N°d'ordre : 01/2018-M/GP

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

HOUARI BOUMEDIENE

Faculté de génie mécanique et génie des procèdes

THÈSE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLÔME DE MAGISTER

EN: GENIE DES PROCEDES

Spécialité: Technologie pharmaceutique

Par

M^me^. HENNICHE Houda

Sujet

Extraction et valorisation des huiles essentielles du Romarin (Algérie) obtenues par différents procédés

Soutenue publiquement, le 20/01/2018 devant le Jury compose de:

Mr D.NIBOU	Professeur	à l'USTHB	Président
M^me^ R.MAACHI	Professeur	à l'USTHB	Directrice de thèse
M^me^ H.MOGHRANI	Professeur	à l'USTHB	Examinatrice
Mr F.BENKACI ALI	Professeur	à l'USTHB	Examinateur

REMERCIMENT

Mes plus vifs remerciements vont d'abord à ma directrice de thèse M^me^. MAACHI R. (Professeur de l'Université HOUARI BOUMEDIENE) de m'avoir fait l'honneur et le plaisir de diriger ce travail. Elle a su me guider avec patience, compréhension et rigueur. Je lui en serai toujours reconnaissante.

J'exprime toute ma gratitude à Mr. NIBOU D (Professeur de l'Université HOUARI BOUMEDIENE) Pour avoir accepté de présider ce jury et pour sa grande disponibilité et pour son total dévouement.

M^me^. MOGHRANI H (Professeur de l'Université HOUARI BOUMEDIENE) et Mr. BENKACI A (Professeur de l'Université HOUARI BOUMEDIENE) d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à:

Mme MOGHRANI (Professeur de l'Université de HOUARI BOUMEDIENE) pour tout ce qu'elle a pu nous apporter tout au long de ces années. Avec sa modestie, sa gentillesse, sa rigueur scientifique, et surtout sa disponibilité, elle a su nous guider et corriger, puisse Dieu nous permettre de l'imiter.

De même je remercie infiniment Mme HALOUANE (Professeur de l'Université de Boumerdes) de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire. Avec ses qualités humaines et son expérience, elle a su nous faire aimer le monde merveilleux des bactéries.

Finalement, je remercie infiniment mon cher mari MOHAMMED pour sa patience, son soutien et surtout de me supporter.

Je tiens à exprimer mes sincères gratitudes à ma famille en particulier mon fils SAID et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ATCC : American Type Collection Culture

BHA : HydroxyAnisole Butylé

BHT : HydroxyToluène Butylé

cfu/mL : unités de colonies formés / millilitre

CG : Chromatographie en phase gazeuse

CG/SM : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

EOR : Radicaux libres oxygénée.

g/L : gramme / litre

GHz : Giga Herz

HD : Hydrodistillation

HD-MO : Hydrodistillation assistée par micro-ondes

HD-US : Hydrodistillation assistée par ultrason

HE : Huile Essentielle

IR : Indice de rétention

kcal : kilo calories

m^2/s : mètre carré par seconde

MAE : Microwave Assisted Extraction

MHE : Masse en huile essentielle

MHz : Méga Herz

mol/L : mole/litre

MVS : Masse de la matière végétale sèche

O_2 : Oxygène

P : Pression

pH : Potentiel d'hydrogène

PAM : les plantes aromatiques et médicinales

Rdt : Rendement

***Rosmarinus officinalis* L.** : *Rosmarinus officinalis* Linné.

T : Température

t : temps

tr : Temps de rétention

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques et médicinales, nous avons réalisé une étude sur l'extraction, la caractérisation et la valorisation d'une plante aromatique *Rosmarinus officinalis* provenant de la région d'Alger. Les huiles essentielles de cette plante sont extraites par hydrodistillation et par deux autres procédés de l'hydrodistillation assistés (Hydrodistillation assistée par micro-ondes (HD-MO) et Hydrodistillation assistée par ultrason (HD-US)). Le procédé HD-MO a réduit le temps de l'extraction de 120 à 25 minutes et le procède HD-US de 120 à 50 minutes tout en préservant la qualité de l'huile essentielle.

La caractérisation par CG/MS des huiles essentielles obtenues par les trois procédés a révélé un même composé majoritaire qui est le camphor avec des teneurs de 34.0778, 22.7172 et 30.7563% respectivement pour HD, HD-US et HD-MO.

L'étude des activités biologiques des huiles essentielles extraites a révélé des pouvoirs antioxydant et antimicrobien intéressants. Ces résultats biologiques observés seraient liées à la complexité de la composition chimique et la synergie entre eux.

Mots clés : Huiles essentielles, *Rosmarinus officinalis*, Hydrodistillation, Hydrodistllation assistée, CG/MS, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante.

Liste des Figures

Figure I.1 : Structures chimiques de quelques exemples de monoterpènes……8

Figure I.2:Structures chimiques de quelques exemples de sesquiterpènes……...9

Figure I.3: Exemples des diterpènes……..…9

Figure I.4 : Appareil pour l'extraction des huiles essentielles dans les drogues Végétales (Pharmacopée Européenne « 5ème édition »)……..14

Figure I.5 : Les douze principes de la chimie verte……..……..16

Figure I.6: Différents types de chauffage, à gauche, un tube contenant des réactifs, chauffés par micro-ondes (tout le contenant est chaud en rouge). A droite, un chauffage traditionnel (le cœur du tube est froid en bleu)…….……17

Figure I.7 : Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore……..19

Figure I.8: Photo des feuilles, et des fleurs du romarin……..24

Figure I.9: Aspect morphologique de *Rosmarinusofficinalis*L.…….26

Figure II.1: Localisation géographique de site de prélèvement…….28

Figure II.2 : système adopté à l'extraction par hydrodistillation……...…30

Figure II.3: Montage de l'extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes…..…...31

Figure II.4 : Bain de l'ultrason…….….31

Figure III.1 Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée……..……...39

Figure III.2 Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la forme d'un trichome capité……40

Figure III. 3: Schéma du trichome capité……...41

Figure III.4 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la forme des trichomes peltés…….42

Figure III.5 : Schéma des trichomes peltés…….42

Figure III.6 : Profil de temps total d'extraction en fonction du débit utilisé en HD …….43

Figure III.7 : Profil du temps total de l'extraction en fonction de la puissance des micro-ondes……44

Figure III.8 : Profil de temps de sonication en fonction du rendement d'extraction.…….45

Figure III.9 : Cinétique de l'extraction de l'HE des feuilles de romarin par HD(a), HD-MO(b) et HD-US(c)…….48

FigureIII.10 : Chromatogramme d'huile essentielle de romarin par HD……49

Figure III.11 : Chromatogramme d'huile essentielle de romarin par HD-US…….52

Figure III.12 : Chromatogramme d'huile essentielle de romarin par HD-MO……...…54

Figure III.13 : Teneur des principaux composes majoritaires selon les trois procèdes étudies (HD, HD-US et HD-MO)…….58

Figure III.14: Teneur des principaux composes oxygénés selon les trois procèdes étudies (HD, HD-US et HD-MO)…….58

Figure III.15 : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de romarin……..…63

Figure III.16 : Zone d'inhibition de la croissance microbienne(HD)……..……..65

Figure III.17 : Zone d'inhibition de la croissance microbienne (HD-US)……...…..65

Figure III.18 : Zone d'inhibition de la croissance microbienne (HD-MO)……..…..65

Figure III.19 : variation des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations d'HE de *Rosmarinus officinalis* L. et de BHT (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais). ……..…..67

Liste des Tableaux

Tableau I.1 : Les principales classes des composés phénoliques……...11
Tableau I.2 : Dose létale de quelques HEs……..23

Tableau II.1 : Les conditions opératoires employées dans l'analyse de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG/SM)…….34
Tableau III.1 : rendement en huile essentielle des feuilles de romarin selon trois (3) méthodes d'extraction……...…46

Tableau III.2 : Composition des huiles essentielles de Romarin obtenues respectivement par HD……...……..50

Tableau III.3 : Composition des huiles essentielles de Romarin obtenues respectivement par HD-US……..53

Tableau III.4 : Composition des huiles essentielles de Romarin obtenues respectivement par HD-MO…….……55

Tableau III.5 : Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de romarin extraite par HD, HD-MO et HD-US……..……..60

Tableau III.6: Evaluation sensorielle des huiles essentielles de romarin extraites par HD, HD-MO et HD-US……..……..61

Tableau III.7 : Diamètre des zones d'inhibition en mm des micro-organismes testés……..62

SOMMAIRE

Introduction générale……1

Chapitre I : Partie bibliographique

I.1. Introduction ……..……...…3

I.2. Généralités sur les huiles essentielles (HEs)…….…..3

I.2.1.Historique……..…….……3

I.2.2.Définitions des HEs……..……..…4

I.2.**3.Les critères de qualité des** HEs……..……5

I.2.4.Localisation des HEs dans les plantes……...…….6

I.2.5.Synthèse et formation des HEs au niveau des plantes…….……..…6

I.2.6.Propriétés physiques des HEs……..…….…..….7

I.2.7.Rôle physiologique des HEs…….…...……7

I.2.8. Composition chimique des HEs……...……7

I.2.9. Notion de chémotype ……..……..……..12

I.2.10.Facteurs influençant la composition chimique …….……..……12

I.3. Méthodes de l'extraction des HEs…….……..……...13

I.3.1. Méthode de préparation des formes d'HEs…….…….....13

I.3.2. Méthodes de l'extraction classiques des HEs……..……...…..13

I.3.3. Méthodes de l'Extraction alternatives et Nécessité de la «Chimie Verte»……...15

I.4. Méthodes d'analyse des HEs……..19

I.4.1. La chromatographie en phase gazeuse ……...…..…..……19

I.4.2. Indice de rétention ……..…….…..20

I.5.Activités biologiques des huiles essentielles……...…….....21

I .5.1.Activité antioxydante …….……...…21

I.5.2.Activité antimicrobienne……..…….……..…..21

I .6.Toxicité des huiles essentielles…….……...…..…23

I.7.Description botanique de la matière végétale étudiée……..…..23

I.7.1.Famille des Lamiacées ……...……..23

I.7.2.Genre *Rosmarinus* …….…..…..24

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Introduction……27

II.2. Matériel végétal ……..28

II.3.Localisation des sites sécréteurs des HEs…….28

II.4.Méthodes d'extraction de l'huileessentielle……..29

II.4.1.Hydrodistillation……..…….……...…29

II.4.2.Hydrodistillation assistée par micro-ondes …….……30

II.4.3.Hydrodistillation assistée par ultrason …….…..…….…31

II.4.4.Calcul du rendement en HE …….…....32

II.5.Etude de la cinétique de l'extraction de l'HE……...……..…32

II.6.Caractéristiques des HEs ……...…….…..…32

II.6.1.Caractéristiques organoleptiques……..……....….33

II.6.2.Indices physico-chimiques…….……33

II.6.3.détermination de la composition chimique des huiles essentielles par CG/SM…….……33

II.7.Evaluation des activités biologiques de l'HE de *Rosmarinus officinalis*L…….35

II.7.1.Evaluation de l'activité antioxydante …….……...35

II.7.2.Evaluation de l'activité antbactérienne ……..……..…....……36

Chapitre III. Résultats et discutions

III.1.Objectif du chapitre …… ;……...…….….39

III.2. Illustrationdessitessécréteursdeshuilesessentielles ;;……39

III.3.Extraction de l'huile essentielle de romarin par différentes méthodes……...……..……...43

III.3.1. Extraction par hydrodistillation……...43

III.3.2. Extraction par hydrodistillation assisté par micro-onde…….....……44

III.3.3. Extraction par hydrodistillation assisté par ultrason……..…...…….....…..44

III.3.4. Rendement d'extraction…….….45

III.4. Cinétique d'extraction…….……47

III.5. Composition de l'huile essentielle de feuilles de romarin par CG/SM…….…..….49

III.6. Caractéristiques des HEs…….…..…….…..60

III.6.1. Constantes physico-chimique……..…….....…60

III.6.2.Caractéristiques organoleptiques…….……60

III.7 Activité antibactérienne……..…….…..62

III.8 Activité antioxydante…….…...66

Conclusion générale……..…….…….69

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale

Introduction générale

Ces dernières années, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine thérapeutique. En effet, les substances naturelles extraites de ces plantes ont permis de grandes avancées en raison de leur valeur ajoutée dans la préparation de nombreux produits en particulier dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et les parfums.

Il existe plusieurs procédés de l'extraction des produits à haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces procédés peuvent être conventionnels (utilisés depuis longtemps) ou alternatifs dits aussi propres (développées récemment).

L'extraction par la méthode de Clevenger, inventée en 1928 (Clevenger, 1928), est la procédure de distillation de référence. Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans de l'eau qui et portée à ébullition. Bien que très efficace et largement acceptée par la communauté scientifique, la distillation par Clevenger présente plusieurs inconvénients. Les plus significatifs sont les longues durées de l'extraction, les grands volumes d'eau énergies consommés.

Dans le but d'améliorer les techniques d'extraction conventionnelles, différents procédés d'extraction assistés ont été développés :l'hydrodistillarion assistée par micro-ondes et l'hydrodistillarion assistée par ultrasons.

C'est à ce dernier aspect que nous nous sommes intéressées dans ce travail et ce, en proposant de comparer les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. obtenues par l'hydrodistillation conventionnelle et celles obtenues par hydrodistillation assistées par micro-ondes et ultrasons.

Notre choix s'est porté sur le *Rosmarinus officinalis* L, qui est une plante qui pousse spontanément dans toute l'Algérie et elle est très utilisée dans les traitements traditionnels

Pour la réalisation de cette étude, nous l'avons structuré en trois chapitres ;

- Le premier chapitre est consacré aux considérations théoriques, il englobe des généralités sur les huiles essentielles, les procédés conventionnels et innovants pour leur extraction et les méthodes de leur caractérisation. Nous allons donner, également dans ce chapitre une description de la matière végétale utilisée qui est le *Rosmarinus officinalis* L.

- Dans le chapitre II, nous allons illustrer les matériels et méthodes utilisés pour la réalisation de cette étude qui consistent en l'extraction, la caractérisation et la valorisation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L obtenues.

- Le troisième chapitre décrira les résultats et les discussions des expériences réalisées.

Nous terminerons par une conclusion qui relate de l'ensemble de nos résultats.

Partie Bibliographique

Chapitre I. Partie bibliographique

I.1. Introduction

L'immensité de territoire algérien (2 381 741 Km^2) et la spécifité de clima de chaque régiant favorisent la diversité des ressources végétales.

De nembreuses plantes aromatiques à vertus thérapeutiques s'y développent spentanément, comme :*E.globulus,E.radiata* et *L.nobilis,* d'autre sont cultivées par la population citons :*R.officinalis, O.basilicum.*

Le premier chapitre est sous forme d'une synthèse bibliographyque présentée par :

- Des généralités sur les HEs.
- Des méthodes d'extraction et d'analyse des HEs.
- L'activité biologique des HEs.
- description botanique de la matière végétale étudiée(Romarin).

I.2. Généralités sur les huiles essentielles (HEs)

I.2.1.Historique

De tout temps, le règne végétal a offert à l'homme des ressources naturelles à son alimentation, à son hygiène et à sa santé. Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ses même sont associes a des rites mystiques, artistiques et esthétiques.
Déjà, en Chine, l'empereur Chen Nong (2800 av J-C), médecinérudit, consigne son savoir relatif aux plantes médicinales dans un livre, Le *PEN TS'AO*, qui renferme plus de 1000 plantes médicinales utiles [**1].**

Il semblerait que se sont les Egyptiens, dont l'histoire remonte à plus de 4000 ans qui furent les premiers à tirer partie du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel.L'essence de térébenthine était déjà utilisée et tout porte à penser que certains parfums étaient déjà obtenus sous forme d'huile distillée.

Plus tard, la civilisation dont Bagdad, Bassora et Damas étaient les principaux centres commerciaux, développa le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'art des distillations.

C’est Gerber (721-815) qui mentionna le premier, de façon écrite la description de la distillation.L’alambic est incontestablement associée à Avicenne (930-1037), tout comme le Jiovannil-BaptistaDellaPorta (1540-1615), dans son célèbre ouvrage « De distillation »paru en 1567, mentionne les connaissances avancées des arabes dans le domaine de la distillation.

Hermane Boerhave(1668-1738) fut l’un des premier à décrire les HEs d’un point de vu chimique **[2].**

L’aromathérapie tomba ensuite dans l’oubli, toutefois il a fallu attendre le XX^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s’y intéresser.En 1928 René-Maurice Gatte Focé,chimiste français, publia un ouvrage « Aromathérapie »décrivant la relation entre la structure biochimique de l’HE et son activité antimicrobienne. En 1929, Seveling un pharmacien en France, étudia les HEs en médecine vétérinaire et confirma le potentiel antimicrobien élevé de ses substances aromatiques **[3].**

Il existe aujourd’hui approximativement 3000 HEs dont 300 sont commercialisées, destinées principalement à l’industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle a entrainé un regain d’intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement des nouvelles applications des propriétés naturelles des HEs dans différents domaines **[4].**

I.2.2.Définitions des HEs

Les essences ou HEs, connues également sous le nom d’huiles volatiles, de parfums, etc., sont des substances odorantes huileuses, volatiles, peu solubles dans l’eau, plus ou moins solubles dans l’alcool et dans l’éther, incolores ou jaunâtres, inflammables qui s’altèrent facilement à l’air en se résinifiant. Elles sont liquides à température ordinaire ; quelques-unes sont solides ou en partie cristallisées ; elles n’ont pas le touché gras et onctueux des huiles fixes dont elles se distinguent par leur volatilité. Leur odeur plus ou moins forte, piquante ou désagréable. Elles ont la propriété de ne pas laisser de tache durable sur le papier **[5].**

Aucune des définitions des HEs n’a le mérite d’être claire, ni précise. Les HEs sont des mélanges de divers produits issus d’une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d’eau lors d’une distillation effectuée dans un courant de vapeur d’eau.

Cette définition peut être étendue aux HEs obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de Citrus, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères.

La nouvelle Encyclopédie **[6]** décrit les huiles essentielles comme les «liquides volatils, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact de la peau ».

L'Association Française de Normalisation **[7]**, a défini les huiles essentielles comme étant : des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Le terme « huile » donc, s'explique par la propriété de la solubilité dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum (essence), à l'odeur dégagée par la plante.

I.2.3.Les critères de qualité des HEs

Des critères de qualité stricts doivent guider l'achat d'une HE utilisée pour la santé **[8]:**

- La certification botanique : l'appellation de la plante doit préciser le genre, l'espèce, la sous-espèce, le cultivar afin d'éliminer le risque d'erreur issu des noms vernaculaires locaux.

- L'origine géographique : le nom du pays ou d'une région apporte des précisions intéressantes sur le biotope (facteurs environnementaux) de la plante aromatique et déterminera une composition biochimique particulière.

- Le mode de récolte ou de culture : cette précision donne l'indication sur la plante, sauvage ou cultivée ou issue d'une culture biologique (avec label bio affiché) ou non.

- Le stade de développement botanique : les caractéristiques de la composition biochimique de l'HE dépendent, parfois, du stade de développement végétal : moment de la cueillette avant, pendant ou après la floraison.

- L'organe distillé : la composition biochimique des HEs varie en fonction de la partie ou de l'organe de la plante distillée. L'écorce de cannelle de Ceylan ne contient pas la même essence que les feuilles du même arbre.

- Le mode d’extraction : le mode d’extraction ; expression à froid, hydrodistillation, distillation par entraînement à la vapeur d’eau influence la composition des HEs

- Le chémotype : l’analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, apportera des précisions fondamentales quant aux molécules particulières et spécifiques rencontrées dans les HEs**.**

I.2.4.Localisation des HEs dans les plantes

Les HEs sont localisées dans différents organes de la plante. Elles sont présentes soit, dans les organes végétatifs ; soit dans les organes reproducteurs. Nous les trouvons dans les feuilles et les fleurs, mais également dans les graines (semences), les racines, les fruits, les écorces, les tiges, le bois, etc. elles sont concentrées dans certains cellules ou groupes spéciaux de cellules appelées (glandes).

Les HEs sont des produits naturels des plantes qui s'accumulent en structures spécialisées telles que des cellules d'huile, des trichomes glandulaires, et des conduits d'huile ou de résine **[8]**.

I.2.5.Synthèse et formation des HEs au niveau des plantes

Les essences végétales sont d'une part des produits aromatiques de la plante, d'autre part des substances élaborées par des cellules sécrétrices localisées dans les différentes parties de la plante **[9].** Sous l'influence du rayonnement solaire, les plantes synthétisent au sein des cellules très spécifiques des composés aromatiques, véritables concentrés d'énergie : les HEs **[10].**Ces substances se forment de trois façons :

- **Formation dite "en surface glandulaire épidermique"**

Les essences se présentent à la périphérie de la plante dans des glandes spécialisées : ce sont des poils sécréteurs fabriquant les essences ou poils "tecteurs" servant au tact de la plante (ils la mettent en relation avec son environnement, ils ont un rôle de protection vis à vis des insectes et du climat). Ces essences sont stockées dans des poches à essence comme chez la Lavande vraie, le Romarin, la Sauge officinale, la Verveine citronnée.

- **Formation dite"Schizogène"**

Elle se fait dans l'épaisseur de la plante : au niveau de la feuille. On la retrouve notamment dans chez le Géranium, L'Eucalyptus.

- **Formation dite "par canaux" ou "Schizolysigène"**

Elle se produit en profondeur de la plante: Elle est l'essence dominante que l'on trouve dans le bois des arbres, comme, chez le Bois de Rose, le Pin, le Santal **[7].**

I.2.6.Propriétés physiques des HEs

Les HEs sont, en général liquides à température ambiante, volatiles, d'odeurs très forte, incolores, jaunes pales ou quelques fois bleues. Leur indice de réfraction est souvent élevé, elles sont douées d'un pouvoir rotatoire. Leur densité est inférieure à 1 sauf pour les HEs de clou de girofle, la cannelle et sassafras. **[11]**.

I.2.7.Rôle physiologique des HEs

Beaucoup de plantes produisent les HEs en tant que métabolites secondaires. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu**.** Les HEs peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante :

- Repousser ou attirer les insectes pour favoriser la pollinisation,
- Source énergétique, facilitant certain réactions chimiques
- Permettre de conserver l'humidité des plantes désertiques

-Réduire la compétition des autres espèces de plantes par inhibition chimique de la germination des graines

- Protéger la plante contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par gout et effets défavorables **[12]**.

I.2.8. Composition chimique des HEs

Les HEs sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent à deux séries distinctes : la série terpénique et la série des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (beaucoup moins fréquents).

a) Les terpènes

Ils forment un groupe de produits naturels largement représentés et d'un intérêt chimique considérable. Bien qu'ils sont de structures très diverses, les terpènes ont un caractère commun : ils sont tous formés par la réunion d'unités isopréniques (unités pentacarbonées ramifiées). De ce fait, une classification rationnelle, basée sur le nombre d'unités isopréniquesqu'ils renferment, est possible. Ainsi on distingue les hémiterpènes (C_5), les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les caroténoïdes (C_{40}) et les polyisoprènes (C_n). En général, seuls les terpènes de poids moléculaire faible, de 10 à 20 atomes de carbones, sont présents dans les HEs**[12]**.

