
Site web: <http://www.passeportsante.net/fr/Solutions/PlantesSupplements/Index.aspx>.
- [41] **Site web**: http://www.aroma-zen.com/gemmotherapie_maceratmere-glycerine-unitaire_romarin-rosmarinus-officinalis-herbalgem-p-815.html.
- [42] **V. RODZOKO**,
Abécédaire de Phytothérapie, Romarin, 1999-2000.
Site web: <http://www.larodz.cher-alice.fr/plantes/romarin.html>
- [43] **Site web**: <http://www.supertoinette.com/fiche-cuisine/124/romarin.html>.
- [44] **Centre de promotion et d'études en sante naturelle, 2002-2010.**
Site web: <http://www.masantenaturelle.com/chroniques/herbier/romarin.php>,
- [45] **A.Y. CAMINO**,
Le romarin, Edition Ion, Madrid, 1971.
- [46] **B. BEAUQUESNE, L. PINKAS, M. TORK**,
Plantes médicinales des régions tempérées, Edition Masson, 1980.

[47] E. PERROT,

Plantes médicinales, tome 1, Ed. St Hubin D'Escroville, Paris, 1968.

[48] M. SPIRO, S. S. CHEN,

Kinetics of solvent extraction of essential oil from rosemary leaves, Flavour, Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy, Vol. 29 N°4, 1994.

[49] C. BOUTEKDJIRET,

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, 1999.

[50] M. G. C. CHAVEZ,

Hidrodestilacion de aceites esenciales: modelado y caracterizacion, Thèse de doctorat, Université de Valladolid, Espagne, 2007.

[51] M. RASKIN,

Chémotype ou race chimique, Edition du Laboratoire Orau Honnelles, Belgique, 2003.

[52] S. ALAUX,

Fiche technique huile essentielle biologique romarin camphré, *Rosmarinus officinalis* L., laboratoire Florame aromathérapie, 2006.

[53] S. ALAUX,

Fiche technique huile essentielle biologique romarin cinéole, *Rosmarinus officinalis* L., laboratoire Florame aromathérapie, 2005.

[54] Sit web: www.abcdelanature.com/huiles-essentielles-qz.html.

[55] E. M. MATEUS, C. LOPES, T. NOGUEIRA et coll.

Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal, Silva Lusitana 14(2): 203 - 217, Portugal, 2006.

[56] J. P. DAGNELLE

Principe d'expérimentation, Ed. Presses agronomiques de Gembloux, Belgique, 1981.

[57] Site web: http://fr.wikipedia.org/wiki/Appareil_de_Dean_Stark.

[58] H. BOUHOUN ALI, M. LAOUFI,

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, 2010.

[59] E. KOLLER, "Aide-mémoire de l'ingénieur", Ed. DUNOD, Paris, pp58-59, 2001.

[60] W. TINSSON,

Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques, Mathématiques et Applications, Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010.

[61] J. GOUPY,

Plans d'expériences pour surfaces de réponse, Ed. Dunod, Paris, 1999.

[62] STATGRAPHICS® CENTURION XV,

User manual, Ed. Stat Point Technologies Inc., 2006.

[63] F. ROUESSAC, A. ROUESSAC,

Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes ; Ed. DUNOD, Février 2000.

[64] X. FERNANDEZ,

Publication du Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes, Université de Nice Sophia Antipolis / CNRS, Parc Valrose, 06108 Nice cedex 2.

Site web: http://www.cefe.cnrs.fr/fichiers/Fernandez_jfpCOV2_02030209.pdf.

[65] ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION,

Monographies relatives aux huiles essentielles, 6^{ème} édition, AFNOR, Paris, 2000

[66] M. L. FAUCONNIER,

Huile essentielle d'Ylang Ylang: sa fiche de qualité et son suivi de distillation, Exposé du Projet UE 8 ACP 1.2.3.5.6.10 ComStabex96/9, Moroni, Comores, 2006.

[67] V.-G. De BILLERBECK, C. ROQUES, P. VANIERE, P. MARQUIER,

Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles, Hygiènes, vol.X, N°3, pp. 248-251, 2002.

[68] Site web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/fr/>.

[69] Site web: http://www.orvinfait.fr/escherichia_coli.html.

[70] Site web: <http://www.microbe-edu.org/etudiant/staph.html>.

[71] Site web: <http://www.liste-hygiene.org/STAPHY.html>.

[72] Site web: <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/pseudomonas-aeruginosa-3873.html>.

[73] Site web: <http://www.laease.com/pseudomonas-aeruginosa.html>.

[74] Archive de document de la FAO, Département de l'agriculture,

Site web: <http://www.fao.org/docrep/008/y5771f/y5771f02.htm>.

[75] J. PELLECUER, M. JACOB, S. BOUCHBERG,

Essais d'utilisation d'huiles essentielles de plantes aromatiques méditerranéennes en odontologie conservatrice, Plant Médecine Phytothérapie, 14: 83-98, 1980.

[76] B. BENJILALI, A. TANTAOUI-ELARKI, A. AYADI,

Method to study antimicrobial effects of essential oils: application to the antifungal activity of 6 Moroccan essences. *J Food Prot*47: 748-752, 1984.

[77] W. KELLNER, W. KOBER,

Huiles étherées pour la désinfection de l'espace. Ed.Arzneim Forschung, 1955.

[78] Site web: <http://www.bacdico.net>.

[79] Site web: www.pherobase.com.

[80] J. HOOD, J. M. WILKINSON, H. M. A. CAVANAGH

Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research, *Journal of Essential Oil Research: JEOR*, Nov/Dec 2003.