- .**Monoterpènes et sesquiterpènes**

Les monoterpènes sont volatils entrainables à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des HEs, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique (terpinène, p-cymène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre des substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthol), aldéhydes (géranial, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone, β- vétinone), et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle,acétate de cédryle, acétate α- terpinyle)**(Figure I.1) .**

Les sesquiterpènes représentent la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par Exe: β-caryophyllène, β-bisabolène, iongifolène**(Figure :I.2)**

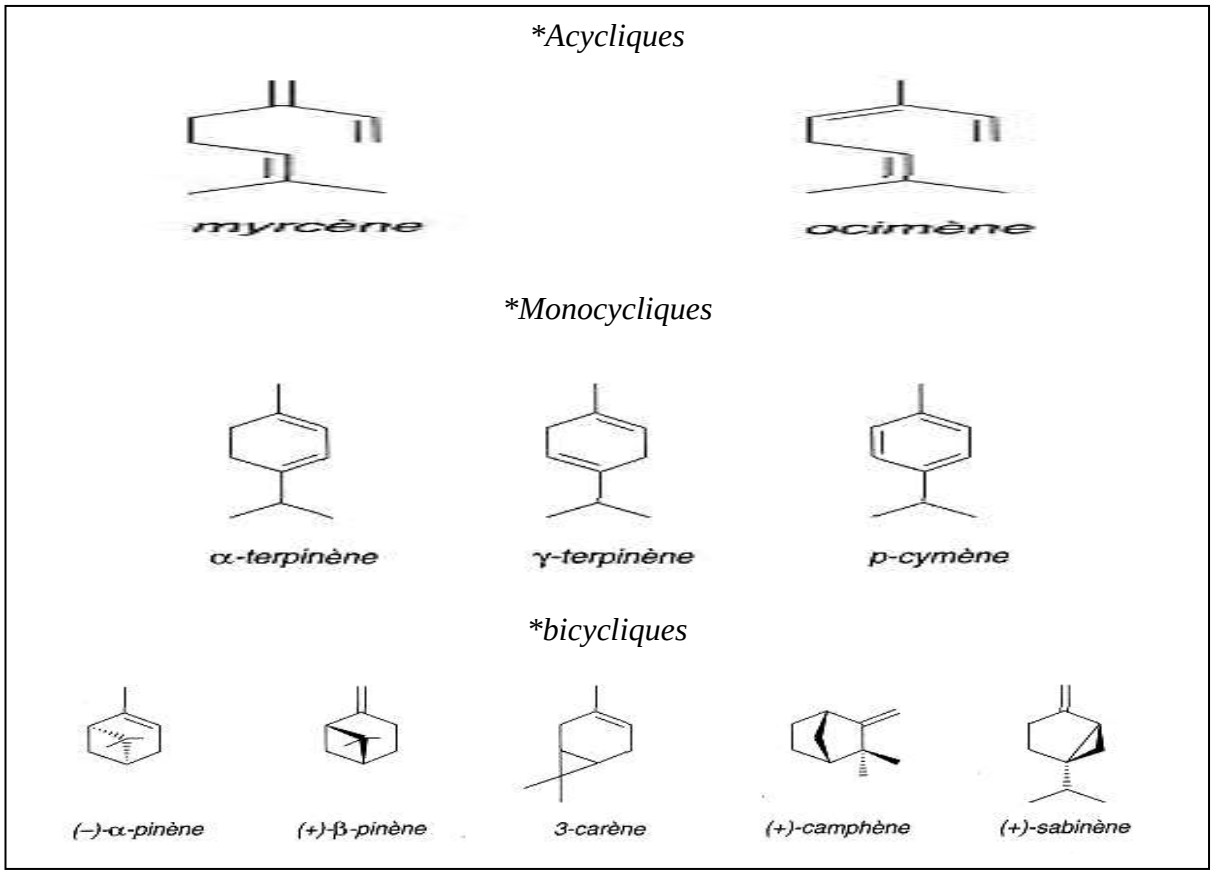
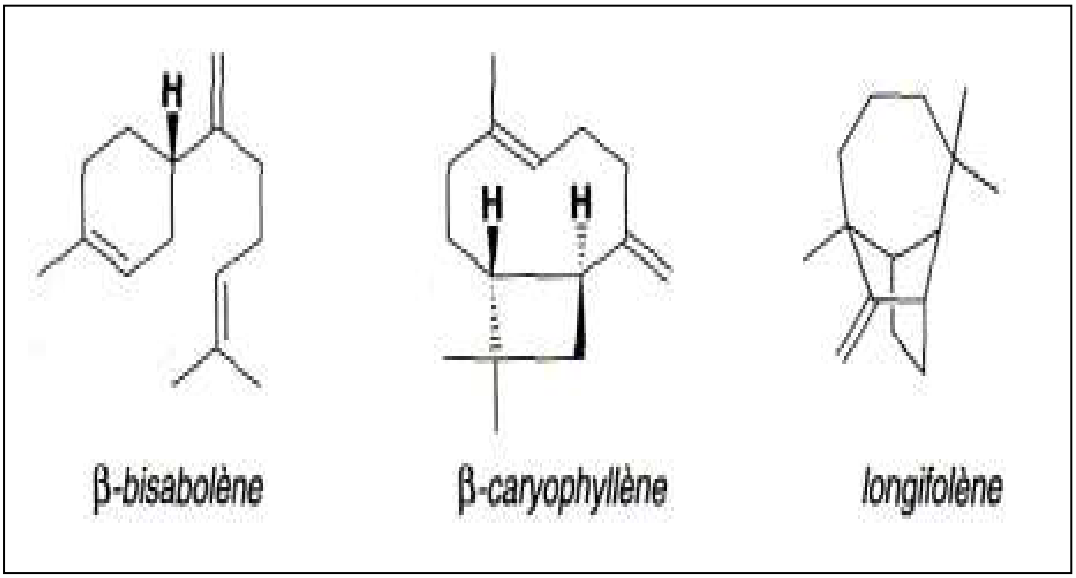


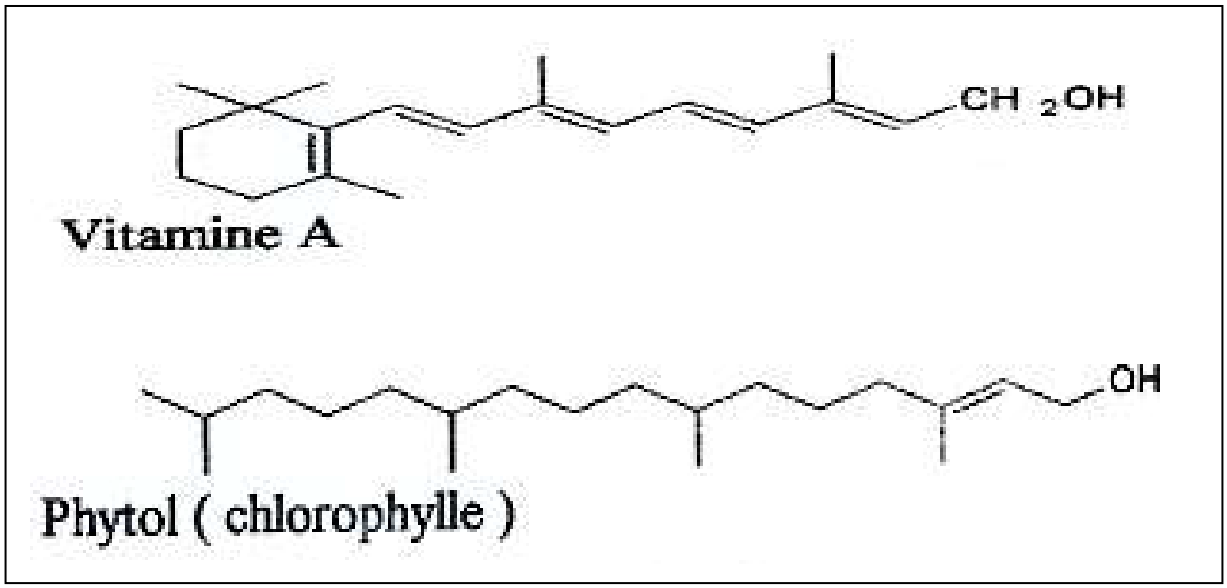
Figure I.1 : Structures chimiques de quelques exemples de monoterpènes.



FigureI.2 : Structures chimiques de quelques exemples de sesquiterpènes.

- **Diterpènes**

Beaucoup d'espèces de la famille des composées contiennent des diterpènes telles que l'acide grindélique et ses dérivés qui sont isolés de la résine de Grindélia;stévioside (hétéroside à géninediterpénique) de l'espèce Steviarebaudiana; deux acides carboxyliques ditepéniques, ent- kaurane et ent- trichylobane sont isolés de la plante *Helianthussalicifolium***,** acide stritigite,acidepulique et acide 15- deoxypulique de *Pulicariaglutinosa*.



FigureI.3 : Exemples des diterpènes

On note aussi la présence d'alcaloïdes dans certaines espèces**,** des azulènes, des composés acétyléniques**,** des coumarines**,** des lignanes**,** des stéroïdes**,** des acides phénols, des hydrocarbures insaturés et des hétérosides **[13].**

b) Les composés phénoliques (aromatiques)

De manière moins systématique que les terpénoïdes, une autre famille chimique est fréquemment rencontrée parmi les composés volatils. Il s'agit des dérivés du phénylpropane. Ils sont très souvent des allyle- et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines HEs d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, etc.:anéthole, anisaldéhyde, apiole, méthylchavicol...) mais aussi de celles de girofle, de la muscade, des cannelles, etc. (eugénol, myristicine, asarones, cinnamaldéhydes, ...).

Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont commodément classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base. Les différentes classes principales de ces composés phénoliques isolés des plantes sont illustrées dans **le tableau I.1 [14]** :

Tableau I.1 : Les principales classes des composés phénoliques.

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemple
6	C6	Phénols simples	Catéchol
7	C6-C1	Acides phénoliques	Acide salicylique
8	C6-C2	Acétophénones	3-Acetyl-6-méthoxybenzaldéhyde
9	C6-C3	-Acide hydroxycinnamique -Phénylpropéne -Coumarines -Isocoumarines -Chromones	Acide caféique -Eugénol -Ombélliférone -6-7-diméthoxy 8-hydroy-3-methyl isocoumarine -Eugénine
10	C6-C4	Naphtoquinones	Juglone
13	C6-C1-C6	Xanthones	1, 2, 3,7-tetramethoxy Xonthone
14	C6-C2-C6	Stilbénes -Anthraquinones	-Acide hunularique -Emodine
15	C6-C3-C6	-Flavonoides -Isoflavonoides	Quercetine Genisteine
18	(C6-C3)2	Lignanes	Podophyllotoxyne

30	(C6-C3-C6)2	Biflavonoïdes	Kayaflavone
N	(C6-C3) n	-Lignines	-
	(C6) n	-Catéchol mélanines	-
	(C6-C3-C6) n	-Flavolanes (Tannins Condensés	-

c) Les composées d'origine diverses

De faibles quantités de composés acycliques non terpéniques et de poids moléculaires peu élevés peuvent se retrouver dans certaines HEs (alcools, aldéhydes, cétones, etc)

La série de ces composants peut être regroupée en six classes selon leur structure chimique:

a) Les hydrocarbures, tel que le limonène dans l'huile de citron;

b) Les alcools, tel que le bornéol dans le camphrier de Bornéo;

c) Les esters, tel que le salicylate de méthylique dans l'huile de wintergreen;

d) Les aldéhydes, tel que l'aldéhyde benzoïque dans l'huile d'amandes amères;

e) Les cétones, telle que la menthone dans l'huile de menthe poivrée;

f) Les lactones et oxydes, telle que la coumarine des haricots de Tonka

Parmi les essences naturelles, on peut distinguer des essences qu'on pourrait qualifier de simples (riches en un composé prépondérant ou majoritaire), de complexes (ne possédant aucun composé prépondérant) et tous les cas intermédiaires sont possibles. L'un des exemples typiques d'une essence simple est celui de l'essence de girofle qui contient au moins 80 % d'eugénol et de petites quantités d'autres produits. Le cas extrême de complexité peut être illustré par l'essence de vétiver qui contient une centaine de composants dont les vétivones (alpha et bêta) et le khusimol**[15].**

I.2.9. Notion de chémotype

Une espèce végétale parfaitement définie botaniquement peut donner des essences dont la composition chimique est différente suivant les individus, L'un des exemples caractéristiques est celui du pin sylvestre d'Auvergne (*Pinussylvestris*L.), pour qui il existe deux chémotypes de types A et B. Chez le type A, le cation terpinyle est majoritairement cyclisé en pinènes, le type B cyclise d'une façon prépondérante le même cation en 3-carène et en terpinolène.

Pour certains auteurs, les chémotypes constituent, à l'intérieur de l'espèce, des variétés chimiques possédant chacune un équipement enzymatique particulier, déterminé génétiquement et qui oriente la biosynthèse vers la formation préférentielle d'un constituant précis **[15].**

I.2.10.Facteurs influençant la composition chimique

Il existe beaucoup de facteurs externes qui pouvant influencer la composition chimique de l'HE comme la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction et d'autres, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en HE, par exemple : les Citrus ont une teneur importante en HE lorsque la température est élevée **[15].**

I.3. Méthodes de l'extraction des HEs

Plusieurs techniques et procèdes d'extraction ont été employés depuis longtemps et autres ont été développées pour extraire les HEs

I.3.1. Méthode de préparation des formes d'HEs

Dans l'utilisation des HEs dans la vie courante, trois méthodes sont utilisées pour les extraire de la plante :

a) Infusion

C'est la forme de préparation la plus simple, elle se prépare en versant de l'eau bouillante sur les parties des plantes fraîches ou séchées et les bien tremper afin d'extraire leurs principes médicinales. Elle convient pour l'extraction des parties délicates ou finement hachées des plantes : feuilles, fleurs, graines, écorces et racines, ayant des constituants volatiles ou thermolabiles comme les HEs **[16]**.

b) Décoction

Elle convient pour l'extraction des matières végétales dures ou très dures : bois, écorce, racines, ou des plantes avec des constituants peu solubles (ex : l'acide silicique). Elle consiste à faire bouillir les plantes fraîches ou séchées dans de l'eau pendant 10 à 30 minutes, pour bien extraire les principes médicinales **[17].**

c) Macération

Elle consiste à mettre une plante ou partie de plante, dans de l'eau froide (macération aqueuse) ou dans une huile végétale (macération huileuse), pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, pour permettre aux constituants actifs de bien diffuser. Elle convient pour l'extraction des plantes contenant du mucilage, comme les graines de lin ou les graines du plantain dessabler, leur forte concentration en amidon ou pectine peut causer une

gélatinisation s'ils se préparent dans de l'eau bouillante. Elle est également, utilisée pour empêcher l'extraction des constituants indésirables qui se dissolvent dans l'eau chaude **[17]**. Elle concerne aussi les plantes dont les substances actives risquent de disparaître ou de se dégrader sous l'effet de la chaleur **[16]**.

I.3.2. Méthodes de l'extraction classiques des HEs

Différentes méthodes de l'extraction des HEs sont mises en œuvre. Elles dépendent de la matière végétale à traiter, de sa richesse en essence, de sa fragilité aux températures élevées et à l'action de l'eau. Les essences végétales sont présentes dans les plantes en faible quantité d'où la nécessité de développer des techniques d'extraction de plus en plus performantes.

Différentes techniques ont été développées nous citons ; La distillation (entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation) et l'expression à froid.

a) Hydrodistillation

Elle est réalisée dans un appareil dit de Clevenger et elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (entier, coupé ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide. En effet, les vapeurs ascendantes provenant de l'alambic ou du réacteur progressent dans la partie A puis se condensent dans la partie B. Le condensat est récupéré dans la partie C où l'huile se sépare de la phase aqueuse. L'eau en excès retourne dans l'alambic par la partie D **[18] (figure. I.4).**

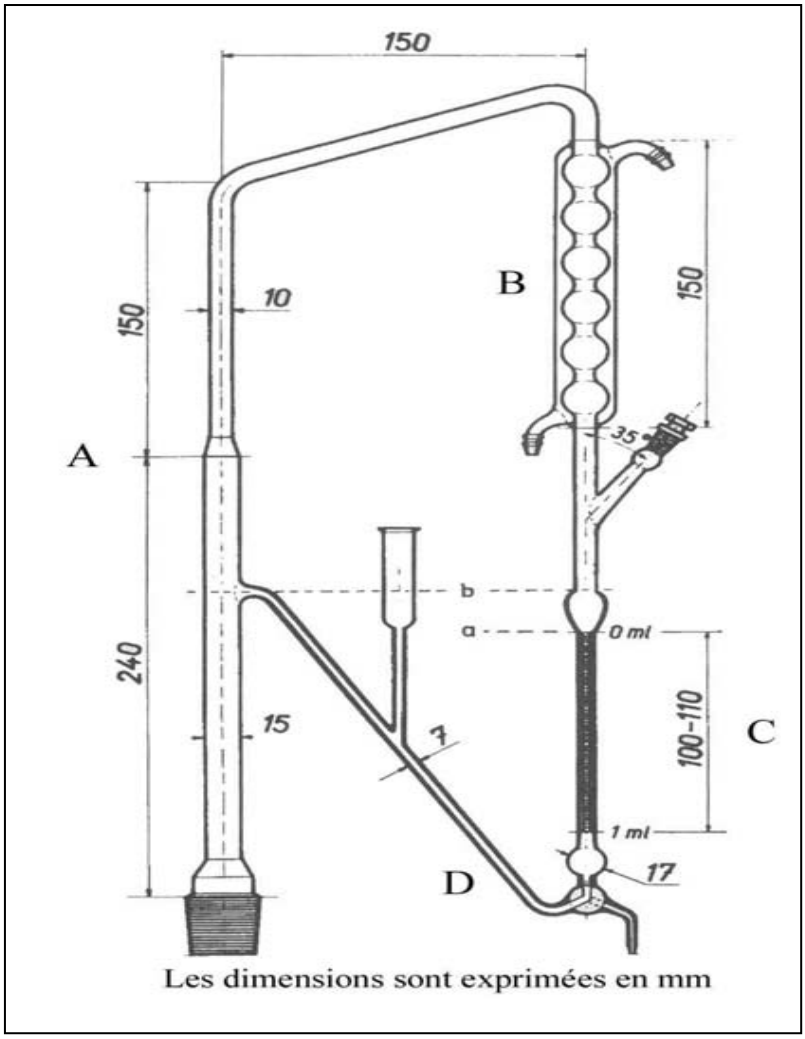


Figure I.4 : Appareil pour l'extraction des huiles essentielles dans les drogues Végétales (Pharmacopée Européenne « 5ème édition »).

b) Entraînement à la vapeur d'eau

Les parties de plantes utilisées sont déposées sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic, sans que le matériel végétal ne soit pas en contact avec l'eau **[19].** Les particules de vapeur d'eau, se dirigeant vers le haut, font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite à travers un récipient réfrigérant où la température diminue, provoquant le déclanchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condense en eau. L'huile et l'eau se séparent du fait de leurs poids spécifiques différents **[20].** Pendant l'entrainement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, et dans ces conditions, la fragilité thermique des constituants de l'huile. ou l'hydrolyse de certains d'entre eux conduit à la formation d'artéfacts **[2].**

I.3.3. Méthodes de l'Extraction alternatives et Nécessité de la «Chimie Verte»

L'idée de « Chimie verte » ou « Chimie durable » est fondée vers les années 90, ce concept est introduit en 1998 par les chimistes Américains Paul Anastas et John C. Warner pour être appliqué d'abord dans l'industrie chimique, dans le but de mettre en œuvre des principes réduisant l'usage ou la génération des substances néfastes pour l'environnement, par l'application de nouveaux procédés chimiques et des voies de synthèses propres, c'est-à-dire respectueuses de l'environnement **(Figure I.5)[21].**

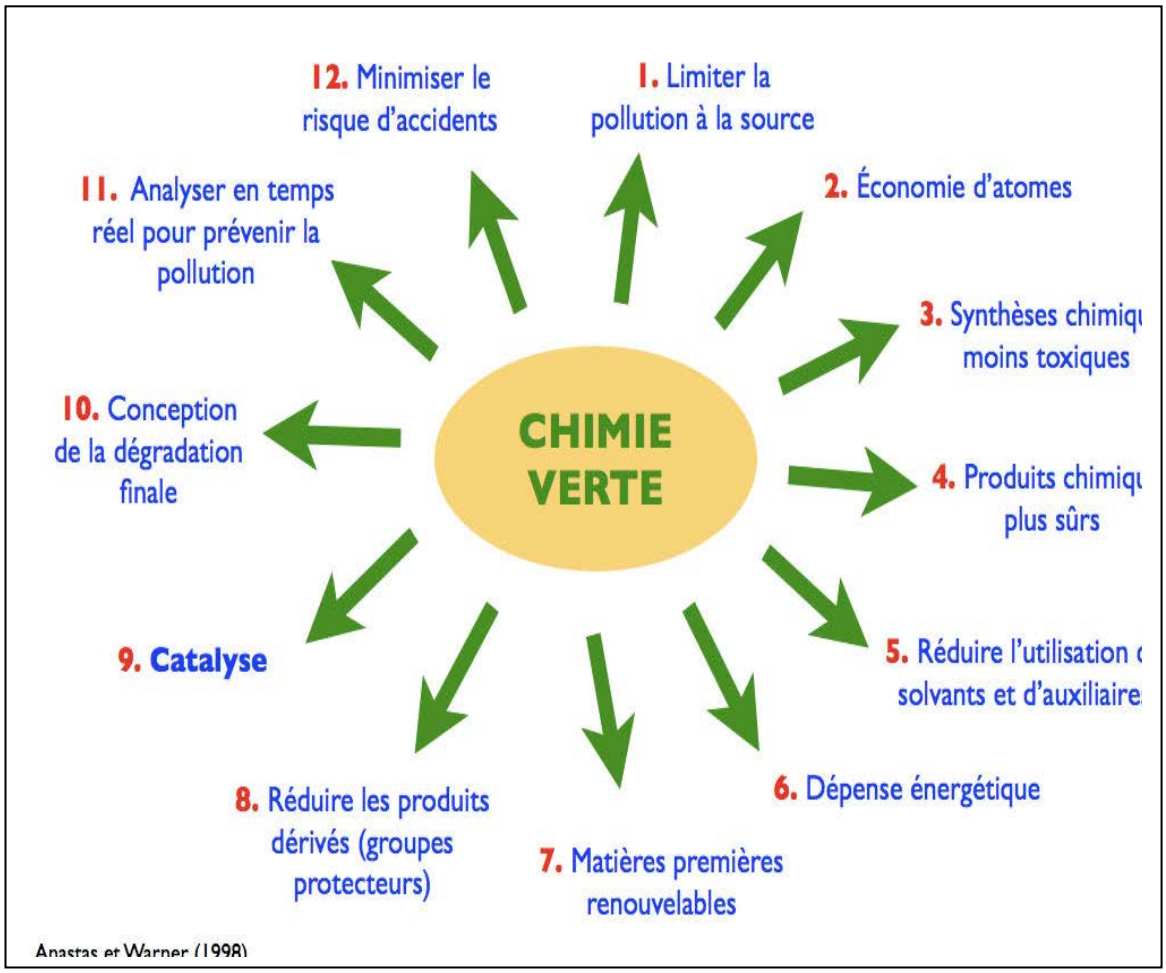


Figure I.5: Les douze principes de la chimie verte **[19].**

Parmi les techniques non conventionnelles proposées par la chimie verte et qui sont très utilisées on cite, l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction assistée par ultrasons.

a) Extraction Assistée par Micro-ondes

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques de longueur d'onde intermédiaire entre l'infrarouge et les ondes de radiodiffusion entre 300 GHz à 300 MHz.

Cependant, quelques fréquences seulement sont utilisées pour des usages industriels, scientifiques et médicaux (ISM), elles sont comprises entre 0.915 à 2.45 GHz, à ces dernières fréquences, la matière réagit avec le champ électromagnétique principalement via le phénomène de rotation des dipôles et de polarisation induite **[21].**

L'usage de l'énergie micro-ondes dans les laboratoires de chimie a été décrit pour la première fois en 1986 en synthèse organique pour l'extraction des matrices biologique en vue d'analyse d'échantillons **[22].** Depuis, l'usage de cette technique pour l'extraction a augmenté en la considérant comme procédé «vert» qui permet l'économie de l'énergie, de temps, de solvants et la production de moins de déchets.

C'est un chauffage sélectif utilisant les radiations micro-ondes qui interagissent avec les dipôles des molécules polaires ou polarisables. Les molécules polaires tentent de s'orienter (rotation) dans la direction du champ d'où leur chauffage.

L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique qui est ensuite transformée partiellement en chaleur par cette rotation dipolaire.

L'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules (liaisons hydrogène et Van der Waals) qui peuvent être assimilées à des forces de frottement internes. Ces dernières s'opposent à la libre rotation des molécules et de la friction produite naît le dégagement de chaleur.

Sous le chauffage micro-ondes, le volume traité devient lui-même source de chaleur, on parle de dégagement de chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient. La paroi externe du réacteur est plus froide que son milieu, et inversement pour le cas du chauffage conventionnel comme l'exemple de la plaque chauffante **(Figure I.6)[22].**

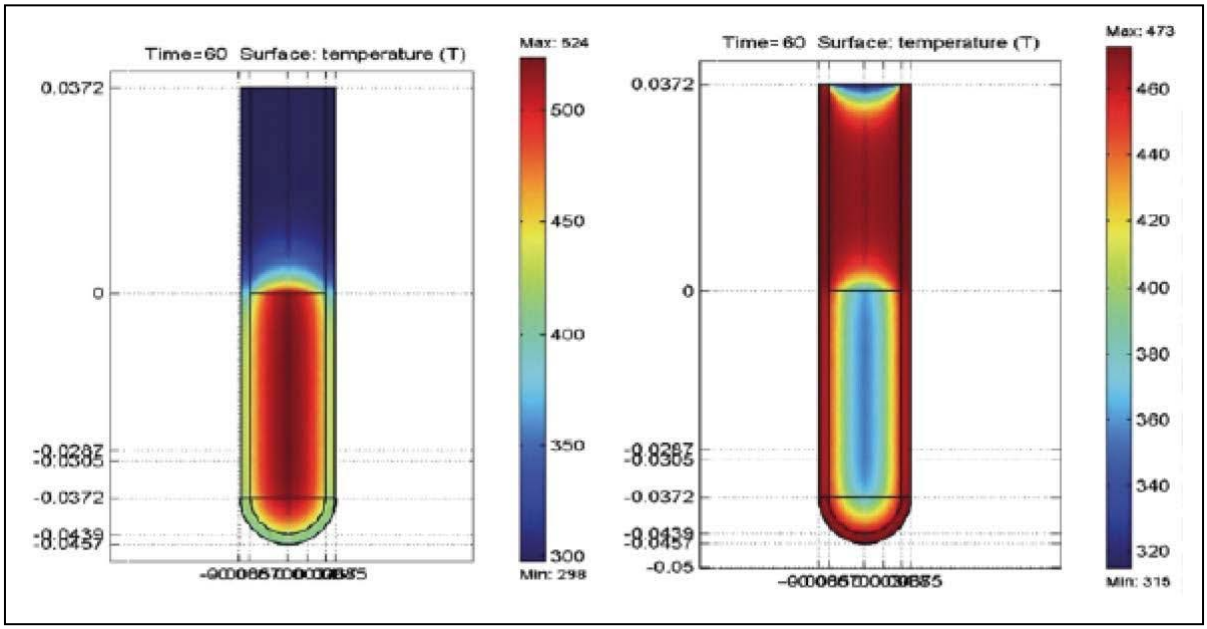


Figure I.6 : Différents types de chauffage, à gauche, un tube contenant des réactifs, chauffés par micro-ondes (tout le contenant est chaud en rouge). A droite, un chauffage traditionnel (le cœur du tube est froid en bleu).

- **Les avantages de cette technique d'extraction [23]**

- Augmentation de la pureté de l'extrait
- Réduction de la dégradation par la chaleur
- Réduction des coûts des procédés
- C'est une extraction significativement rapide
-Utilisation de très faibles énergies
- Utilisation de très faibles quantités de solvant

L'extraction assistée par micro-ondes a été utilisée selon plusieurs procédés (par solvants, entrainement à l'air, hydrodistillation sous pression réduite, sans solvants…) pour extraire une variété de métabolites secondaires **[24,25].**

b) Extraction par Ultrasons ou Sonication

Les ultrasons sont des ondes mécaniques capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz). Les ultrasons de puissance fonctionnant à une intensité entre 20 et 100 kHz sont utilisés pour l'extraction des arômes et bien d'autres molécules des plantes **[26].**

Le bac ou la sonde à ultrasons sont les deux types d'équipements couramment utilisés dans les laboratoires. Lorsque les ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation des zones de compression et de dépression

(raréfaction).Quand les cycles de raréfaction augmentent, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation apparaissent **[27].** Les bulles vont imploser à côté de la surface du solide (le matériel végétal) et provoquent la rupture des membranes des cellules qui libèrent leurs contenus à l'extérieur **[26].**

Puisque les glandes des HEs sont généralement présentes à la surface des plantes aromatiques, l'implosion des bulles de cavitation détruit les glandes qui libèrent l'HE dans le milieu environnant **[28].**

La technologie aux ultrasons prend beaucoup d'ampleur dans le domaine agroalimentaire **[29].**Elle permet de pallier à certains problèmes rencontrés par la distillation conventionnelle telle que la dégradation thermique due aux températures élevées, la grande consommation d'eau, les longues durées de l'extraction et les rendements faibles **(Figure I.7) [30].**

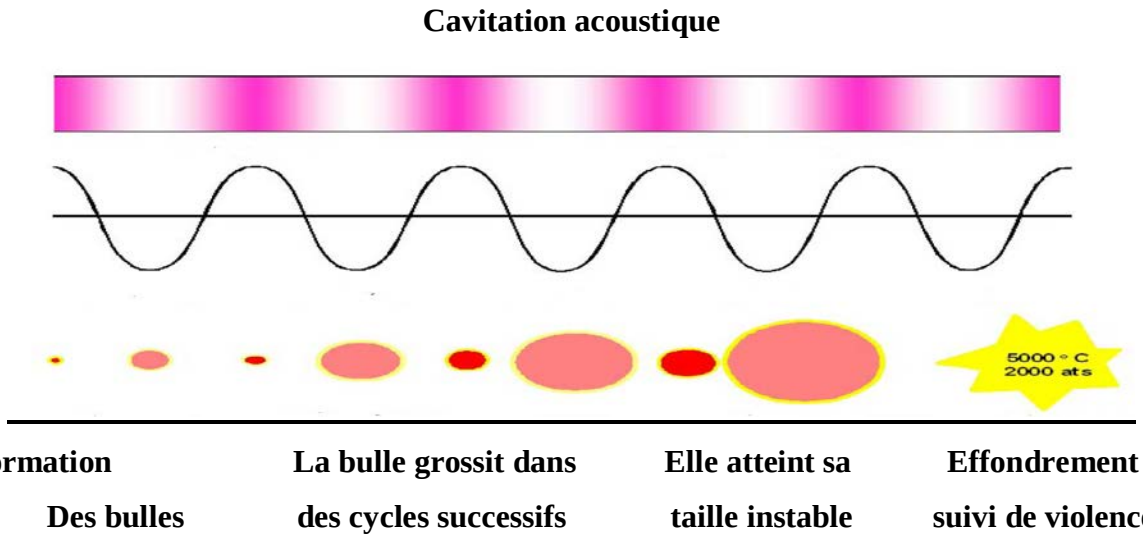


Figure I.7 : Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore.

I.4. Méthodes d'analyse des HEs

Aujourd'hui les méthodes d'identification des molécules présentes dans les HEs sont précises, rapides et fiables, il n'en était pas de même au début du XXème siècle **[31].**

En effet, les seuls moyens connus étaient : l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, la densité, le pH, l'absorption UV/visible que l'on associait aux différentes méthodes de contrôles chimiques tel que l'indice de carbonyle, d'ester, d'acide, d'alcool et de phénol**[32].**

De nos jours, ces contrôles physicochimiques sont encore utilisés. Par contre, les nouvelles techniques de séparation, en particulier la chromatographie en phase gazeuse (CPG), sont les mieux adaptées à l'analyse des constituants volatils dans les extraits aromatiques.

La CPG peut être couplée à des méthodes spectrales, telles que l'infrarouge ou la spectrométrie de masse **[18].**

I.4.1. La chromatographie en phase gazeuse

La CPG est basée sur le principe de la chromatographie de partage. La phase stationnaire étant un liquide non volatil réparti ou greffé sur un support inerte. La phase mobile est constituée d'un gaz inerte (H_2, N_2, He).

La solution est injectée au moyen d'une seringue soit, manuellement, soit avec un injecteur automatique qui permet d'obtenir une meilleure reproductibilité.

La chambre d'injection est maintenue à une température telle que la vaporisation de l'échantillon se fasse dans un temps le plus court possible. La séparation des composés dépend du type de colonne utilisée et de la polarité de la phase stationnaire contenue **[18].**

Après avoir choisi le type de colonne appropriée et un programme de température adéquat, la détection des composés élués est obtenue par un détecteur FID (détecteur à ionisation de flamme). Dans le cas des HEs, le FID est le détecteur le plus cité dans la littérature.

I.4.2. Indice de rétention

L'un des problèmes de la CPG est le manque de reproductibilité des temps de rétention d'un appareil à un autre ou d'une colonne à une autre, même si elles sont de nature identique. Pour résoudre ce problème lié aux phénomènes complexes qui interviennent pendant l'élution (variation des conditions opératoires), Kovats a proposé l'utilisation d'un indice de rétention(IK), en considérant que la montée de température du four est linéaire sur la plage de température étudiée. Van Den Dool et Kratz **[33]** ont utilisé ces indices qui sont indépendants des conditions chromatographiques.

L'indice de rétention est une grandeur caractéristique de chaque composé et du type de la colonne. Deux types de phases stationnaires sont généralement utilisés.

Sur une colonne "apolaire", les composés sont élués approximativement dans l'ordre de leur point d'ébullition. Dans le cas d'une colonne "polaire" les composés les plus "polaires" seront retenus plus facilement et donc auront un indice de rétention plus élevé. Quel que soit le type de colonne, les constituants d'une même famille sont élués dans le même ordre **[32].**

Les IK sont calculés par comparaison entre les temps de rétention (TR) du composé étudié et ceux d'une série d'alcanes linéaires permettant un « étalonnage » du chromatogramme.

Ces IK sont définis par la relation donnée par **l'équation I.1**, suivante :

$$IR = Cn \times 100 + 100 * (TR(A) - TR(Cn)) / (TR(Cn+l) - TR(Cn)) \quad \text{.....(I.1)}$$

IR: indice de rétention

Où**TR (A)** : temps de rétention du composé inconnu A

TR (Cn) : temps de rétention de l'hydrocarbure à n atomes de carbone

TR (Cn+1) : temps de rétention de l'hydrocarbure à n +1 atomes de carbones.

I.5.Activités biologiques des huiles essentielles

I .5.1.Activité antioxydante

Les antioxydants sont des substances capables de protéger l'organisme contre les effets du stress oxydatif **[34].**

On distingue trois types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques, les enzymes de réparation, et les antioxydants non enzymatiques. Les substances naturelles dont les HEs sont classées comme antioxydants non enzymatiques.

L'activité antioxydante peut être primaire ou préventive (indirecte), cette dernière est capable de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène. Par contre les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, empêchant ainsi la destruction des structures biologiques.

Certaines HEs sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques **[35]**. Les effets antioxydants des HEs et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique.

I.5.2.Activité antimicrobienne

a) Activité antibactérienne

L'une des premières mises en évidences in vitro de l'activité antibactérienne des HEs date de la fin du XIXème siècle, lorsque Buchholtz a étudié la croissance des propriétés inhibitrices de l'huile des graines de carvi et de l'huile de thym en 1875. Toutefois, il aurait fallu attendre le début du XXème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser **[36].** Dès lors, plusieurs recherches ont démontré le pouvoir antimicrobien de certaines essences sur une large palette de micro-organismes, y compris sur des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Le mécanisme d'action des HEs sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles **[37].**

La variabilité des constituants des HEs suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action **[38].**

Les caractéristiques des HEs sont attribuées aux dérives terpénoïdes et phénylpropanoïdes dont elles sont constituées. L'activité de ces molécules bioactives dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées **[39]**.

Les terpènes ainsi que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne et induire sa rupture. Le contenu cytoplasmique est déchargé à l'extérieur de la cellule impliquant sa destruction **[40,41]**. Egalement, une perturbation chémo-osmotique et une fuite de potassium intra-cytoplasmique peuvent subvenir, suivi de la libération d'acides nucléiques, de L'ATP, et du phosphate inorganique **[42]**.

D'après **[43]** Masson et Wasserman**,** les composés phénoliques et les aldéhydes possèdent un mécanisme similaire, avec une efficacité inhibitrice proportionnelle à leur degré d'hydrophobicité.

Certains composés phénoliques des HEs interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP **[44]**.

La synthèse de l'ADN, l'ARN, des protéines et des polysaccharides peuvent être inhibés par les HEs **[45]**.

b) Activité antifongique

De plus en plus, les HEs sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme aromes et également comme conservateurs alimentaires. Elles agissent sur un large spectre de moisissures et de levures en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Comme pour l'activité antibactérienne, le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des HEs**.** Plusieurs travaux ont révélé que le pouvoir inhibiteur était essentiellement dû à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire **[46].**

D'autres auteurs ont démontré que la formation d'un complexe entre le donneur d'électrons et l'aldéhyde induit un changement de l'état ionique de la membrane traduisant

par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur. Ce déséquilibre entraîne la mort cellulaire **[47].**

Cependant, les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6- diméthoxyphénol) sont plus antifongiques que les aldéhydes testés (cinnamique et hydro cinnamique) **[48].**

I .6. Toxicité des huiles essentielles

Certains constituants aromatiques des HEs possèdent de multiples vertus, cependant elles peuvent présenter une toxicité à très forte dose (essentiellement les cétones monoterpéniques) Suivant la citation de Pracelse : « Tout est poison, rien n'est poison, seule la dose compte ». Généralement, les HEs ingérées par voie orale ont une toxicité aiguë faible **(Tableau I.2).**

Ainsi l'ingestion massive peut conduire à une neuro-toxicité issue des HEs à thyone (thuya, absinthe, sauge) ou à pinocamphone. Ces cétones peuvent provoquer des crises épileptiformes et titanifères et des troubles sensoriels.

- **Définition de la DL $_{50}$**

La dose létale est la quantité d'une matière, administré une seule à deux fois, qui provoque la mort (dose orale aigue) ou des effets (cutanée aigue) à 50% (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai.

Tableau I.2 : Dose létale de quelques HEs

Plantes	DL $_{50}$
Anis, Eucalyptus, Girofle	2 à 5 g/kg
Camomille, Citronnelle, Lavande, Marjolaine	<5 g/kg
Basilic, Estragon, Hysope	1 à 2 g/kg
Origan	1,5ml/kg
Sassafras	1,9 g/kg
Wintergreen	0,9 à 1,25 g/kg

I.7.Description botanique de la matière végétale étudiée

I.7.1.Famille des Lamiacées

La famille des lamiacées, connue également sous le nom des labiées, comporte environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites; mais dont la plupart se concentrent dans le bassin méditerranéen tel que le thym, la lavande et le Romarin **[49].** Elle est divisée en deux principales sous-familles: les Stachyoideae et les Ocimoideae.

Les lamiacées sont des herbacées ayant la consistance et la couleur de l'herbe, parfois sous-arbrisseaux ou ligneuses **[50]**. Une grande partie de ces plantes sont aromatiques riches en HE d'où leur intérêt économique et médicinal.

Entre autres, un grand nombre de genres de la famille des Lamiaceae sont des sources de terpènoides, flavonoïdes et iridiodesglycosylés.

I.7.2.Genre *Rosmarinus* :

Le genre *Rosmarinus* ne regroupe que trois espèces **[51]**:

- *Rosmarinus officinalis* Linné, de loin l'espèce la plus aromatique et importante.
- *Rosmarinus eriocalix*Jord. &Fourr.
- *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath et Maire, morphologiquement très proche de *R. eriocalyx.*

- ***Rosmarinus officinalis* L :**

Le nom latin *Rosmarinus* est interprété, comme dérivé de "ros" rosée et "marinus" appartenant à la mer autrement rosée marin, ce qui fait référence à la présence du romarin sur les côtes et les îles de la Méditerranée et à diverses légendes liées à cette plante **[52].**

La figure I.8 illustre une photo de cette plante.

a) Position systématique

Règne : Plantae.

Embranchement: Spermaphytes.

S/Emb: Angiospermes.

Classe: Dicotylédones.

S/Classe: Gamopétales.

Ordre: Lamiales.

Famille : Lamiaceae.

Genre*:**Rosmarinus.*

Espèce*:**Rosmarinusofficinalis.*

Période de floraison : Février à Avril.

b) Description botanique du *Rosmarinus officinalis.*L

Le romarin se présente sous forme d'arbustes, de sous arbrisseau ou d'un herbacé, mesurant environ de 0.8 à 2m de hauteur.

La tige est ligneuse et carrée. Les feuilles sessiles et opposées, sont persistantes et vivaces. Elles sont enroulées sur les bords, vertes à la face supérieure, velues et blanchâtres à la face inférieure dont elle est parcourue par une nervure médiane **[53].**

Elles possèdent des poils sécréteurs qui lui confèrent une odeur aromatique spécifique.

Les fleurs bleu lavande à blanche (variétés Albi Florus) sont disposées en courtes grappes à l'aisselle des feuilles, sur la partie supérieure des rameaux **[54]**, la floraison a lieu presque toute l'année. Le calice bilabié, pulvérulent, nu à la gorge, présente un tube campanulé à trois divisions dont la plus large est la lèvre supérieure.

La corolle, plus longue que le calice dont elle s'élargit sur deux lèvres inégales, la lèvre supérieure a deux lobes et la lèvre inférieure à trois lobes qui possède un médian le plus développé et concave **[55].**

L'androcée comporte quatre étamines dont deux sont stériles et réduites à des crochets.

Les deux autres, saillantes, sont insérées sur la gorge par leur filet muni d'une petite dent.

Ces deux étamines sont des anthères allongées uniloculaires et déhiscents par une seule fente.

Le gynécée se compose d'un style se terminant par un stigmate qui se développe souvent après les étamines. L'ovaire a deux carpelles divisés en deux parties.

Le fruit est tétrakéne brun dont chaque partie renferme un seul embryon sans albumen.

Figure I.9 : Aspect morphologique de *Rosmarinus officinalis* L.

c) Répartition géographique

Plante indigène poussant spontanément dans toute l'Algérie **[56],** le *Rosmarinus officinalis* est originaire du bassin méditerranéen **[57].** Commun dans les maquis, les garrigues et les forêts claires, il est sub-spontané en plusieurs endroits privilégiant un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et modérément sec**.**

d) Composition chimique

Il est particulièrement riche en HEs, avec un rendement de 1 à 2.5%.En plus de l'HE, on distingue 2 à 4% de dérivés tritérpéniques tels que ; l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques: picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques : l'acide citrique, glycolique et glycérique , des stérols, de la choline, du mucilage et de la résine **[58].**

Matériel & Méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1. Introduction

Les végétaux peuvent produire deux sortes de métabolites : les métabolites primaires (protéines, polysaccharides….) nécessaires à la croissance et au développement de l'organisme ; et les métabolites secondaires dont les huiles essentielles (HEs).

Les métabolites secondaires sont synthétisés et employés par les végétaux dans des multitudes fonctions adaptatives notamment en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir. Ces substances constituent une source de molécules bioactives, avec des propriétés physico-chimiques diverses et multiples vertus biologiques (antimicrobien, antioxydant, anti-tumorale et anti-inflammatoire…) **[59]**. D'où l'intérêt, d'effectuer des analyses qualitatives et quantitatives des constituants des métabolites secondaires.

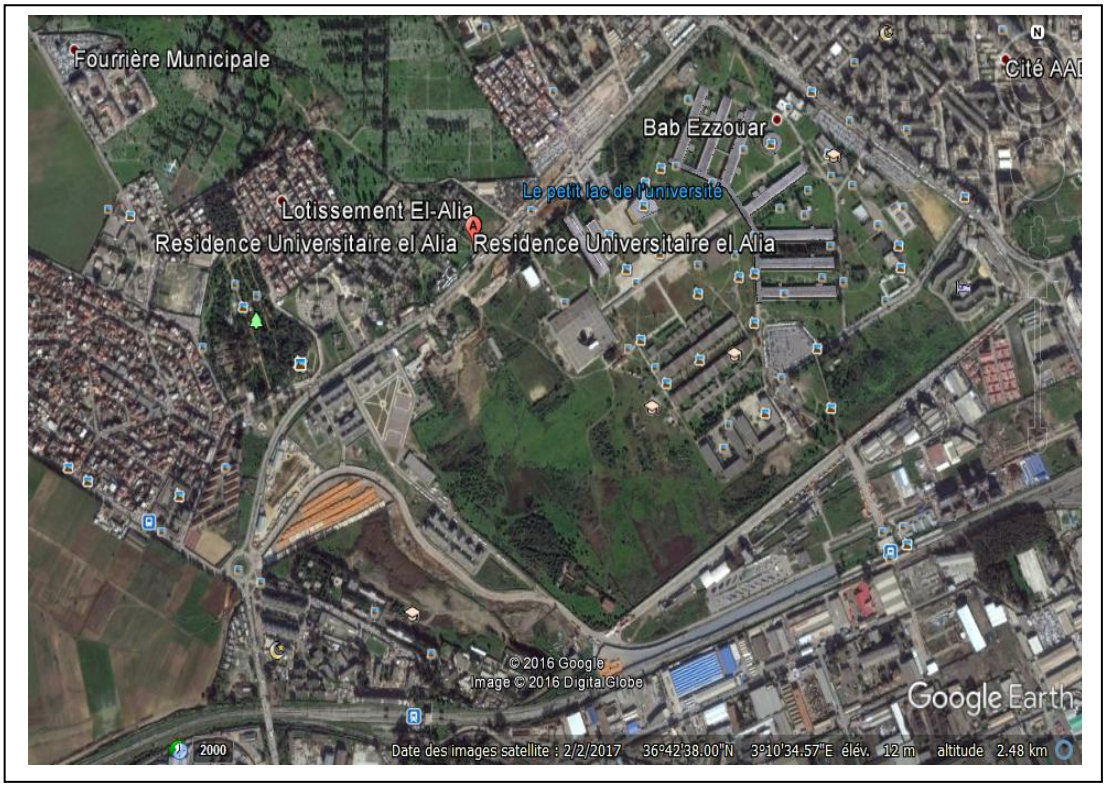
Dans ce chapitre, nous allons décrire les matériels et méthodes utilisés pour la réalisation de notre partie expérimentale qui consiste à :

- L'élaboration des coupes histologiques des feuilles de la plante, afin de mettre en évidence ses différents types tissulaires ainsi que les organes responsables de la production des HEs
- L'extraction des HEs des feuilles de *Rosmarinus officinalis* L.par trois procédés différents : (Hydrodistillation (HD), Hydrodistillation assistée par micro-ondes (HD-MO) et Hydrodistillation assistée par ultrason (HD-US)).
- L'étude cinétique des HEs extraitent par trois procédés.
- La caractérisation des HEs obtenues par les trois procédés en déterminant leur composition chimique par CG/MS.
- La détermination de l'activité anti radicalaire en utilisant la méthode du DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante **[60]**.
- La détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles obtenues par les trois procédés.

II.2. Matériel végétal

L'huile essentielle étudiée a été extraite à partir des feuilles entières et séchées de *Rosmarinus officinalis* L. récoltées à la résidence universitaire de Bab Ezzouar« El-Alia » dans la wilaya d'Alger (figure II.1), au mois de Janvier et Février (pendant la floraison).

Le matériel végétal a été lavé, séché à une température ambiante et à l'ombre pendent 8 jours, afin de stabiliser son humidité au maximum.



FigureII.1 : Localisation géographique de site de prélèvement.

II.3.Localisation des sites sécréteurs des HEs

Afin de mettre en évidence le type tissulaire de notre plante ainsi que les organes responsables de la production des HEs, nous avons réalisé une étude histologique sur ses feuilles. Ces dernières sont utilisées à l'état frais, ensuite coupées et conservées dans l'éthanol à 75%.

La technique employée est celle de la double coloration vitale (double coloration des parois). Cette méthode a pour but de renforcer le contraste et de rendre plus évident les différents constituants tissulaires. Grâce à la réaction successive sur les coupes fines des solutions d'hypochlorite de sodium, résultant la destruction des organites cellulaire et la conservation des parois cellulaires.

On obtiendra la coloration en rose des membranes cellulosiques par coloration avec le rouge Congo (parenchyme cellulosique, liber et collenchyme) et en vert par coloration avec le vert de méthyle les membranes lignifiées ou sclérifiées (bois, sclérenchyme).

- **Mode opératoire**
  - **Réalisation des coupes**

A l'aide d'un bistouri, on découpe des feuilles sélectionnées d'une manièreà obtenir des tranches transversales très fines. Ces coupes sont déposées dans des tamis prêts à la coloration.

- **Double coloration**

  - Traitement des coupes par l'hypochlorite de sodium (Eau de Javel 12°Cl) pendant 20mn, pour vider les cellules de leur contenu cytoplasmique.
  - Rinçage à l'eau courante.
  - Passage dans de l'acide acétique 1% pendant 1 à 2mn pour faciliter la fixation des colorants sur les membranes.
  - Rinçage à l'eau courante.
  - Coloration avec le vert de méthyle (20mn).
  - Rinçage à l'eau courante.
  - Coloration avec le rouge Congo pendant 10 mn.
  - Rinçage à l'eau courante.
  - L'addition de quelque goutes de glycérine dans de l'eau distillée permet la conservation des coupes.

L'observation des coupes histologiques et réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (M.E.B) à CRAPC.

II.4.Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs des feuilles de *Rosmarinus officinalis*L. a été effectuée au laboratoire de Génie de la réaction à l'USTHB par trois procédés différents : Hydrodistillation (HD),Hydrodistillation assistée par micro-ondes(HD-MO) et Hydrodistillation assistée par ultrason (HD-US).

II.4.1.Hydrodistillation (HD)

L'hydrodistillation est réalisée par à un appareil de type Clevenger (figure II.2), où50g de matière végétale sont introduites avec 500ml d'eau dans un ballon de 1000 ml. Ce dernier avec son contenu a été mis sur le chauffe-ballon, qui est optimisé à une température qui

correspond à un débit optimal. Les HEs entraînées par les vapeurs d'eau générées dans le ballon sont dirigées vers le col de cygne (le coude) qui relie le ballon avec le réfrigérant.

Une fois arrivées dans le réfrigérant, elles se condensent rapidement et se retrouvent dans l'ampoule à décantation qui permet la séparation immédiate de l'HE parla différence de sa densité avec celle de l'eau.

Après 2 heures d'extraction, l'HE a été recueillie dans un petit flacon en verre hermétique et recouverte de papier aluminium pour le protéger de la lumière. On le conserve au réfrigérateur, à une température de 4°C.

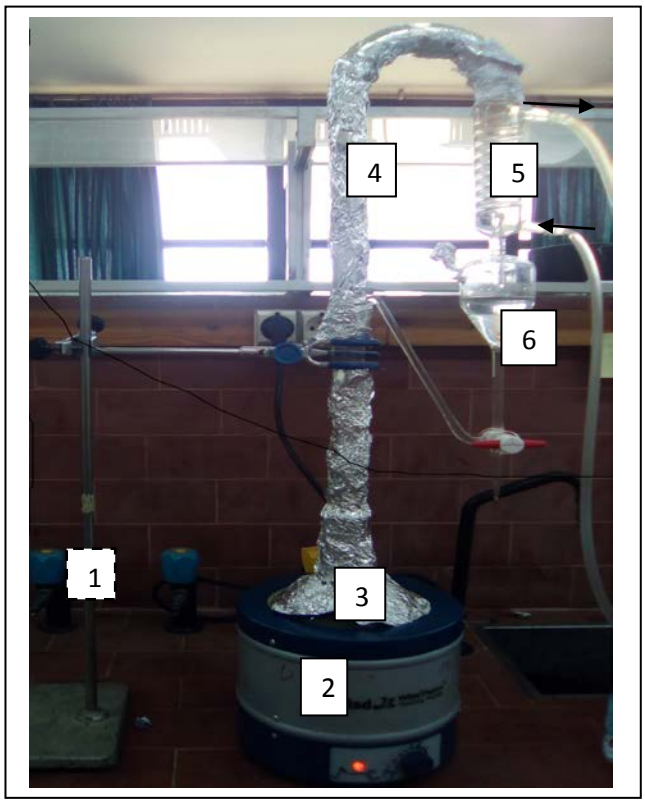


Figure II.2 : système adopté à l'extraction par hydrodistillation.

1. Statif,* 2. *Chauffe ballon,* 3. *Le ballon,*4. *Clevenger,* 5.*Réfrigérant,* 6.*Ampoule.

II.4.2.Hydrodistillation assistée par micro-ondes

Le montage expérimental est constitué d'un ballon surmonté d'un essencier « Clevenger » chauffé dans un four à micro-ondes(figure II.3).

Dans un ballon de 1L, une quantité de 50g de matière végétale séchée est placée en présence de 100 ml d'eau, ce dernier est placé sur un support dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Le choix de la puissance d'irradiation micro-ondes

est important pour s'assurer d'une extraction rapide de l'HE du romarin, pour cela,différentes puissances (300, 600, 900 et 1200W) d'irradiation micro-ondes ont été testées.

FigureII.3: Montage de l'extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes.

II.4.3.Hydrodistillation assistée par ultrason

Une quantité de 50g de matière végétale séchée est déposée dans un ballon avec 500 ml d'eau, l'ensemble est soumis à l'action des ultrasons, dans les conditions opératoires suivantes p= 30 W ; T= 25°C et le temps de sonication a été variable de : 3, 5 et 7min.

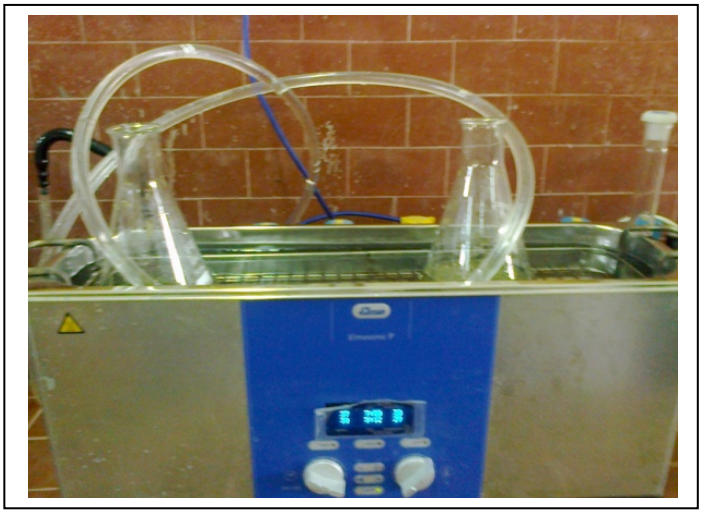


Figure II.4 : Bain del'ultrason.

II.4.4.Calcul du rendement en huile essentielle

A l'issu des extractions réalisées, les phases organiques ont été récupérées pours les trois procédés et mises dans des flacons en verre hermétique puis conservées au réfrigérateur, à une température de 4°C.

La quantité d'HE obtenue est pesée à l'aide d'une balance analytique de précision 0,0002g.

Le rendement en HE est estimé par le rapport des masses de l'HE et de la matière végétale séchée. Sa valeur est donnée par l'équation **II.1**

$$R\ (\%) = MHE / MVS \times 100 \quad \text{(II.1)}$$

R : Rendement de l'HE en %.

MHE : Quantité d'extraits récupérée en g.

MVS : Quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction en g.

II.5.Etude de la cinétique de l'extraction de l'HE

Dans le but d'optimiser le temps d'extraction, il est important d'établir une étude cinétique de l'extraction ; pour cela, nous avons suivi l'évolution de la quantité d'HE extraite par les trois méthodes précédentes en fonction de temps.

Le distillat obtenu pour différentes fractions de temps est récupéré dans des flacons préalablement pesés vide(PFV), les flacons sont de nouveau pesés pour déterminer le poids des flacons pleins (PFP), ce qui permet de déduire le poids de l'HE.

Notons que deux essais ont été effectués pour chaque procédé de l'extraction et c'est les moyennes des essais qui ont été prises en compte pour tracer les courbes des cinétiques traduisant les rendements des HEs de *Rosmarinus officinalis* L. en fonction du temps.

II.6.Caractéristiques des HEs

La caractérisation des HEs consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur, saveur).
- Déterminer ses indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction et pH)
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

II.6.1.Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques (apparence, couleur, odeur, gout) étaient autrefois la seule indication permettant d'évaluer la qualité d'une HE, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limités sur ces produits, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises.

La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes et portant sur les indices physicochimiques.

II.6.2.Indices physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiqués par le recueil des normes de l'Association Française de la Normalisation (AFNOR).

a) Mesure de la densité selon la norme NF T 75-111 :

Elle est effectuée à l'aide d'un pycnomètre d'un millilitre de volume, à la température de 20°C.

b) Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112 :

Elle est effectuée à l'aide d'un réfractomètre. Avec une précision de ± 0,0002, la lecture directe des indices de réfraction est située entre 1,3000 et 1,7000.

Mode opératoire

- Régler le réfractomètre en mesurant les indices de réfraction du produit étalon (eau distillée, d'indice de réfraction est de 1,3330 à 20 °C) ;
- Vérifier que le réfractomètre est maintenu à la température à laquelle les lectures doivent être effectuées, la température de référence étant de 20 °C ;
- Placer l'échantillon pour essai dans le réfractomètre, attendre que la température est atteinte, puis effectuer la mesure.

c) Mesure du pH

Elle est effectuée à l'aide d'un papier –pH, pour les HEs extraites par les trois méthodes d'extraction.

II.6.3.Détermination de la composition chimique des huiles essentielles par CG/SM

Les HEs récupérées suivant les trois procédés (HD, HD-MO et HD-US) ont été analysées par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG/SM) de type Hewlett Packard Agilent 6890 plus et Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent5973, cet analyse est réalisée au centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-Chimiques CRAPC.

Les conditions opératoires employées sont détaillées dans le tableau II.1 suivant :

Tableau II.1 : Les conditions opératoires de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CG/SM).

Injecteur	**Température :** 250°C. **Mode d'injection :** Split 50:1. **Volume injecté :** 0.2 µl.
Colonne	**Type :** HP-5MS. **Dimensions :** long 30 m * D int 0.25 mm * épaisseur film 0.25 µm. **Phase stationnaire :**5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. (Autre : Spécifier). **Température du four :** 60°C pendant 8 min, 2°C/min jusqu'à 250°C, isotherme pendant10 min. **Durée d'analyse :** 113 min **Gaz vecteur :** Hélium pureté : N 6. **Débit GV :** 0.5 ml/min.
Détecteur de masse	**Mode d'analyse :**Scan TIC (de 30 à 550). **Délai du solvant :** 3.5 min. **Température de l'interface :** 270 °c. **Type d'ionisation :** Impact électronique. **Intensité du filament :** 70 ev. **Type de l'analyseur de masse :**Quadripôles . **Température de la source :** 230 °c.

- **Principe**

L'identification des constituants de l'HE se fait par comparaison du spectre de masse de chaque pic séparé par CG avec ceux reportés comme références dans des librairies spécialisées de spectrométrie de masse. La fiabilité de la reconnaissance est principalement, donnée par un taux de vraisemblance (supérieur à 90 %) du spectre de masse du soluté inconnu par rapport à celui de la banque de données. Cette présence est confirmée par le calcul des indices de rétention propres à ce composant **[61-63].**

La préparation de la solution étalon des n-alcanes pour la mesure des indices de Kovats des composés identifiés dans les HEs a été faite comme suit : Solution des n- alcanes de C_8 à C_{26}à 5% dans le pentane. Soit 0,1 g de chaque alcane dans 20 ml de pentane, conservé au réfrigérateur. L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices

de rétention **[58]** et des spectres de masse expérimentaux de leurs ions-fragments caractéristiques à ceux cités dans la littérature et/ou inventoriés dans les banques de librairies spectrales**.**

II.7.Evaluation des activités biologiques de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L.

II.7.1.Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antiradicalaire à été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante.

Le DPPH (2,2 -diphényl -1- picrylhydrazyl) est un radical libre stable possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cette délocalisation empêche la polymérisation du composé, qui reste sous forme monomère relativement stable à température ambiante. Ainsi, cet état induit l'apparition d'une couleur violette foncée bien caractéristique de la solution DPPH.

Cette couleur disparait en présence d'un antioxydant lorsque le DPPH est réduit, passant au jaune pâle du groupe pécryl ; et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons **[64]**. Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517nm.

Les solutions diluées sont préparées dans de l'éthanol pour obtenir des concentrations finales allant de 50 à 1000 mg/L de la solution-mère des HEs (1000 mg/L). Deux millilitres de solution éthanoïque fraîche de DPPH à une concentration de 6 x 10^{-5} M sont ajoutés.

Le BHT (0,1 mg/mL) est utilisé comme contrôle positif à des concentrations éthanoïques diluées allant de 0,05 à 0,1 mg/mL. Les échantillons sont agités dans l'obscurité. La diminution de l'absorbance à 517 nm est déterminée en utilisant un spectrophotomètre de type Optizen 3220UV.

L'éthanol est utilisé comme le blanc ; l'éthanol avec DPPH est utilisé comme contrôle négatif.

Tous les échantillons sont testés en trois répétitions. La concentration de l'échantillon nécessaire pour diminuer l'absorption de DPPH de 50% (EC50) est calculée graphiquement.

Le pourcentage de l'inhibition du radical DPPH est calculé selon la formule suivante **[65]**:

$$\%I = [(A_0 - A_i)/A_0] \times 100 \quad \text{II.2}$$

Où **% I** = inhibition de DPPH (%),

$\mathbf{A_0}$ = Absorbance de contrôle (Pas antioxydant) t = 0.

Ai= Absorbance de l'échantillon testé à la fin de la réaction (t = 30min).

II.7.2.Evaluation de l'activité antibactérienne

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1929, jusqu'à nos jours les antibiotiques sont utilisés massivement contre les infections bactériennes. En raison de cette utilisation excessive, une résistance bactérienne s'est développée contre la majorité des antibiotiques **[65]**. *Staphylocoque* doré résistant à la méthicilline (MRSA), les entérocoques résistant à la vancomycine et des souches résistantes de *Pseudomonas* sont des exemples de bactéries multi résistantes qui deviennent un véritable problème de santé publique. Les MRSA sont probablement les bactéries résistantes les plus communes trouvées dans les hôpitaux, et responsables d'infections nosocomiales **[66]**.

Outre la résistance aux antibiotiques, ces derniers peuvent être à l'origine d'effets néfastes sur les patients développent une hypersensibilité, une immunosuppression et des réactions allergiques aux traitements par les antibiotiques. Par conséquent, le développement du traitement alternatif semble être nécessaire, d'où l'intérêt croissant aux pouvoirs antimicrobiens des substances actives issues des plantes aromatiques.

L'activité antibactérienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L. a été évaluée parla méthode de diffusion en milieu solide.

Cette étude a été accomplie au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté de biologie de Boumerdes.

- **Choix des souches**

Les souches ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Thénia. On a essayé d'élargir la gamme de bactéries testées : à Gram positifs et à Gram négatif :

- **Bactérie à Gram-**

***Enterobacteriaceae* :** Escherichia coli ATCC25922.

***Pseudomonadaceae*:** Pseudomonas spATCC 683.

- **Bactérie à Gram +**

***Micrococaceae* :** Staphylococcus aureus ATCC 25923, M.R.S.A ATCC 43300.

- **Milieux de culture**

Selon les méthodes employées, nous avons utilisé les milieux de cultures suivants:

- Gélose Nutritive : Milieu d'isolement et de conservation non sélectif.
- Gélose Mueller Hinton.

- **Conservation des souches**

Les souches bactériennes ont été conservées à 5C° dans des tubes stériles contenant 10ml de gélose nutritive inclinée.

- **Préparation de l'inoculum**
  - **Préparation de la pré culture**

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches bactériennes jeunes en phase de croissance exponentielle. La réactivation des cultures est effectuée par repiquage à la surface de la gélose nutritive pré coulée dans des boites de Pétri ensuite incubée à 37C° pendant 18 à 24heures.

  - **Préparation de la suspension bactérienne**

Dans de l'eau physiologique stérile, 3 à 5 colonies similaires bien isolées sont déchargées. Apres homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la standardisation à 106 UFC/ml a été réalisée par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620nm. La DO (densité optique) obtenue doit être compris entre 0,2 et 0,3 ce qui correspond à une concentration de 107 à 108 UFC/ml selon Mc Ferland.

- **Activité antibactérienne (Aromatogramme)**

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HEs a été réaliséepar la méthode de diffusion en milieu gélosé (Aromatogramme), méthode décrite par Vincent (1991) et revu par Djahoudi. Le principe de l'aromatogramme est inspiré de l'antibiogramme, il consiste à tester la sensibilité des souches bactériennes par la diffusion de l'extrait sur le milieu solide dans une boite à Pétri, avec la création d'un gradient de concentration entre le composé et le microorganisme cible.

L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des HEs sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes.

❖ **Ensemencement**

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé Mueller Hinton en surfusion a été coulé aseptiquement à raison de 15ml par boite. Apres la solidification, un écouvillon stérile a été imbibé dans la suspension bactérienne et étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boite à environ 60° après chaque application dans le but d'avoir une distribution égale de l'inoculum.

❖ **Application des disques et incubation**

Les disques stériles imprégnés des HEs à raison de 10µl par disque **[67]** ; ont été déposés à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose. Les boites ont été incubées 24 h à 37 °C.

❖ **Expression des résultats**

Les diamètres des zones d'inhibition lorsqu'elles existent ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

Dans le chapitre III, qui va suivre, nous allons exposer les résultats et discussions relatifs aux expériences citées.

Résultats & Interprétations

Chapitre III. Résultats et discussions

III.1. Objectif du chapitre

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats relatifs aux expériences décrites dans le chapitre II. Nous allons illustrer notamment, les résultats de l'extraction, la caractérisation et la valorisation des HEs de *Rosmarinus officinalis* obtenues par trois différents procédés (HD-MO « hydrodistillation assistée par micro-ondes », HD-US « hydrodistillation assistée par ultrasons » et HD « hydrodistillation« conventionnelle »). La caractérisation de la matière végétale par MEB sera également exposée.

III.2. Illustration des sites sécréteurs des huiles essentielles

Les observations par microscopie électronique à balayage (M.E.B.) servent à localiser et à connaître avec précision, les sites producteurs des HEs.

En effet, les résultats de l'investigation expérimentale sur les feuilles de *Rosmarinus officinallis* L. (romarin) par M.E.B. ont montré la présence de nombreux trichomes non glandulaires appelés communément poils tecteurs, sur les veines et les extrémités des feuilles (figure III.1). Certains poils tecteurs ont une forme unicellulaire, simple et de forme conique, d'autres sont pluricellulaires et ramifiés comme cité dans plusieurs travaux **[68].**

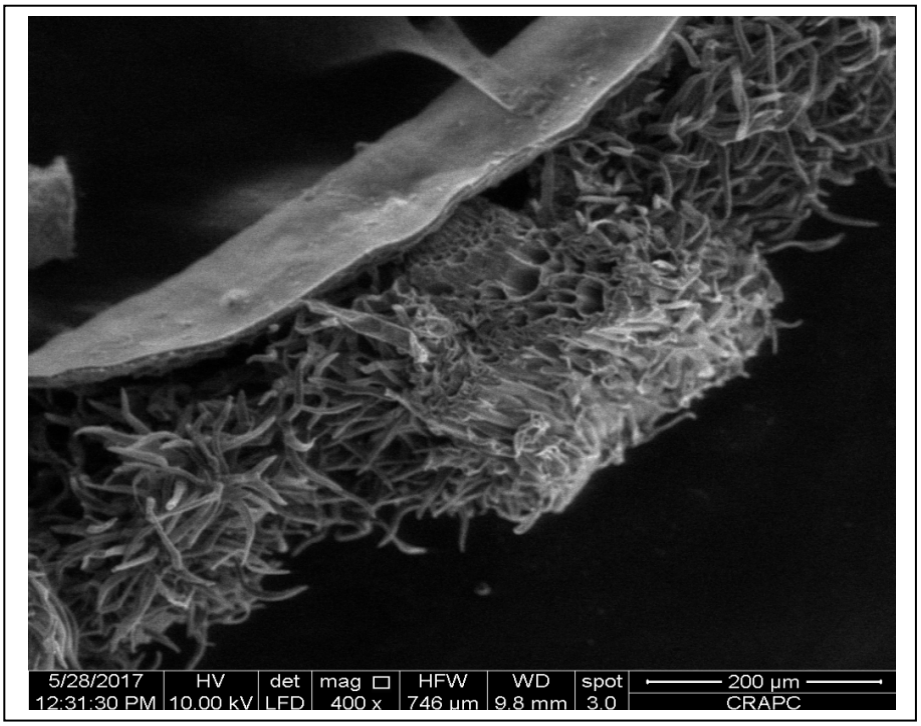


Figure III.1 Micrographie par MEB de la feuille de romarin fraîche et non traitée.

Cependant, uniquement les trichomes glandulaires (poils sécréteurs) peuvent synthétiser et contenir l'HE. Deux types sont cités : les trichomes peltés et les trichomes capités **[69].**

Ces derniers (figures III.2, 3), nommés aussi poils glandulaires, sont retrouvés sur la surface adaxiale et abaxiale de la feuille de romarin. Ils sont constitués d'une seule cellule basale encrée dans l'épiderme de la feuille, d'un cou porteur court unicellulaire ou bicellulaire et d'une large tête sécrétrice constituée d'une ou de huit cellules sécrétrices disposées en rosaces **[70].**Les cellules sécrètent l'huile biosynthétisée sous la cuticule protectrice. La récupération de son contenu en HE ne se fera que par rupture de la cuticule **[71].**

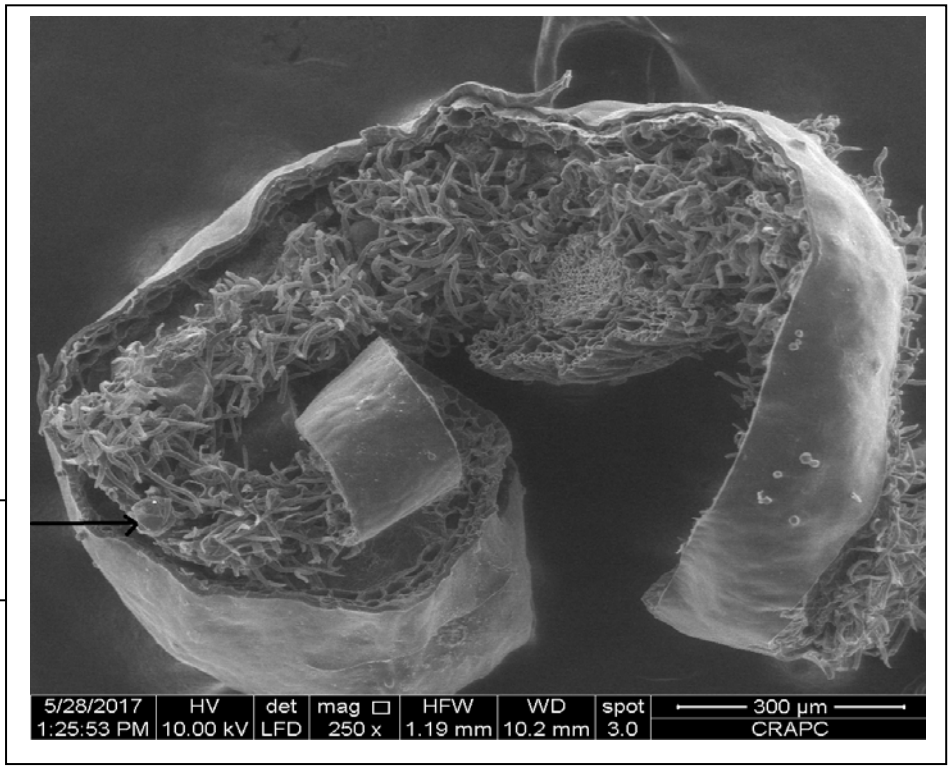


Figure III.2 Micrographie par MEB de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la forme d'un trichome capité.

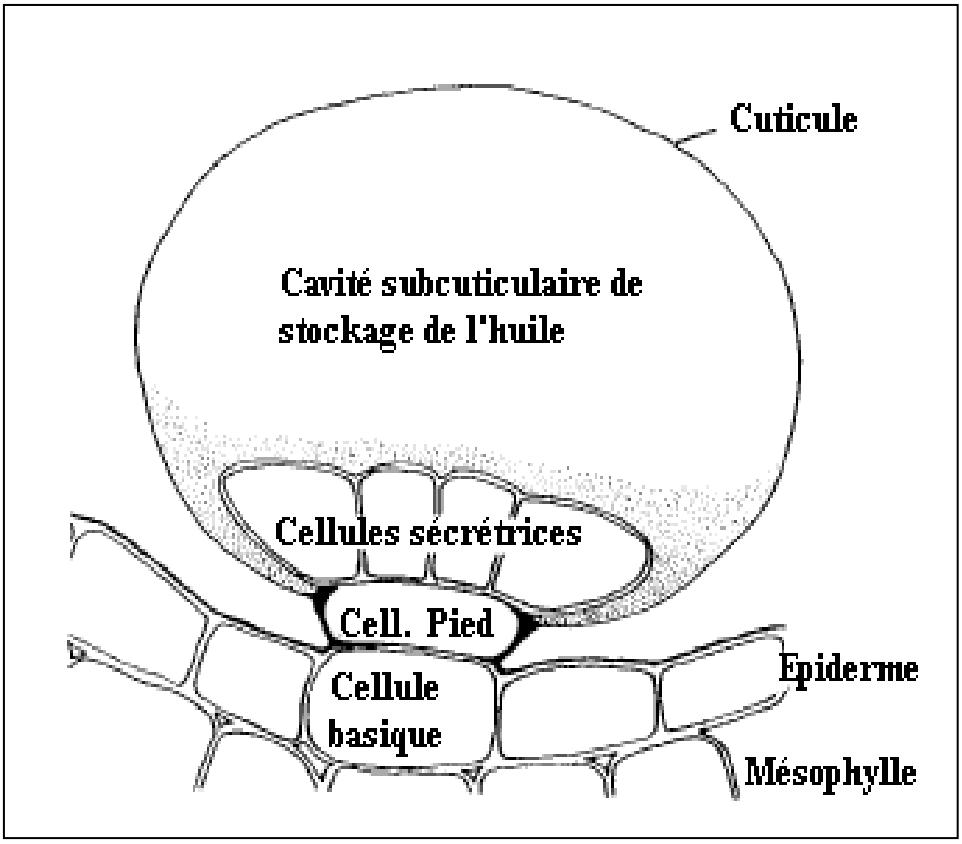


Figure III. 3: Schéma du trichome capité **[70].**

Les trichomes peltés (figures III.4,5) sont des poils glandulaires unicellulaires et à pied long. Ils prédominent les surface abaxiales et se localisent sur les dépressions épidermiques. Ils sont composés d'une cellule basale épidermique, de deux à trois cellules constituant le pied qui porte à son bout, une cellule sécrétrice. Les modes de sécrétion et d'excrétion des HEs sont identiques à ceux rapportés précédemment pour les trichomes capités.

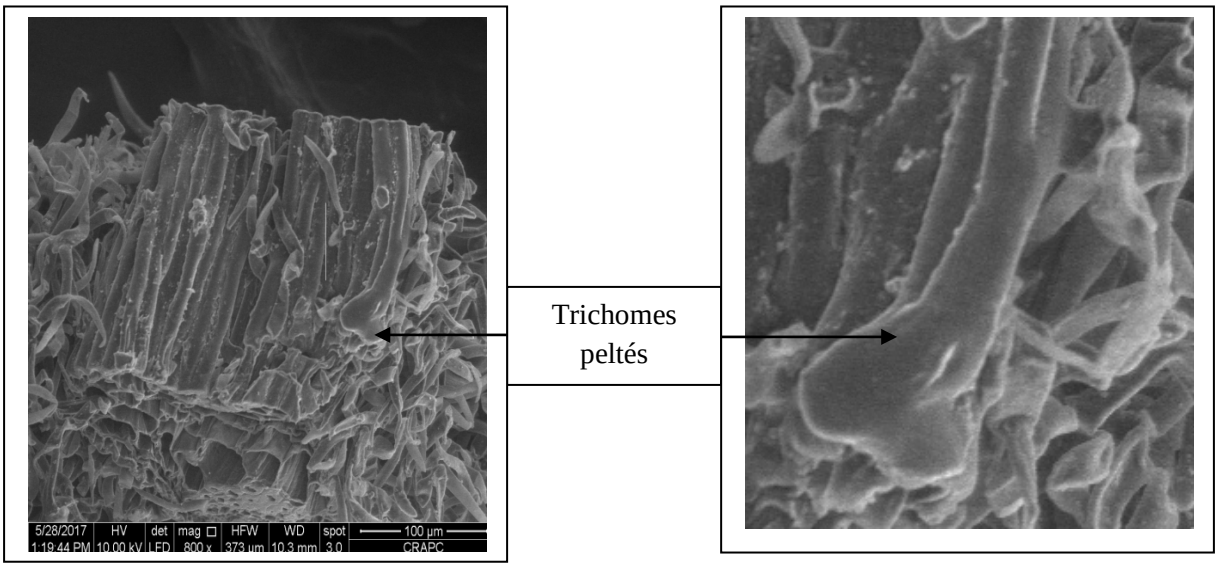


Figure III.4 : Micrographie par MEB de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la forme des trichomes peltés.

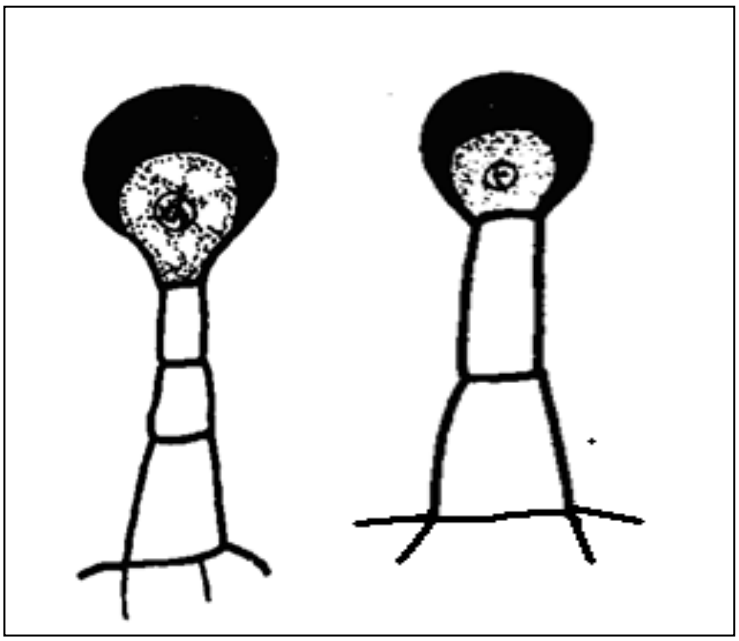


Figure III.5 : Schéma des trichomes peltés **[72].**

III.3.Extraction de l'huile essentielle de romarin par différents procédés

L'extraction de l'HE de *R.officinalis* L. a été réalisée par trois différents procédés.

III.3.1. Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation est conduite pendant 2heures, elle est réalisée sur les feuilles de *R.officinalis* L. séchées, à l'aide d'un appareil de type « Clevenger». L'étalonnage donnant la puissance de chauffage en fonction du débit du condensat est donné en Annexe N°01.

Dans une étude préliminaire, nous avons déterminé les débits du condensat (Qmin, Qmoy et Qmax) et leur influence sur l'extraction de l'HE de romarin (figure III.6).

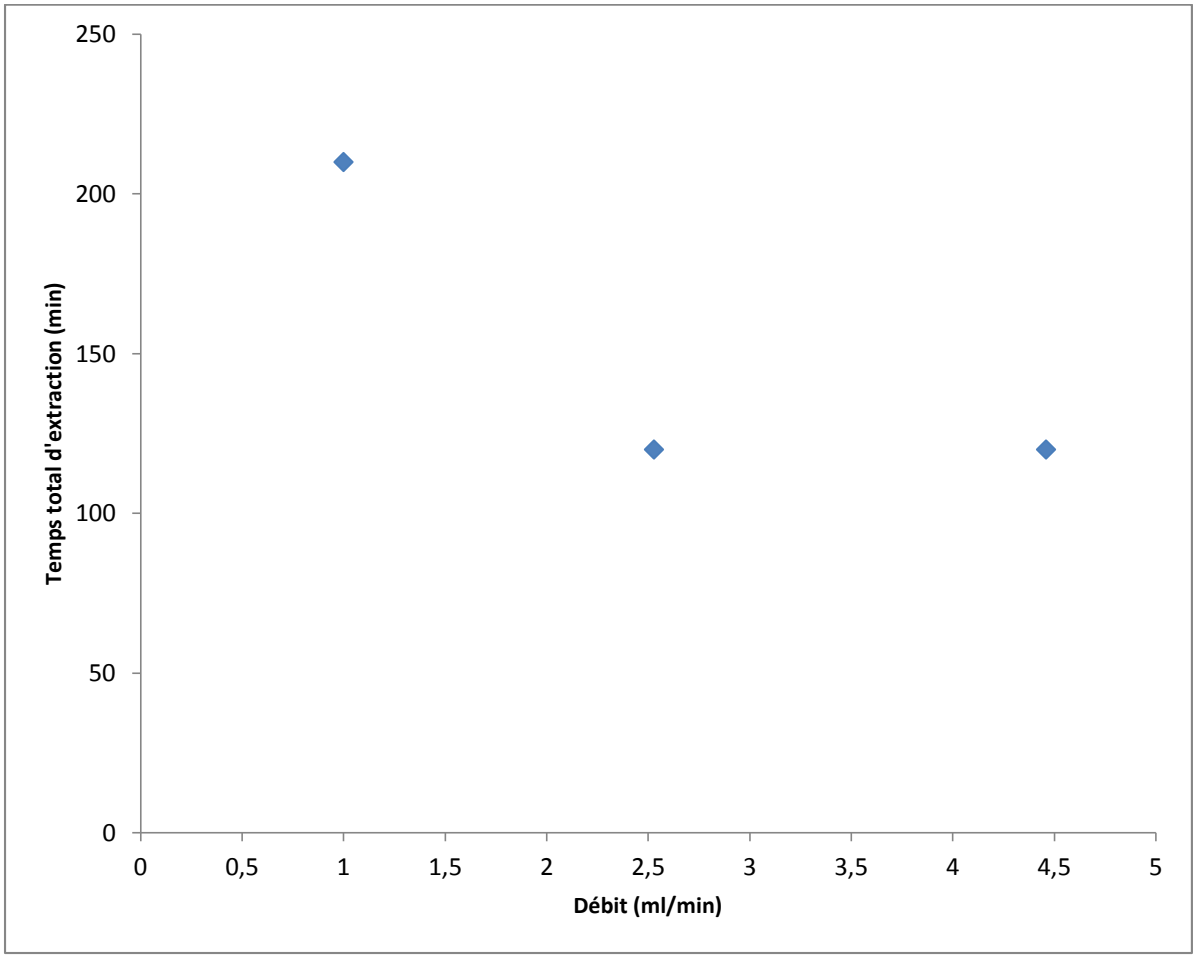


Figure III.6 : Profil de temps total d'extraction en fonction du débit utilisé en HD.

Un débit moyen Qmoy=2,53ml/mn à été choisi comme débit optimal, la durée de l'extraction complète pour une charge de 50g de la matière végétale, engendrée pour ce débit est de 2heures.

III.3.2. Extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes

Pour ce procédé, nous avons étudié l'influence de la puissance des micro-ondes sur la durée de l'extraction de l'HE des feuilles de *R.officinalis* L. Cependant, le réglage de la puissance ne doit pas compromettre l'évaporation des composés volatils de l'HE déjà extraite (figure III.7).

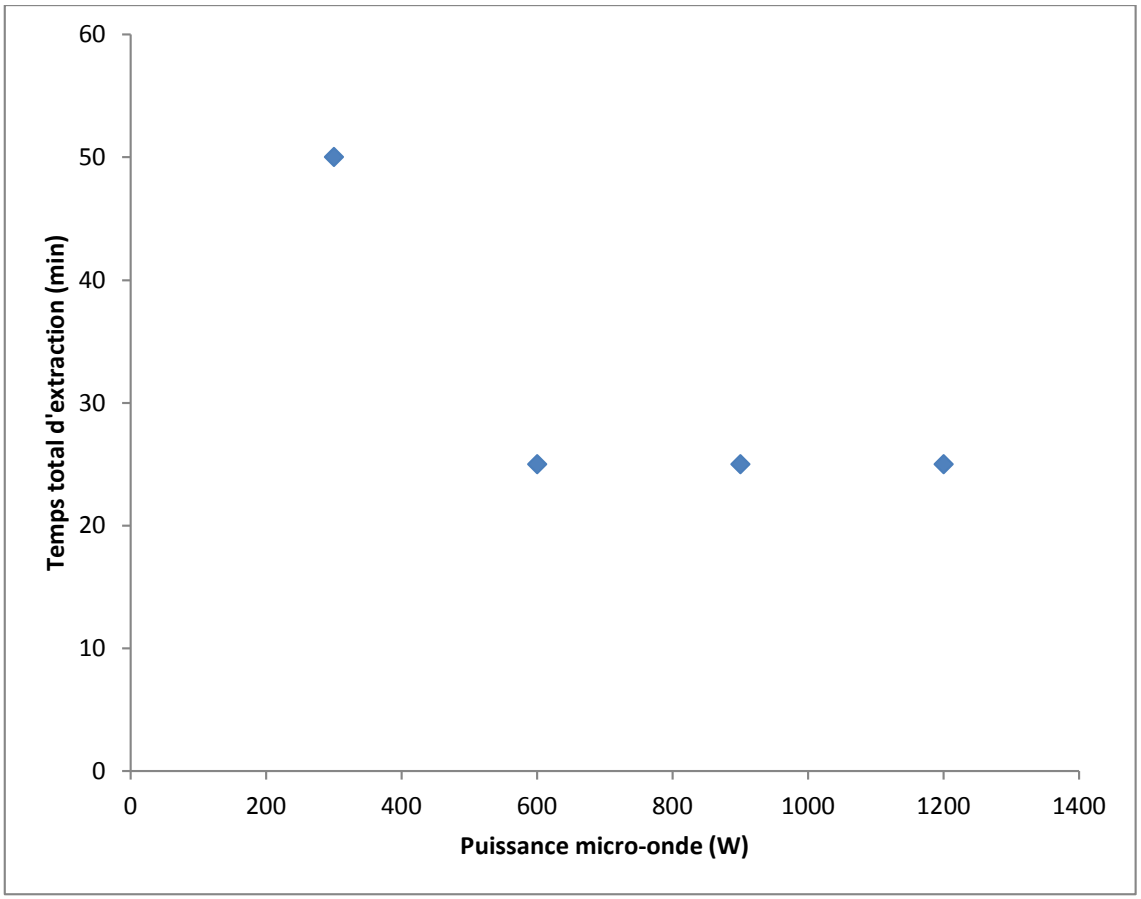


Figure III.7 : Profil du temps total de l'extraction en fonction de la puissance des micro-ondes.

Une puissance de 600 W d'irradiation des micro-ondes a été choisie comme puissance optimale. Pour cette puissance, la durée de l'extraction complète de l'HE présente dans 50 g de matière végétale est de 25 minutes.

III.3.3. Extraction par hydrodistillation assistée par ultrasons

Le chois de temps de sonication est très important, pour cela nous avons étudié son influence sur le rendement de l'extraction. La figure III.8 illustre l'évolution du rendement de l'extraction en fonction du temps de sonication.

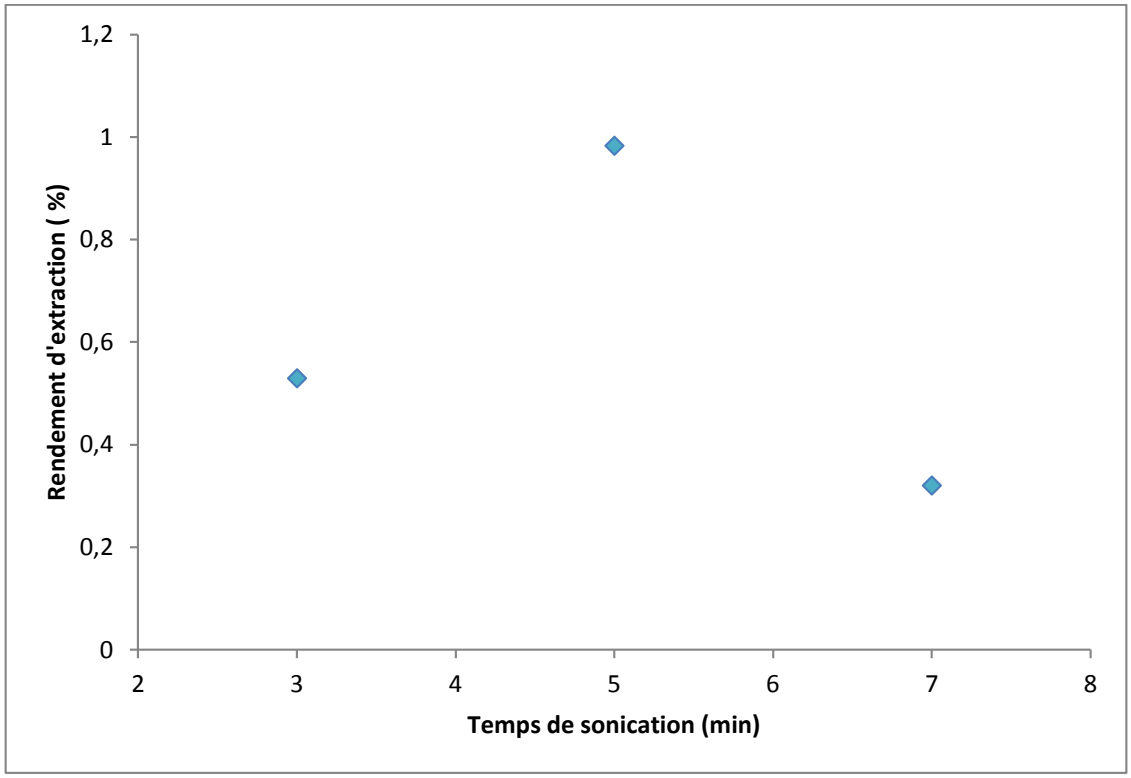


Figure III.8 : Evolution du rendement de l'extraction en fonction du temps de sonication

Un temps de sonication de 5 minutes a été choisi comme temps optimal de sonication. Dans ces conditions, la durés de l'extraction complète de l'HE présente dans 50 g de matière végétale est de 50 minutes.

III.3.4. Rendement de l'extraction

Les HEs sont isolées par décantation puis sont pesée dans le but de déterminer les rendements de l'extraction.

Les rendements de l'extraction de l'HE de *R.officinalis* L. obtenus pour les trois procédés d'extraction, HD, HD-MO et HD-US sont illustrés dans le tableau III.1 :

Les rendements en HE des feuilles de *R. officinalis* L., obtenus par les procédés de HD, HD-MO et HD-US sont, respectivement, de 1,125, 0,807, et 0,983%. Ces rendement sont supérieurs aux rendements obtenus par *Taleb-Toudert* (2015)**[73]** et *Atik-Bekkara* (2007)**[74]**qui sont, respectivement de 0,8 et 0,6%, Cette différence pourrait s'expliquer par l'influence de la période de récolte, les conditions environnementales (le climat, la zone géographique, le degré de fraicheur) et la méthode d'extraction employée sur la production de la plante en essence

.

Tableau III.1 : Rendement en HE des feuilles de romarin pour les trois (3) procédés de l'extraction.

	Procédé		
	HD	HD-MO	HD-US
Durée de l'extraction (min)	120	25	50
Rendement (%)	1,1250	0,8070	0,9831

D'après ces résultats, La région géographique est un facteur influençant le rendement en HE. Nous rappelons que le romarin utilisé dans la présente étude est collecté dans la région d'Alger celui de *Taleb-Toudert* (2015) dans la région de Kabylie et celui d'Atik-Bekkara (2007) dans la région de Tlemcen. Ces régions se caractérisent par des climats et des sols différents.

L'HD-MO est le procédé de l'extraction qui fournit presque la même quantité en HE que celle extraite par HD tout en étant 5 fois plus rapide. Lors d'une HD-MO, la phase de chauffage est relativement faible par rapport à HD. Cette période de chauffe est toujours de l'ordre de 4 à 5 minutes pour la HD-MO mais elle est de 30 minutes pour HD.

En effet, le chauffage conventionnel par HD s'effectue de l'extérieur de la matière végétale vers l'intérieur. Contrairement à celui des micro-ondes où le chauffage s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur d'une manière intense. Cela fait accélérer le processus et conduit à l'obtention d'une extraction complète en un temps plus court **[22].**

Le procédé HD-US a donné la même quantité en HE. Ces résultats sont intéressants relativement au procédé par HD simple, (la durée de l'extraction pour HD est de 120 minutes alors que pour HD-US, elle est de 50 minutes). Cette réduction de temps peut être expliquée par l'effet engendré par les ondes de sonication sur les trichomes glandulaires des feuilles de Romarin. Ces ondes favorisent l'éclatement de ces glandes qui libèrent l'HE **[28]**.

III.4. Cinétique de l’extraction des huiles essentielles

La durée de l’extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l’huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile voire impossible de récupérer la totalité de l’HE. Alors ce temps correspondra au moment pour lequel nous n’observons plus d’huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus de l’extraction.

Lors de ce travail, une cinétique a été réalisée sur l’extraction de l’HE pour chaque procédé HD, HD-MO et HD-US. La Figure III.9, illustre, pour les trois procédés étudiés, l’évolution du rendement en HE dans les conditions optimales en fonction du temps.

Trois phases sont observées dans le processus de l'extraction HD-MO figure III.9(b). L'étape "0" représente la phase de chauffage de la température ambiante à 100°C. La première étape (étape 1) est représentée par une ligne croissante qui caractérise les premières quantités d'HE extraite, situées à la surface des particules végétales, Elles représentent environ 70% du rendement total obtenu en 20 minutes. Cette phase est suivie d'une deuxième ligne croissante (étape 2), représentant la diffusion interne de l'HE du milieu des particules vers le milieu extérieur. Cette étape est provoquée par le réchauffement de l'eau biologique située dans les cellules végétales. Dans cette étape (réalisée en 05 minutes), la quantité d’huile extraite représente près de 30% du rendement global. La troisième partie (étape 3) correspond à une ligne horizontale qui marque la fin du processus de l'extraction.

Nabil bousbia (2011) **[75]** a effectué une extraction d'HE de *Rosmarinus officinalis* L. par micro-ondes et a trouvé un profil de rendement similaire à nos résultats.

Le profil de la technique de l'extraction HD-US présente également trois étapes similaires mais avec des phases différentes de celles obtenues par HD et HD-MO, la première étape représente la phase de chauffage de la température ambiante à 100°C. La deuxième étape conduite en 40 minutes représente l’augmentation progressive du rendement de l’extraction en HE, suite à l’éclatement intense des poils sécréteurs. La fin du processus de l'extraction est atteinte après 50 minutes.

Le profil de la technique de l'extraction classique HD présente également trois étapes similaires, mais avec des phases différentes de celles obtenues par HD-US et HD-MO, La fin du processus de l'extraction est atteinte après 120 minutes.

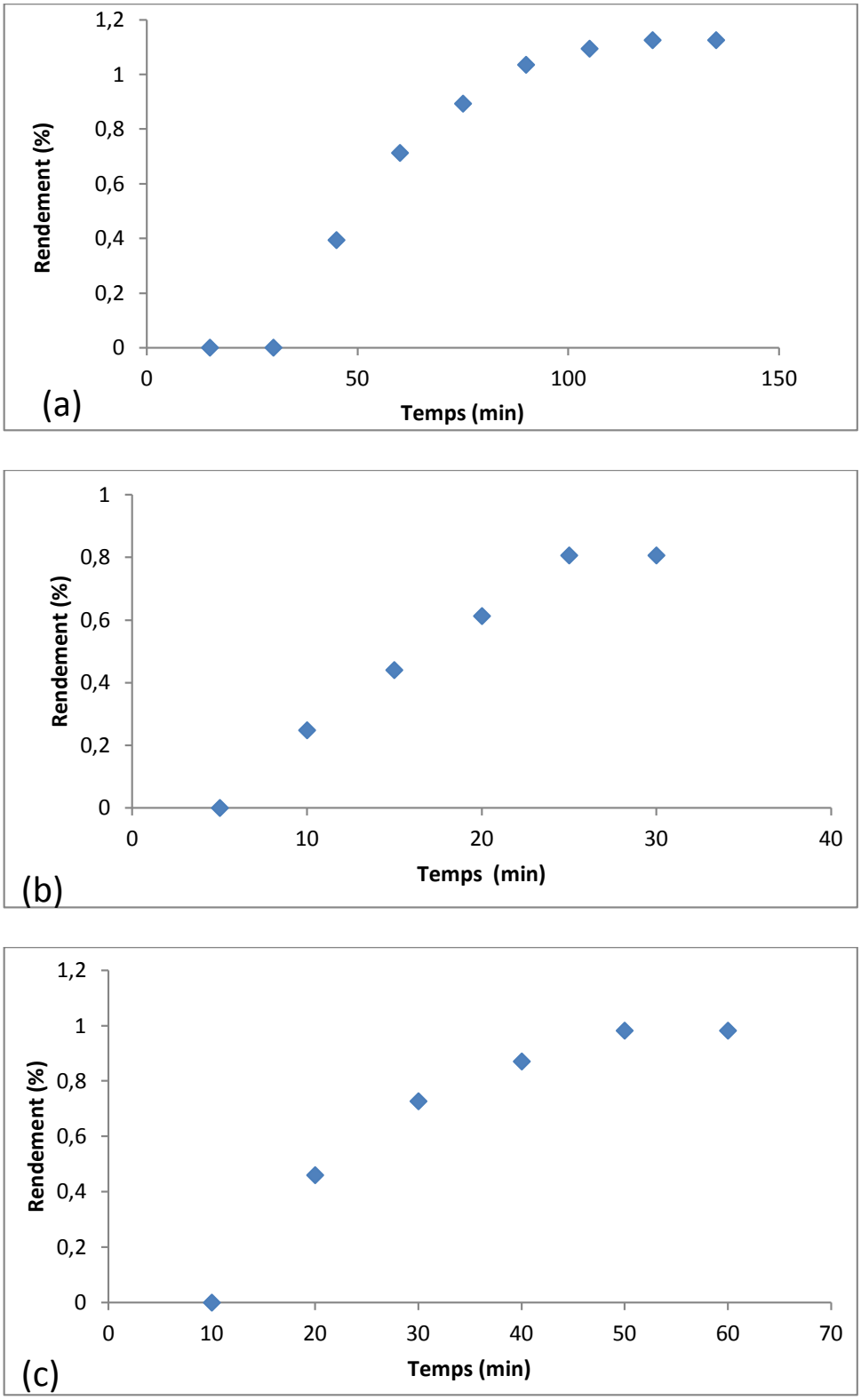


Figure III.9 : Cinétique de l'extraction de l'HE des feuilles de romarin par HD(a), HD-MO(b) et HD-US(c)

III.5.Composition chimique des HEs des feuilles de romarin obtenues par différents procédés

Les chromatogrammes obtenus par GC/MS des HEs obtenues par HD, HD-US et HD-MO sont présentés par les figures III. (10-12) et la composition de ces huiles déduites est illustrée dans les tableaux III. (2-4). Les composés sont identifiés par la détermination de leurs indices de rétention selon leur ordre croissant d'élution.

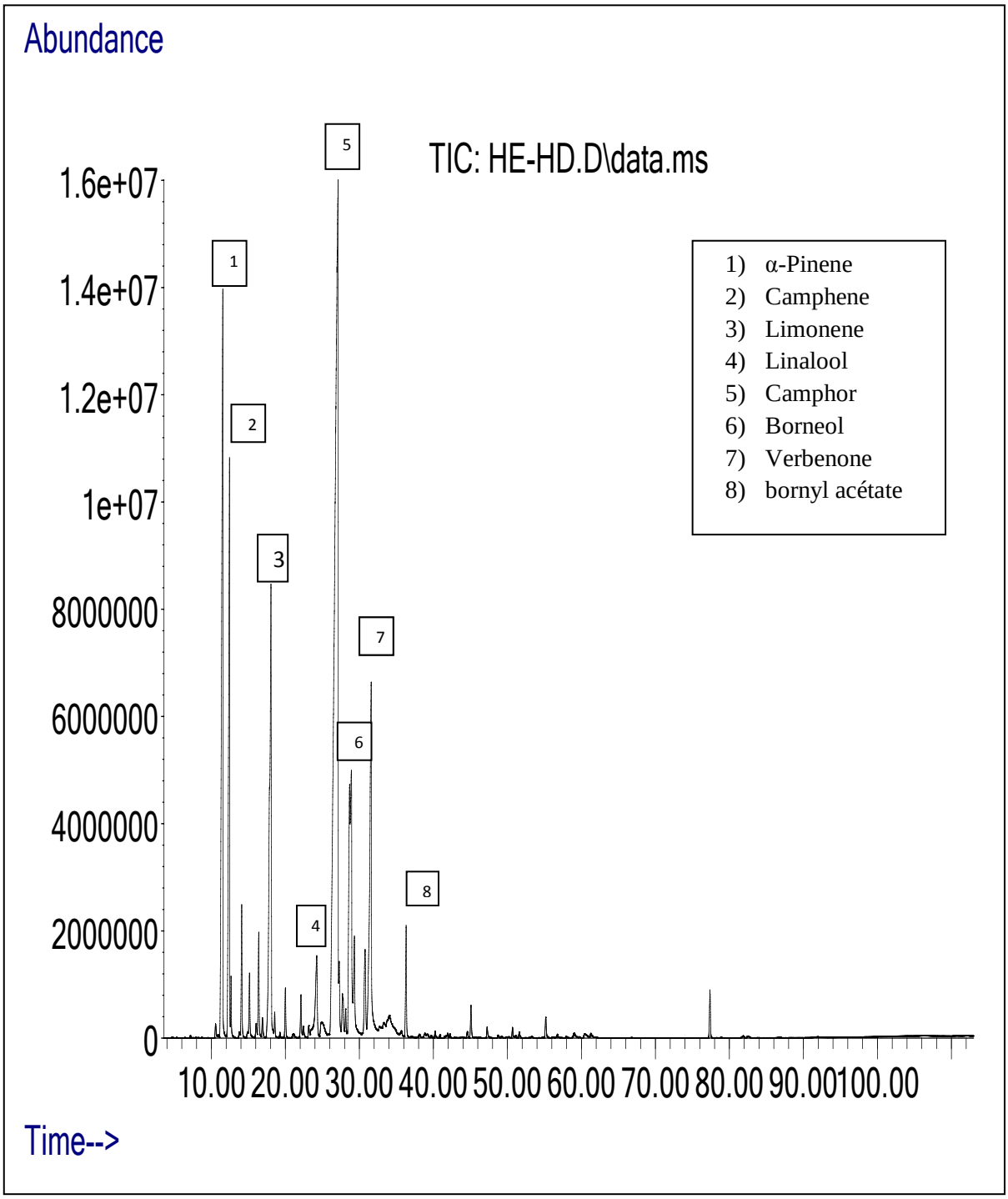


Figure III.10 : Chromatogramme de l'huile essentielle de romarin extraite par HD.

Tableau III.2 : Composition de l'huile essentielle de Romarin obtenue par HD.

RT	KI	%	Composé
5,25	**802**	0.0009	Octane
5,32	**804**	0.0060	Hexanal
6,41	**831**	0.0043	1,2,4,4-Tetramethylcyclopentene
7,16	**850**	0.0205	trans-Hex-2-enal
10,58	**922**	0.1799	Tricyclene
10,91	**927**	0.0474	alpha-thujene
11,55	**937**	11.2567	α-Pinene
12,45	**951**	7.0470	Camphene
12,67	**955**	0.5035	thuja-2,4(10)-diene
13,77	**972**	0.0764	3,7,7-Trimethylcyclohepta-1,3,5-triene
14,1	**977**	1.2881	β-Pinene
14,88	**989**	0.0731	octanone 2
15,18	**994**	0.7193	β-Myrcene
15,65	**1001**	0.0150	Carene<delta-2->
16,07	**1007**	0.1910	α-Phellandrene
16,41	**1012**	1.1318	Carene<delta-3->
16,9	**1019**	0.2597	α-Terpinene
17,32	**1024**	0.0016	ortho- cymene
17,86	**1032**	2.6823	para- cymene
18,06	**1034**	6.6014	Limonene
18,56	**1041**	0.2526	Ocimene<(Z)-beta->
19,25	**1051**	0.0632	Ocimene<(E)-beta->
20,01	**1061**	0.5082	γ-Terpinene
21,06	**1076**	0.0907	cis-sabinene hydrate
22,12	**1090**	0.4815	Terpinolene
22,46	**1095**	0.1713	para- cymenene
23,17	**1105**	0.1489	Filifolone
24,25	**1119**	1.8444	Linalool
24,99	**1130**	0.1489	Chrysanthenone
25,18	**1132**	0.2506	α-Campholenal

27,13	**1159**	34.0778	Camphor
27,29	**1161**	0.8968	Citronellal
27,73	**1167**	0.474	trans-Pinocamphone
27,84	**1168**	0.3184	Pinocarvone
28,17	**1173**	0.3271	cis-Pinocamphone
28,76	**1181**	8.1905	Borneol
29,34	**1189**	1.6703	4 –Terpineol
31,61	**1221**	7.8421	Verbenone
32,72	**1237**	0.3065	cis carveol
34	**1255**	0.4564	cis-myrtanol
35,7	**1279**	0.1307	cavone oxyde
36,3	**1288**	1.2106	bornyl acétate
38,13	**1315**	0.0764	Thymol
38,6	**1322**	0.0101	Carvacrol
40,28	**1347**	0.0839	Piperitenone
40,9	**1357**	0.0334	Citronellylacetate
42,24	**1377**	0.0479	α-Copaene
43,93	**1402**	0.005	(Z)- jasmone
44,57	**1413**	0.0758	Methyleugénol
45,1	**1421**	0.3737	(E)-Caryophyllene
47,27	**1456**	0.1294	α-Humulene
48,77	**1480**	0.0365	γ-Muurolene
49,22	**1487**	0.0164	γ-Curcumene
50,7	**1511**	0.1178	ß-bisabolene
51,14	**1519**	0.0322	γ-Cadinene
51,62	**1527**	0.0837	δ-Cadinene
55,19	**1587**	0.277	Caryophylleneoxide
57,98	**1636**	0.0136	epi-cubenol
58,99	**1654**	0.0631	α-Cadinol
61,3	**1695**	0.0723	α-bisabolol
77,41	**2011**	0.5215	trans-Geranylgeraniol

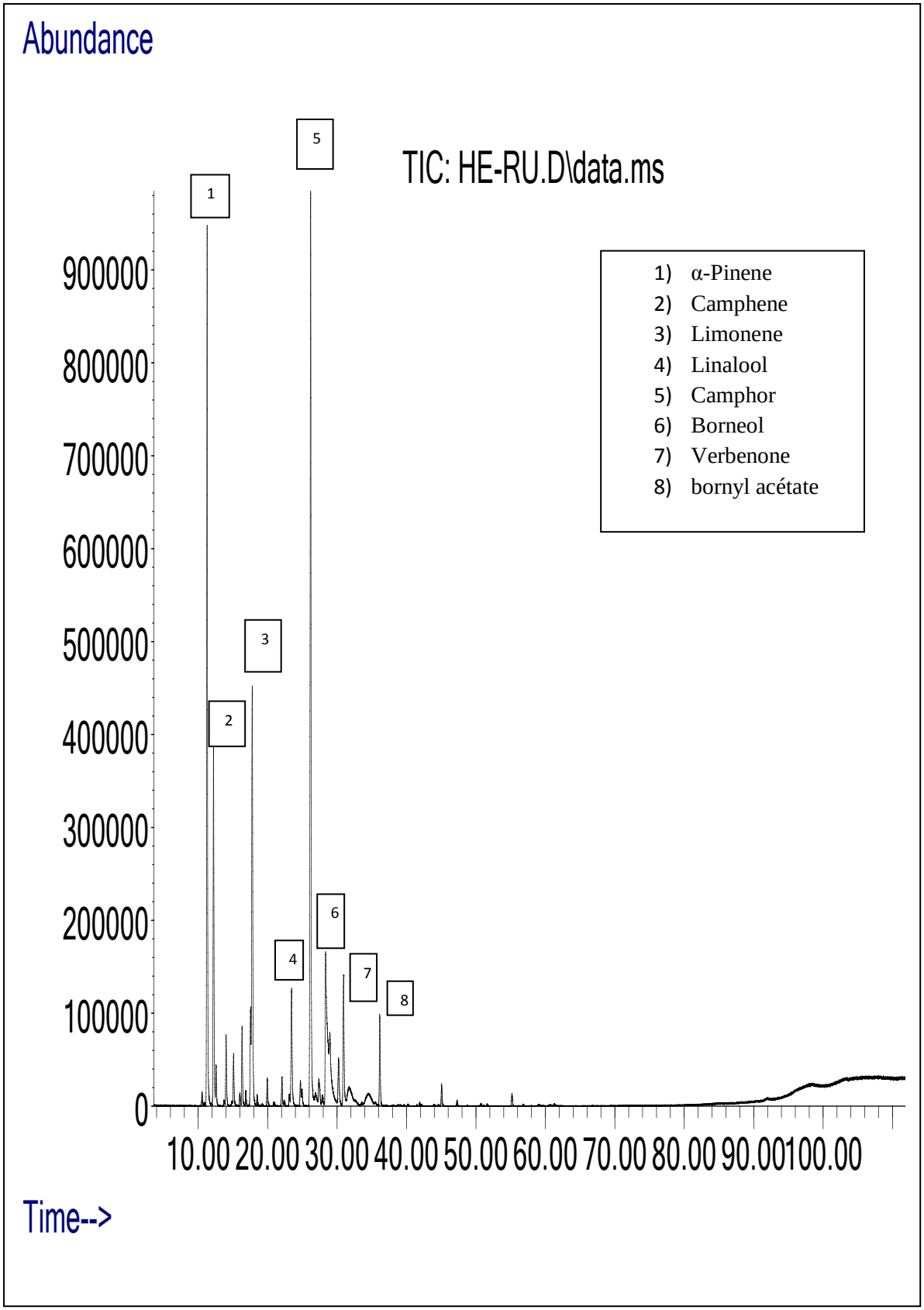


Figure III.11 : Chromatogramme de l'huile essentielle de romarin obtenue par HD-US.

Tableau III.3 : Composition de l'huile essentielle de Romarin obtenues par HD-US.

RT	KI	%	Composé
10,55	**922**	0.2643	Tricyclene
10,86	**926**	0.0446	alpha-thujene
11,28	**933**	18.0044	α-Pinene
12,43	**951**	7.673	Camphene
12,56	**953**	0.8489	thuja-2,4(10)-diene
13,73	**971**	0.0926	3,7,7-Trimethylcyclohepta-1,3,5-triene
14,01	**976**	1.5490	β-Pinene
14,83	**989**	0.0858	octanone 2
15,08	**993**	1.1189	β-Myrcene
15,99	**1006**	0.2866	α-Phellandrene
16,3	**1010**	1.7539	Carene<delta-3->
16,83	**1018**	0.2658	α-Terpinene
17,53	**1027**	2.0429	para- cymene
17,76	**1030**	11.1484	Limonene
18,48	**1040**	0.2095	Ocimene<(Z)-beta->
19,24	**1051**	0.000932	Ocimene<(E)-beta->
19,94	**1060**	0.6112	γ-Terpinene
22,05	**1089**	0.6073	Terpinolene
22,39	**1094**	0.0192	para- cymenene
23,13	**1104**	0.1096	Filifolone
24,43	**1122**	3.0805	Linalool
24,71	**1126**	0.5674	Chrysanthenone
24,92	**1129**	0.4350	α-Campholenal
26,17	**1146**	22.7172	Camphor
28,76	**1181**	8.5356	Borneol
30,2	**1201**	1.3077	4 –Terpineol
30,91	**1211**	3.3645	Verbenone
34,03	**1255**	0.0457	cis-myrtanol
36,13	**1285**	1.8837	bornyl acétate
45,03	**1420**	0.481	(E)-Caryophyllene

47,24	**1455**	0.0816	α-Humulene
55,19	**1587**	0.2914	Caryophylleneoxide

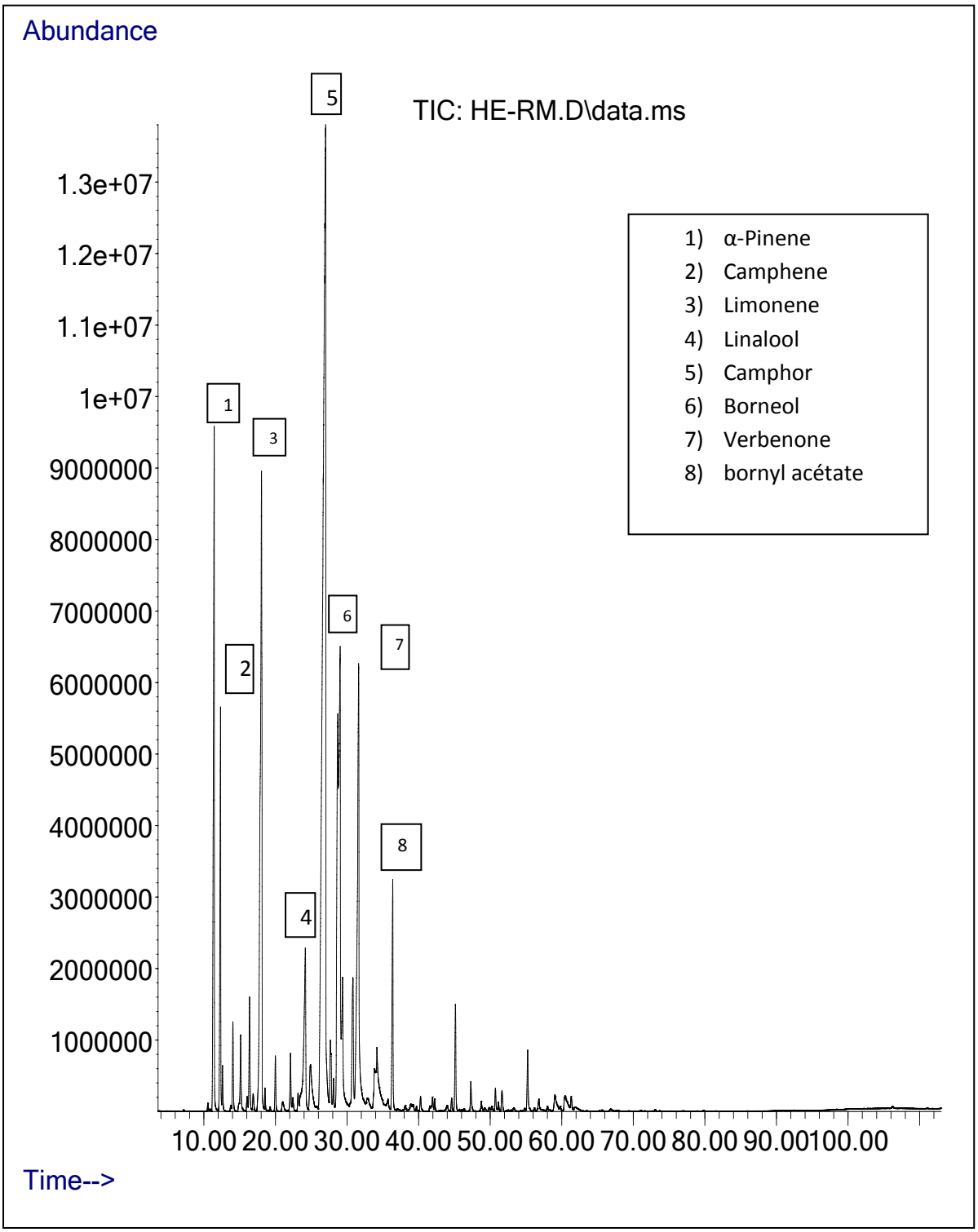


Figure III.12 : Chromatogramme d'huile essentielle de romarin par HD-MO.

Tableau III.4 : Composition de l'huile essentielle de Romarin obtenue par HD-MO.

RT	KI	%	Composé
5,32	**804**	0.0021	Hexanal
7,16	**850**	0.0118	trans-Hex-2-enal
10,56	**922**	0.0781	Tricyclene
10,89	**927**	0.0244	alpha-thujene
11,45	**936**	6.731	α-Pinene
12,33	**950**	3.3104	Camphene
12,6	**954**	0.3372	thuja-2,4(10)-diene
13,75	**972**	0.0628	3,7,7-Trimethylcyclohepta-1,3,5-triene
14,1	**977**	0.7525	β-Pinene
15,14	**994**	0.7558	β-Myrcene
15,63	**1001**	0.0097	Carene<delta-2->
16,04	**1007**	0.1689	α-Phellandrene
16,38	**1011**	1.0637	Carene<delta-3->
16,9	**1019**	0.2040	α-Terpinene
18,06	**1034**	10.7110	Limonene
18,56	**1041**	0.1925	Ocimene<(Z)-beta->
19,25	**1051**	0.0507	Ocimene<(E)-beta->
19,99	**1061**	0.4682	γ-Terpinene
21,06	**1076**	0.0862	cis-sabinene hydrate
22,11	**1090**	0.5283	Terpinolene
22,43	**1095**	0.1629	para- cymenene
23,16	**1105**	0.1806	Filifolone
24,18	**1118**	3.3074	Linalool
24,89	**1128**	1.2191	Chrysanthenone
27,021	**1157**	30.7563	Camphor
27,76	**1167**	0.3334	trans-Pinocamphone
29,04	**1185**	12.7652	Borneol
29,34	**1189**	2.1434	Terpinen-4-ol (p-Menth-1-en-4-ol)
30,81	**1209**	1.9374	α-Terpineol(p-Menth-1-en-8-ol)
31,61	**1221**	8.3172	Verbenone

32,9	**1239**	0.3679	cis carveol
34,05	**1256**	0.1207	cis-myrtanol
35,7	**1279**	0.0852	cavone oxyde
36,39	**1289**	2.2292	bornyl acétate
38,13	**1315**	0.0958	Thymol
38,6	**1322**	0.2016	Carvacrol
40,27	**1347**	0.1664	Piperitenone
40,9	**1357**	0.0004	Citronellylacetate
42,24	**1377**	0.1228	α-Copaene
44,6	**1413**	0.1391	Methyleugénol
45,16	**1422**	1.0444	(E)-Caryophyllene
45,68	**1430**	0.0234	β-copaene
46,06	**1436**	0.0218	trans-α-Bergamotene
46,33	**1441**	0.0261	β-Gurjunene
47,3	**1456**	0.3097	α-Humulene
49,041	**1484**	0.0008	γ-Muurolene
49,23	**1487**	0.0384	γ-Curcumene
50,7	**1511**	0.2335	ß-bisabolene
51,14	**1519**	0.0973	γ-Cadinene
51,66	**1527**	0.2406	δ-Cadinene
55,19	**1587**	0.6449	Caryophylleneoxide
57,98	**1636**	0.0331	epi-cubenol
59,04	**1655**	0.1385	α-Cadinol
61,32	**1695**	0.203	α-bisabolol

L’identification des pics a atteint les taux de 94,0371, 89,528132 et 93,2567% respectivement pour les méthodes HD, HD-US et HD-MO avec un total de 60 composés identifiés pour HD, 35 pour HD-US et 55 pour HD-MO.

L'HE isolée des feuilles de romarin, soit par HD, HD-US ou HD-MO contient le même élément dominant : camphor, qui est le composant principal abondant dans l'HE de *Rosmarinus officinalis* L. avec des teneurs de 34.0778, 22.7172 et 30.7563% respectivement pour HD, HD-US et HD-MO.

L’alpha-pinène existe avec des teneurs différentes, pour les trois procédés d’extraction : 11.2567% par la méthode HD, 18.0044% par la méthode HD-US et 6.731% par la méthode HD-MO. Une plus grande proportion des composés oxygénés a été détectée dans les HEs issues des deux méthodes HD-US et HD-MO, due à la diminution des effets thermiques et hydrolytiques par rapport à la méthode HD.

Les autres composés volatils actifs identifiés, dans ces HEs sont : la verbénone, le camphène et borneol (figure III.13), mais leur proportion dépend également, du procédé de l'extraction utilisé.

Des taux de composés oxygénés légèrement plus grands sont présents dans l’HE de romarin isolée par le procédé HD-US et HD-MO (figure III.14) .Les hydrocarbures monoterpéniques sont présents en quantités équivalentes dans les trois HEs.

Les hydrocarbures monoterpéniques ont une importance commerciale moins marquée que les composés oxygénés par suite de la meilleure contribution de ces derniers à l'odeur de l'HE. Les composés oxygénés sont très odorants ce qui les rend plus précieux **[76- 81].**

La plus grande proportion de composés oxygénés a été détectée dans les HEs issues des deux procédés HD-US et HD-MO, cela peut être due à la diminution des effets thermiques et hydrolytiques par rapport au procédé HD.

Les autres composés volatils actifs identifiés, dans ces HEs sont : la verbénone, le camphène et borneol (figure III.13), leur proportion dépend du procédé de l'extraction utilisé.

D’après la figure III.14**,** les composés oxygénés, qui ont un moment dipolaire élevé vont interagir plus vigoureusement avec les irradiations micro-ondes et seront extraits plus facilement relativement aux composés aromatiques qui ont des moments dipolaires faibles (comme les hydrocarbures monoterpéniques).

Plusieurs études récentes ont montré que la variabilité de la composition et du rendement en HE de romarin est due à des facteurs intrinsèques (génétique, sous-espèces et âge de la plantation), à des facteurs extrinsèques comme le climat et les conditions de culture (origine géographique) ou à la méthode de l'extraction.

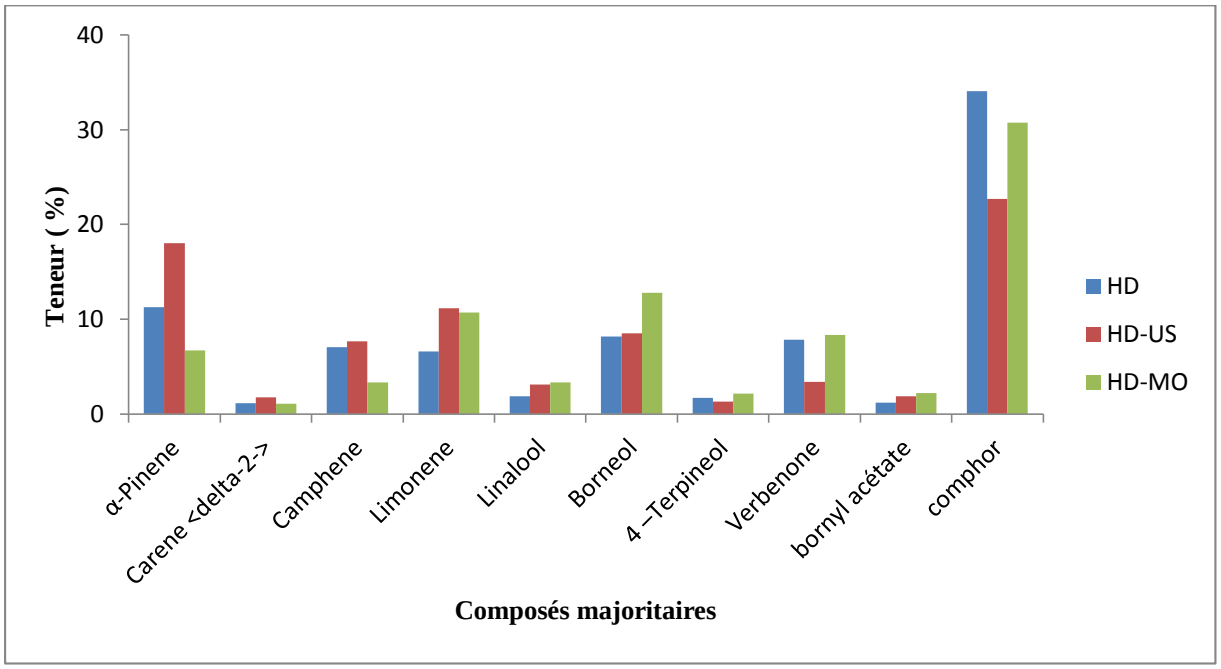


Figure III.13 : Teneur des principaux composes majoritaires selon les trois procèdes de l'extraction (HD, HD-US et HD-MO).

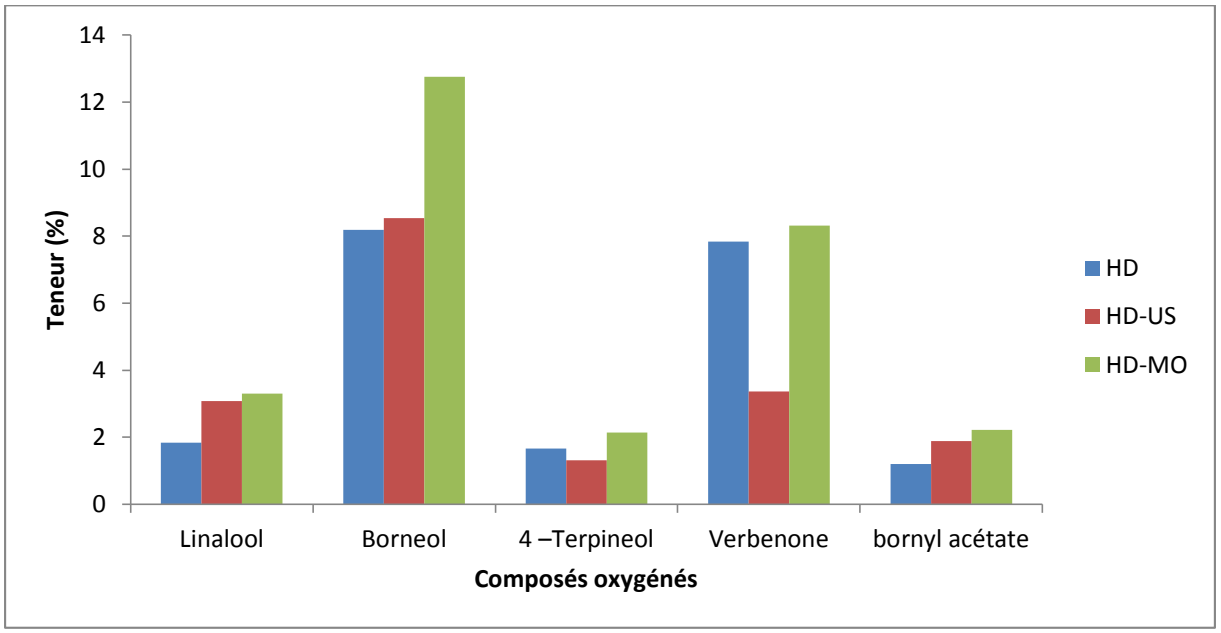


Figure III.14: Teneur des principaux composés oxygénés selon les trois procédés de l'extraction (HD, HD-US et HD-MO).

Varela (2009) **[82]**, a étudié 87 populations spontanées de *R. officinalis* collectées en Espagne et les a classées en prenant en considération la composition chimique de leurs HEs. Parmi tous les échantillons, trente-huit (38) d'entres eux obtenues par hydrodistillation ont une teneur élevée en 1,8 cinéole (> 24%) et un rendement en HE supérieur à 2% ; Six populations ont présenté un rapport 1,8 Cinéole / linalol élevé ; trois échantillons ont une teneur élevée en camphor, et seulement deux échantillons ont présenté des teneurs élevées en verbénone (≈ 5%).

Özcan et Chalchat (2008) **[83]**, ont étudié la composition de l'HE de romarin provenant de Turquie et ont identifié 20 composés, avec le para-cymène (44 %), le linalol (21%), le gamma-terpinène (17 %), le comphor (3,6 %), l'alpha-pinène (2,8 %), le 1,8 Cinéole (2,6 %) et le thymol (1,8 %) qui sont des composés majoritaires de l'HE extraite par hydrodistillation.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de *Taleb toudert* (2015) **[73]**, qui a révélé la richesse de *R. officinalis* en comphor, par contre les travaux de *Bousbia* (2011) **[75]** ont révélé que l'HE de *R. officinalis* comme un chémotype à alpha-pinène puisque ce dernier présente des teneurs assez élevées dépassant les 43 %.

III.6. Caractérisation des HEs de romarin

III.6.1.Constantes physico-chimique

Les constantes physico-chimiques (densité relative, indice de réfraction et pH) des HEs extraites par HD, HD-MO et HD-US sont déterminées selon la méthode standard AFNOR. Le Tableau III.5 regroupe ces résultats.

La comparaison de nos résultats à ceux de la norme NF ISO 1342 – Mars 2001 relative à l'HE de romarin *Rosmarinus officinalis* L. a montré que les HEs issues des trois (03) procédés de l'extraction (HD, HD-MO et HD-US) sont conformes à la norme ISO et qu'il n'y a pas de différence significative entre les constantes physico-chimiques des HEs obtenues par ces méthodes.

Tableau III.5 : Propriétés physico-chimiques des HEs de romarin extraite par les procédés HD, HD-MO et HD-US.

Propriétés physico-chimiques	HD	HD-MO	HD-US	Norme AFNOR*
Densité relative à 20°C d^{20}	0,917	0,907	0 ,907	0,907-0,920
Indice de réfraction à 20°C n^{20}	1,4700	1,468	1,4695	$+1.4640 \leq n^{20} \leq +1.4700$
pH	5	5	5	-

* Norme : NF ISO 1342 – Mars 2001.

III.6.2.Caractéristiques organoleptiques

Les résultats de l'évaluation sensorielle réalisée sur les HEs de romarin extraites par les procédés HD, HD-MO et HD-US sont présentés dans le tableau III.6. Les trois huiles extraites sont liquides à température ambiante, elles présentent la même couleur jaune pâle, leur senteur présente une nuance citronnée. Ce caractère commun est dû à la présence des hydrocarbures terpéniques tels que les pinènes (α et β), le myrcène et le limonène qui ensemble, offrent une teneur globale dépassant la moitié de la composition totale de l'HE. Cette nuance est renforcée par la présence du linalool qui couvre un taux dépassant les 2% pour les trois huiles.

L'huile essentielle issue des méthodes HD-MO et HD-US possède une note olfactive proche de l'arôme originel du romarin avec une note fraîche et une odeur ferme d'herbes aromatiques.

Tableau III.6: Evaluation sensorielle des huiles essentielles de romarin extraites par HD,HD-MO et HD-US.

Evaluation sensorielle	**HD-MO, HD-US.**	**HD**
Couleur	Jaune pâle	Jaune pâle
Odeur	Fraîche, légèrement camphrée avec une légère note citronnée, odeur ferme d'herbes aromatiques fraiches	Légèrement camphrée et rappelant l'odeur des *Citrus*, odeur de bouillie, différente de celle provenant des fruits frais
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile

III.7.Activité antibactérienne

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des HEs, nous avons utilisé la technique de l'aromatogramme qui est identique à celle de l'antibiogramme pour les antibiotiques. C'est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antimicrobien des HEs et, en pratique, on utilise un milieu d'ensemencement solide du fait qu'il est le plus simple et le plus reproductible. Pour cela, après avoir ensemencé le milieu de culture avec la suspension microbienne, et en déposant un disque stérile imprégné d'HE, on incube les boites de Pétri dans les conditions prédéfinies. Après un temps de latence de 24 heures pour les bactéries, le diamètre d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Une zone claire, nommée aussi zone d'inhibition de la croissance microbienne, montre la destruction des germes et donne une indication précise sur l'activité antibactérienne des HEs utilisées. Les résultats des mesures sont regroupés dans le Tableau III.7 et illustrés par les figures III. (15-18).

Le choix des bactéries a été porté sur quatre (04) souches (*S. aureus, Pseudomonas sp, M.R.S.A* et *E. coli*), fréquentes en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes (Gram positif et Gram négatif). L'efficacité des produits testés ainsi que leur mode de pénétration dans la bactérie sont différents.

Ces espèces bactériennes sont souvent responsables d'infections nosocomiales qui constituent un problème majeur de santé publique. L'émergence de la multi résistance chez ces bactéries est une des principales causes d'échec thérapeutique.

Tableau III.7 : Diamètre des zones d'inhibition en mm pour les micro-organismes testés.

Micro-organismes testés	**N° ATCC**	**Gram**	**HD**	**HD-US**	**HD-MO**
Pseudomonas sp	683	-	7±0,5	7±0,5	7±0,5
Escherichia coli	25922	-	11±0,5	10±0,5	10±0,5
M.R.S.A	43300	+	17±0,5	17±0,5	16±0,5
Staphylococcus aureus	25923	+	6±0,5	6±0,5	6±0,5

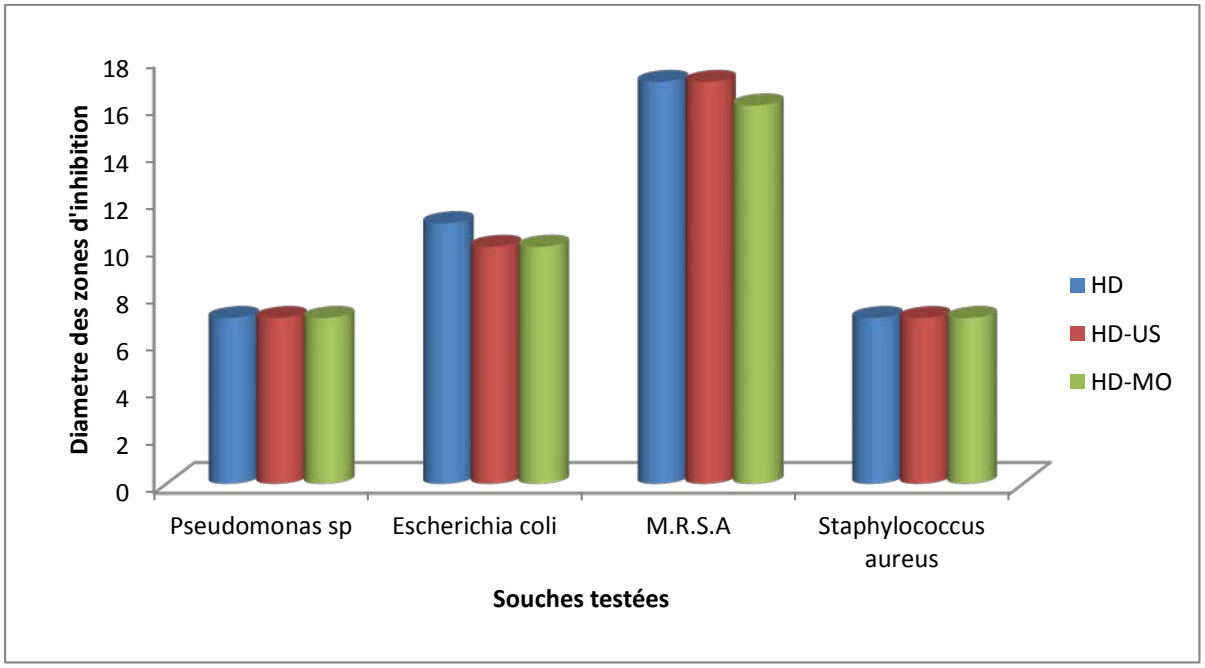


Figure III.15 : Activités antimicrobiennes des HEs de romarin obtenues par les différents procédés

Une classification des HEs en rapport avec leur spectre d'activité antibactérienne peut être établie en fonction de l'importance du halo d'inhibition. Une échelle de mesure de l'activité antibactérienne des HEs fut émise par *Meena et Sethi* (1994) **[84],** en ordonnant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 04 classes :

- Fortement inhibitrice lorsque : Ø ≥ 28 mm de la zone d'inhibition ;
- Modérément inhibitrice lorsque : 28 mm > Ø > 16 mm de la zone d'inhibition ;
- Légèrement inhibitrice lorsque : 16 mm > Ø > 10 mm de la zone d'inhibition ;
- Non inhibitrice lorsque : Ø < 10 mm de la zone d'inhibition.

Dans la littérature, les HEs les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et leurs modes d'action sur les souches microbiennes sont: Thym, Origan, Sarriette, Lavande, Menthe, Romarin, Sauge et Hysope.

Zaika (1988)**[85**] et *Hussein* (1990)**[86],** ont montré que les bactéries à Gram positifs résistent mieux aux HEs, que les bactéries à Gram négatifs, ce qui est contraire aux résultats trouvés par *Farbood* (1976)**[87]**, *Smith-Palmer* (1998)**[88]**, *Mangena et Muyima* (1999)**[89]**, *Inouye*(2001)**[90]**, auteurs qui ont révélé que les bactéries à Gram positifs sont généralement plus sensibles aux HEs que celles à Gram négatifs.

Chao (2000**)[91]**, ont expliqué que les bactéries à Gram négatifs sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopoly-saccharides et de protéines. Cette structure peut empêcher la prise d'huiles ou protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis de ces huiles.

Nos résultats sur l'activité antibactérienne des HEs du romarin concordent avec ceux obtenus par *Lograda et ses collaborateurs* (2014**) [92]**. Dans cette étude, les auteurs ont testé l'huile aromatique du romarin provenant de plusieurs régions de l'Est Algérien Boutaleb (Sétif), Bibans (Bourdj Bou-Arriridj), Agmeroual et N'gaous (Batna), et Boussaâda (M'sila)). Les diamètres des zones d'inhibition obtenus n'ont pas dépassé les 20 mm, ils se rapprochent de nos résultats et reflètent le potentiel antibactérien modeste voire faible de l'HE de *R.officinalis*. Par contre, *Djeddi S.* et ses collègues (2007**)[93]** ont signalé la forte activité antibactérienne de l'HE du *R. officinalis* issu du Park national d'El Hamma (Alger).

Dans ce travail, les HEs testées sur les différentes bactéries à Gram positifs et négatifs ont montré une action variable. L'action de nos huiles extraites par HD, HD-MO et HD-US, a montré que les HEs de romarin, semblaient être Modérément inhibitrice contre *M.R.S.A*, légèrement inhibitrice contre *Escherichia coli* avec une prédominance du l'HE extraite par Hydrodistillation qui a révélé les meilleurs résultats, et non inhibitrice contre *Pseudomonas sp* et *Staphylococcus aureus.*

L'activité antimicrobienne des HEs est reliée à la nature de ses constituants majoritaires. En effet, les HEs avec des teneurs élevées en hydrocarbures monoterpéniques sont rapportés être très actives vis-à-vis des microorganismes. Des hypothèses favorisant des effets nuisibles sur l'intégrité de la membrane bactérienne ont été émises par *Muller* et *Del Moral* (1966) **[94]**.Cependant, la rupture de la membrane par des terpènes a été montrée sur des bactéries à Gram positifs et négatifs *Helander* (1998**)[95]** ; *Lis-Balchin*(1998**)[96]** ; *Griffin* (1999**) [97]**; *Ultee* (1998**)[98]**, *Mann* (2000**)[99].**

Par ailleurs, le mode d'action des composants mineurs des HEs est inconnu. *Delaquis* (2002**) [100]**, suggèrent que ces composés induisent des différences dans l'enveloppe des cellules des bactéries à Gram positifs. Leur action est fortement limitée dans les bactéries à Gram négatifs.

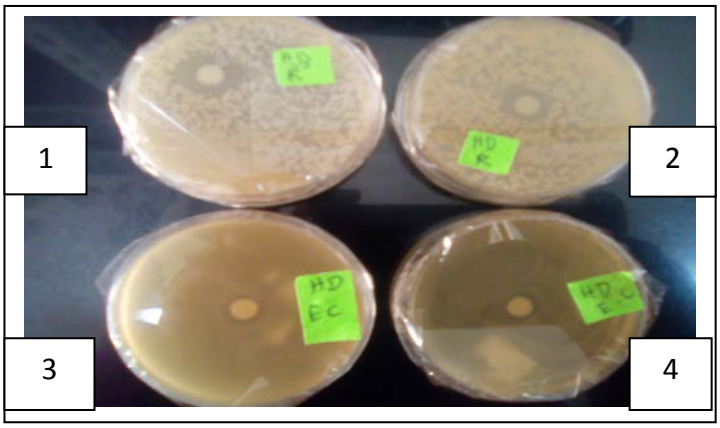


Figure III.16 : Zone d'inhibition de la croissance microbienne(HD).

1.***M.R.S.A,2.Escherichia coli,3.Pseudomonas sp,4. Staphylococcus aureus***

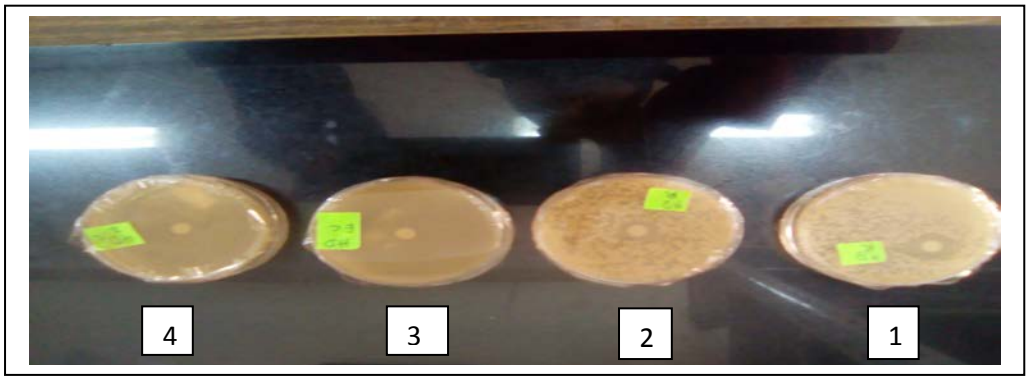


Figure III.17 : Zone d'inhibition de la croissance microbienne (HD-US).

1. ***M.R.S.A, 2. Escherichia coli, 3.Pseudomonas sp, 4. Staphylococcus aureus.***

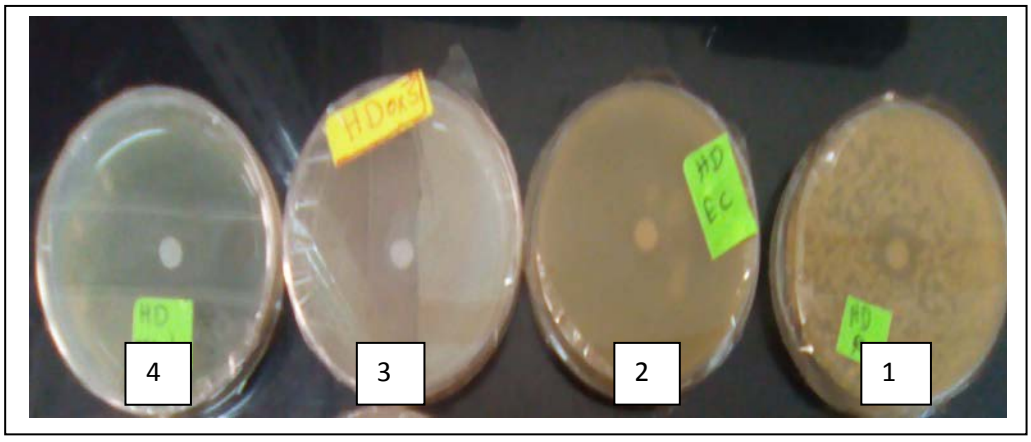


Figure III.18 : Zone d'inhibition de la croissance microbienne (HD-US).

1. ***M.R.S.A, 2. Escherichia coli, 3.Pseudomonas sp, 4. Staphylococcus aureus.***

III.8 Activité antioxydante des HEs de Romarin

Le DPPH est un radical libre nous permettant de déterminer le potentiel de piégeage de nos HEs grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations **[101].**L'activité anti radicalaire a été estimée spectrophotométriquement en suivant la réduction du DPPH à 517nm.

La figure III.19 illustre l'efficacité d'HE extraite par la méthode de HD et celle du BHT à piéger le radical DPPH, traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

Le balayage du pourcentage de l'inhibition d'HE (0,05-1mg/ml^{-1}) est de (13,13-61,68%).

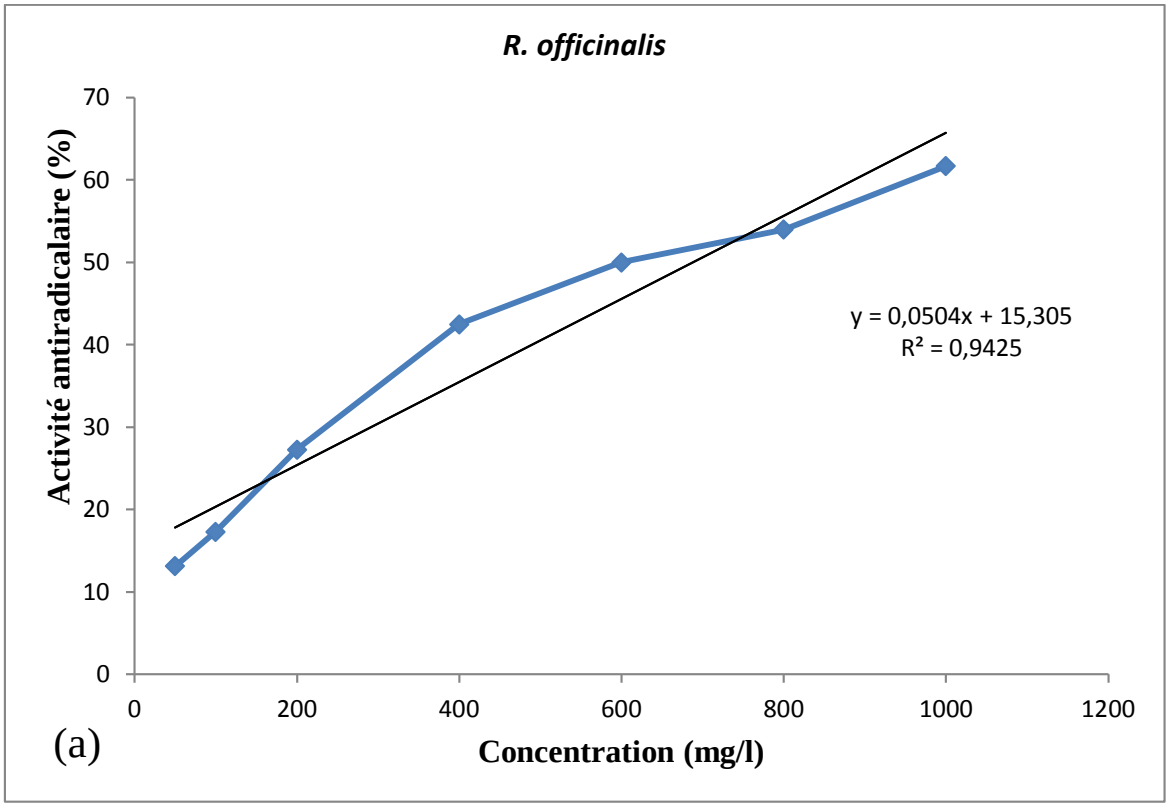
A partir des courbes des taux d'inhibition, nous avons pu déduire graphiquement les valeurs d'IC50 du BHT et d'HE.

Dans la présente étude, le potentiel antiradicalaire global d'huile essentielle testée a été inférieur à celui du BHT avec un IC50 de 694mg/ml.

La valeur de L'IC50 est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition I%) d'un composé, car elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est appréciable.

Nos résultats rejoignent ceux de *Wang* **[102]** qui a constaté l'efficacité antiradicalaire de celle-ci avec un taux d'inhibition de 62,45% ± 3,42%.

D'une manière générale, l'huile essentielle testée issu de la région d'Alger a manifesté un potentiel antioxydant modéré en employant la méthode de piégeage du radical libre DPPH.



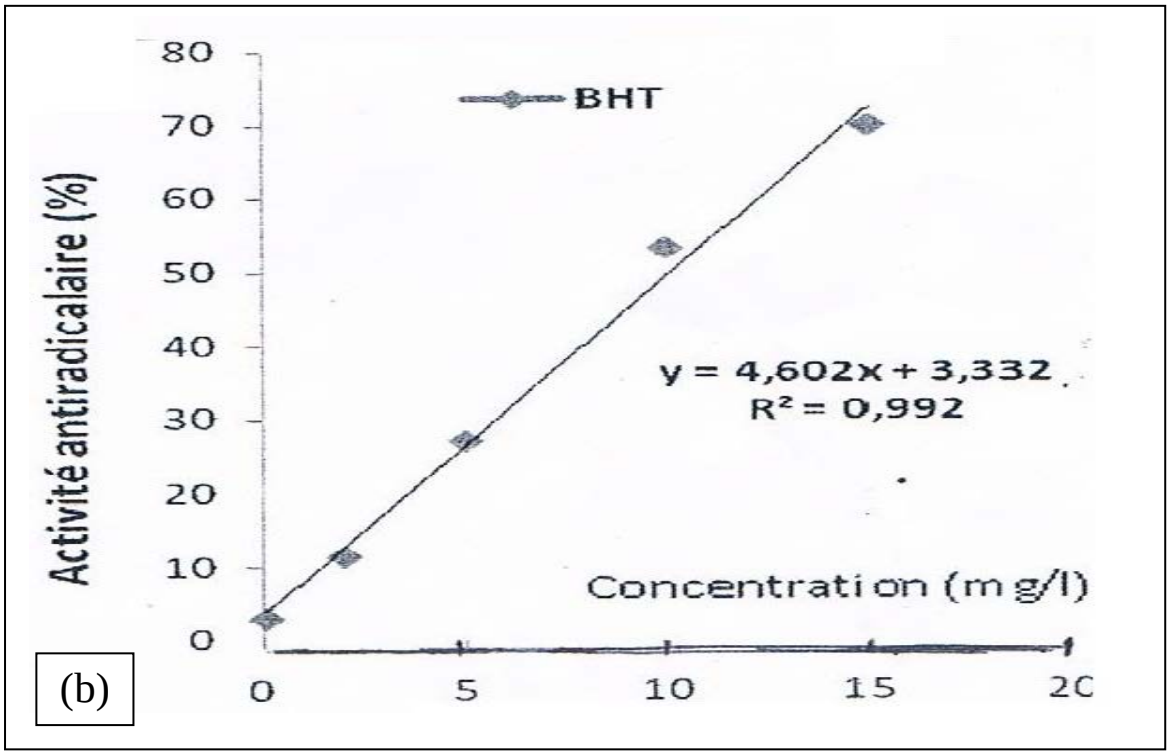


Figure III.19 : Pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations en HE de *Rosmarinus officinalis* L. (a) et de BHT (b) (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

Le potentiel antioxydant est attribué à la composition chimique des HEs. Cependant, il peut être du à l'un des constituants majoritaires ou à d'autres constituants minoritaires ou également à une synergie entre eux **[102].**

L'HE testée contient des monoterpènes à des taux assez élevés. Dans une étude antérieure, les HEs avec une prédominance monoterpènique ont montré une activité assez modeste **[103]**.

Par contre, les travaux de *Tepe* (2004**) [104]**, ont démontré une grande activité antioxydante des HEs contenant des monoterpènes et / ou des sesquiterpènes oxygénés. Ainsi une corrélation existe entre l'activité antioxydante des HEs et leur teneur en monoterpènes oxygénés.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les objectifs de cette étude étaient la caractérisation et la valorisation des huiles essentielles de romarin, obtenues par trois procédés ; l'hydrodistillation (HD), hydrodistillation assistée par ultrasons (HD-US) et l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HD-MO).

Pour la caractérisation de la matière végétale, des observations des coupes histologiques des feuilles de la plante étudiée sont réalisées par MEB afin d'identifier et de localiser les structures responsables de la production et du stockage des huiles essentielles. Les résultats ont révélé que cette plante est caractérisée par des trichomes glandulaires (poils sécréteurs) spécifiques à cette famille.

Le rendement en l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. obtenue par hydrodistillation (HD), est évalué à1,1250% pour un temps d'extractionde 120minutes et l'analyse par CG/SM a permis d'identifier 60 composés dont le camphor (34.0778%), le α-Pinene(11.2567%),le Borneol(8.1905%), le camphene (7.0470%),le Verbenone (7.8421%),et le Limonene (6.6014%) sont les composés majoritaires.

Le procédé de l'hydrodistillation assistée par ultrasons (HD-US) a donné un rendement de 0,8070%pour une durée de l'extraction de 50minutes, l'huile obtenu est constituée de 35 composants dont le camphor (22.7172%), le α-Pinene (18.0044%), le Borneol (8.5356%), le camphene (7.673%), le Verbenone (3.3645%),et le Limonene (11.1484%) sont les composés majoritaires.

L'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. obtenues par hydrodistillation assisté par micro-ondes, est avec un rendement de 0,9831%pour une durée de 25minutes. Elle contient 55 substances dominées par la présence de camphor (30.7563%), Borneol(12.7652%),Limonene (10.7110%), Verbenone (8.3172%), α-Pinene(6.731%)et du camphene (3.3104%).

Ces résultats ont pu mettre en évidence la prédominance des composés monoterpèniques des trois huiles essentielles extraites.

Les trois huiles essentielles extraites par les trois différents procédés, ont présenté un pouvoir inhibiteur modéré contre deux souches bactériennes testées (*M.R.S.A* et *Escherichia*

coli), une meilleure efficacité pour l'huile essentielle obtenue par Hydrodistillationest observée à l'exception pour les souches *Pseudomonas sp* et *Staphylococcus aureus.*

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* a été réalisée en employant la méthode de test du piégeage du radical libre DPPH, qui cible un mécanisme d'action des antioxydants.

Le test a montré que l'huile essentielle de romarin testée a un potentiel anti radicalaire appréciable avec un IC 50 de 694mg/l

Les deux procédés de l'extraction assistés à l'hydrodistillation conventionnelle proposés, ont montré une réduction dans la durée de l'extraction tout en gardant la qualité du produit fini obtenu.

Ce travail est une contribution à l'application des procédés propres dans l'extraction qui consomment moins d'énergie et qui sont favorables pour l'environnement.

[1] : Lardy J.M et Haberkorn V, l'aromathérapie et extraction des huiles essentielles, revue de kinesithérapie; 2007.

[2] : Lucchesi M. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes, conception et application à l'extraction des huiles essentielles, thèse en Doctorat en science, discipline : chimie. Université de la Réunion.faculté des sciences et technologie ; 2005.

[3] : Fouche J.G Marquer A et Hambuckers, les plantes au médicament,observatoire des plantes Sart-Tilman ; 2000.

[4] : Zhiri. A.Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré.Nutranews ; Science, Nutrition. Prévention et santé ,2001.

[5] : Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2éme Edition de vuef, hongkong; 2001.

[6] : Funk et Wagnalls: Encyclopédie britannique Funk &Wagnalls. URL : http://www.Funkandwagnalls.com.2004.

[7]: AFNOR, Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthodes d'analyse. 2000.

.

[8] : VerboisS., Huiles Essentielles et Parfums qui Guérissent et qui Relaxent, La Voie De l'Ayurveda, 3eme Edition Trajectoire ; 2001.

[9]: McGraw-Hill, Encyclopedia of Science and Technology, 10th Edition; 2007.

[10] : Bruneton J.: Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème édition Lavoisier, 1993.

[11] : Charpentier B, Hamou.LorleacHF.Harlay A,Ridoux L et Chanselle S .Guide du préparateur en pharmacie. 3eme Edition Elsevier Masson;2008.

[12]: Bakkali F.,AverbeckS.,Averbek D. et IdaoumarM.Biological effects of essential oil food and chemical toxycology;2008 .

[13] : Boutlelis A. Cours de phytochimie 2ème année Master. Université El Chahid Hama Lakhdar,EL OUED ; 2015.

[14] : Nait achour K.Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *MatricariaChamomilla(*Asteraceae) Etude de la phase acétate d'éthyl, Magister en Chimie Organique Option : Chimie structurale-Synthèse organique et Substances Naturelles ; Tizi ouzou. 2012.

[15] : Ouibrahim A. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites de citrus. Application sur la sardine. Magister en biologie. Option : biochimie appliquée et biotechnologie ; 2011.

[16] : Baba-Aïssa F. Encyclopédie des Plantes Utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb,Substances Végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Algérie ; 2000.

[17] : Kraft K., Hobbs C. Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme, Stuttgart, New York. ; 2004.

[18] : Belaïche, P.Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme. Tome1. Ed. Maloine S.A., Paris, 1979.

[19] : Padrini F., Lucheroni M. T. Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Ed. De Vecchi, Paris, 1996.

[20] :Gérin M .Solvants et Prévention : Nouvelles Perspectives. *In*: Gérin M. (Ed) Solvants industriels: Santé, Sécurité, Substitution. Masson, Paris. 2002.

[21]: Leonelli C., Veronesi P., Cravotto G. Microwave-Assisted Extraction: An Introduction to Dielectric Heating. Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice. Springer.2013

[22] : Ferhat M.A., Meklati B. Y., ChematF.Citrus d'Algérie, Les Huiles Essentielles et leurs Procédés d'Extractions. O.P.U. Algérie ; 2010.

[23]: Pangarkar V.G. Microdistillation,Thermo- microdistillation and Molecular Distillation Techniques. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre For Science and High Technology, Trieste, Italy. 2008.

[24]: Leone A., Tamborrino A., Romaniello R., Zagaria R., SabellaE.Specification and Implementation of a Continuous Microwave-Assisted System for Paste Malaxation in an Olive Oil Extraction Plant, Biosystems Engineering, 2014.

[25] : Dahmoune F., Nayak B., Moussi K., Remini H., Madani K. Optimisation of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from *Myrtuscommunis*L. leaves, Food Chemistry, 2015.

[26] : Draye M., Estager J., Malacria M., Goddard J.-P., Ollivier C. SonochimieOrganique(K1250). Editions Techniques de l'Ingénieur, France ; 2009.

[27]: Lancaster M. Green Chemistry: An Introductory Text. The Royal Society of Chemistry. 2002.

[28] : Wang L., Weller C.L.Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants, Trends in Food Science and Technology, 2006.

[29]: Goula A.M. Ultrasound-Assisted Extraction of Pomegranate Seed Oil – Kinetic Modeling, Journal of Food Engineering, 2013.

[30] : Both S., Chemat F., Strube J. Extraction of Polyphenols from Black Tea - Conventional and Ultrasound Assisted Extraction, UltrasonicsSonochemistry, 2014.

[31] : Penche P.I. Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs àpartir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. ThèsedeDoctorat,Université de Toulouse, France ; 2010.

[32] : HandaS.AnOverview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants.*In*: Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D. (Eds) Extraction Technologiesfor Medicinal and Aromatic Plants. International Centre For Science and High Technology,Trieste, 2008.

[33]: Van den doolH. and Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.J. chromatogr .1963.

[34]: Beirão A. Bernardo-Gil MG**.,**Antioxidants from Lavandulaluisieri. 2thMercosur Congress on Chemical Engineering. Portugal. 2006.

[35] : Madhavi DL., Deshpande SS. &Salunkhe DK**.,** Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York.1996.

[36]: Kohen R., Nyska A, Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena,antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. Toxicologic Pathology. 2002.

[37]: Hussain AI**.,** Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. Thése de Doctorat. Pakistan. 2009.

[38]: Cox SD., Mann CM., Markham JL., Bell HC., Gustafson JE., Warmington JR. And Wyllie SG.The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleucaalternifolia(tea tree oil).Journal of Applied Microbiology. 2000.

[39]: Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. Int. J. Food Microbiol. 2004.

[40] : GuinoiseauE.Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation,identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option :Biochimie- Biologie moléculaire, France.2010.

[41] : Wendakoon, C. N. Sakaguchi, M.Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacteraerogenesby active components in spices. J. of Food Protection.1995.

[42] : Tsuchiya, H., Sato, M. Miyazaki, T. Fujiwara, S., Tanigaki, S.Ohyama, M., Tanaka, T. Linuma, M.Comparative study on the antibacterial activity of phytochemicalflavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J.Ethnopharmacol. 1996.

[43] : Daroui-MokaddemH.Etudephytochimique et biologique des especes : Eucalyptusglobulus(Myrtaceae), Smyrniumolusatrum(Apiaceae), Asteriscusmaritimuset Chrysanthemumtrifurcatum(Asterarceae). Thèse de Doctorat. Option : Biochimie applique.UniversitéBadji-Mokhtar, Annaba ; 2011.

[44]: Mason TL. Wasserman BP. Inactivation of red beet beta-glucan synthesis bynative and oxidized phenolic compounds.Phytochemistry.1987.

[45]: Kurita, N., Koike, **S.,** Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. Agric. Bil. Chem. **.**1982.

[46]: Johansen, C., Verheul Gram, L., Abee, T., Protamine-induced permeabilizationofcell envelopes of Gram-positive and Gram- negative Bacteria. App. Env. Micobio. 1997.

[47] :Kurita, N., myaji, M., kurane, R., Takahara, Y., Ichimara, K., Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds rom oils of higher plants. Agric. Boil.Chem.; 1979.

[48]: Baser KHC. andBuchbauer G., Handbook of Essential oils : Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.2010.

[49] : LaibI.,Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleursséches de LavandulaOfficinalis sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de Magister.Option : Technologie alimentaire. Université Mentouri Constantine. 2010.

[50] : Botineau M., Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed TEC&DOC, Lavoisier ; 2010.

[51] :Bärtels A., Guide des Plantes du Bassin méditerranéen. Editions Ulmer ; 1997.

[52] : Guinochet T., Phytosociologie, Ed. Masson, France;1973.

[53] : Garnier G., Bezanger-Beauquesne L., Debraux G., ResourcesMedicinales de la Flore Francaise, Tome II. Ed VigotFreres, Paris. 1961.

[54] : Quezel P. et Santa, S., La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Ed CNRS. Paris. 1963.

[55] : IseranP.,Encyclopédie des plantes médicinales, Tome 2. Ed. Larousse. Londres.2001.

[56]: Schauenberg O. and Paris F., Guide to Medicinal Plants. Keats, New Canaan, CT. 1977.

[57] : Belakhdar J., Pharmacopée marocaine traditionnelle, Paris, Édition Ibis Pres, 1997.

Chromatographische Charaketerisierung organischer Verbindunge.Teill: Rétention-Indices aliphatischer Halogenide ,Alkaloidne ,Ald-hyde und Ketone.1958.

[58]: Adams R.P, identification of essential oil components by gas chromatography/masse spectrometry Allurd publishing, Carol Stream, 1995.

[59]: Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel- Wissenschaftund –Technologie, 1995.

[60] : Skoog D.A., Holler F.J. et Nieman T.A. Principes d'analyse instrumentale. Edition De Boeck Diffusion s.a. 2003.

[61] : Tranchant J., Arpino P., Prévôt A., Serpinet J.,Vergnol A. et Witier P. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4ème édition.Edition Masson, 1995.

[62]: Van den dool H. et Kratz P.D., 1963 : A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. J. Chromato. A., Vol. 11, 1963.

[63]: Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. International Journal of Food Science and Technology. 2002.

[64]: Gulcin I., Mshvildadze V., Gepdiremen A. and Elias R., 2003. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. Planta Med. 70,2003.

[65] : Gopal Rao G., Risk Factors for the Spread of Antibiotic-Resistant Bacteria. Drugs .1999.

[66] : Grundmann H., Aires-de-Sousa M., Boyce J., Tiemersma E., 2006. Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. The Lancet. 2006.

[67] : Ngameni B., Kuete V., Simo IK., Mbaveng AT., Awoussong PK., Patnam R., Roy R., Ngadjui BT., Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from Dorstenia turbinata (Moraceae). S. Afr. J. Bot. 2009.

[68] : Bennadja S., Tlili Ait Kaki Y., Djahoudi A., Hadef Y. and Chefrour A., Antibiotic activity of the essential oil of laurel (Laurus nobilis L.) on eight bacterial strains. Journal of Life Sciences. 2013.

[69] : Bottega S. et Corsi G.: Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of Rosmarinus officinalis L. Botanical J. Linnean Soc. Vol. 132, 2000.

[70] : Deysson G.: Organisation et classification des plantes vasculaires Tome II. Edition SEDES & CDVI. 1978.

[71] : Marin M., Koko V., Duletić-laušević S., Marin P.D., Rančić D. et Dajic- stevanovic Z. : Glandular trichomes on the leaves of Rosmarinus officinalis: Morphology, stereology and histochemistry. S.African J. Botany, Vol. 72, 2006.

[72] : Wagner G.J., Wang E. et Shepherd R.W. : New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. Ann. Bota. Vol. 93 N°1, 2004.

[73] : Taleb T, Skaltsa HD., Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosmarinus officinalis from Algeria. Chem. Natural Comp. 2015.

[74] : Atik Bekkara F., Bousmaha L., Taleb Bendiab SA., Boti JB. et Casanova J., Composition chimique de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. Biologie & Santé. 2007.

[75] : Bousbia N. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires ; Docteur en Sciences de L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique ; Specialite : Chimie ; 2011.

[76] : Cheetham P.S.J.: Natural sources of flavours. Cité In : Taylor A.J. and Linforth R.S.T., 2010 : Food flavour technology. Edition Wiley-Blackwell, second edition ; 2010.

[77] : Phi N.T.L., TU N.T.M., Nishiyama C. et Sawamura M.: Characterisation of the odour volatile in Citrus aurantifolia Pers lime oil from vitenam. Dev. Food Sci. Vol. 43, 2006.

[78] : Smith-Palmer A., Stewart J. et Fyfe L.: Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. in Appl. Microbiol., Vol. 26, 1998.

[79] : Sawamura M., Thi minh tu N., Onishi Y., Ogawa E. et Choi h.S. Characteristic odor components of Citrus reticulata Blanco (ponkan) cold - pressed oïl. Biosci Biotechnol Biochem, Vol. 68, 2004.

[80] : Arctander S., 1994: Perfume and flavor chemicals (aroma chemicals). Allured Publishing corporation. Vol I et II. 2003.

[81] : Di giacomo A. et Di giacomo G.: Essential oil production, Chapiter 8. Cité In DUGO G. et DI GIACOMO A.: Citrus, the genus Citrus. Medicinal and aromatic plants – Industrial profiles. Edition CRC Taylor and Francis Group. 2002.

[82] : Varela F., Navarrete P., Cristobal R., Fanlo M., Melereo R., Sotomayor J.A., Jordan M.J., Cabot P., Sanchez De ron D., Calvo R. et Cases A., Variability in the chemical composition of wild Rosmarinus officinalis L. Acta Horti., Vol. 826, 2009 .

[83] : Özcan M. et Chalchat J.C.Essential oil of ocimum basilicum and ocimum minimum L. in Turkey.Journal of Food and Science ,Vol 20 ,N° 6 ; 2002.

[84] : Meena M.R. et Sethi V.: Antimicrobial activity of the essential oils from spices. J. Food Sci. and Tech. Mysore, Vol. 31, 1994 .

[85] : ZAIKA L.L.: Spices and herbs : their antimicrobial activity and its determination. J. Food Nutr. Vol. 9, 1988.

[86] : HUSSEIN A.M.S.: Antibacterial and antifungal activities of some Libyan aromatic plants. Planta Medica, Vol. 56, 1990.

[87] : Farbood M.I., Macneil J.H., et Ostovar K.: Effects of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. J. milk food technol., Vol. 39, 1976.

[88] : Smith-palmer A., Stewart J. et Fyfe L., 1998 : Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. in Appl. Microbiol., Vol. 26,

[89] : Mangena T. et Muyima N.Y.O.: Comparative evaluation of the antimicrobial actvities of Essential oils of Artemisia afra, Pteronia incana and Rsmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. Lett. Appl. Microb., Vol. 28, 1999.

[90] : Inouye S., Takizwa T. et Yamaguchi H.: Antibacterial Activity of Essential oils and Their Major Constituents Against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. J. Antimi. Chemo., Vol. 47, 2001.

[91] : Chao S.C., Young D.G. et Oberg G. J.: Screening for Inhibitory Actvity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. J. Essent. Oil Res., Vol. 12 (Sep/Oct 2000), 2000.

[92] : Lograda T., Ramdani M., Chalard P., Figueredo G Characteristics of essential oils of Rosmarinus officinalis from eastern Algeria. Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine. 2,2014.

[93] : Djeddi S., Bouchenah N., Settar I., Skaltsa HD. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosmarinus officinalis from Algeria. Chem. Natural Comp. 43(4) , 2007.

[94] : Muller C.H. et Del Moral R.: Soil toxicity induced by terpenes from Salvia leucophylla. Bull. Torrey Bot. Club, Vol. 93, 1966.

[95] : Helander I.M., Alakomi H.-L., Latva-kala K., Mattila-sandholm T., POL I., SMID E.J., GORRIS L.G.M. et WRIGHT A.V.: Charcterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. J. Agric. Food Chem., Vol. 46, 1998.

[96] : Lis-balchin M., Buchbauer G., Hirtenlehner T. et Resch M.: Antimicrobial Activity of Pelargonium Essential Oils added to a quiche filling as a model food system. Lett. in Appl. Microbiol., Vol. 27, 1998.

[97] : GRIFFIN S.G., WYLLIE, S.G.; MAKHAM J.L. et LEACH D.N.: The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour Fragrance J., Vol. 14, 1999.

[98] : ULTEE A., GORRIS L.G.M. et SMID E.J.: Bactericidal Activity of Carvacrol Towards the Food-borne Pathogen Bacillus cereus. J. Appl. Microbiol., Vol. 85, 1998.

[99] : MANN C.M., COX S.D. et MARHAM J.L.: The outer membrane of pseudomonas aeruginosa NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). Lett. in Appl. Microbial., Vol. 30, 2000.

[100] : Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. et Mazza G.: Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill , Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. Int. J. Food Microbiol., Vol. 74, 2002.

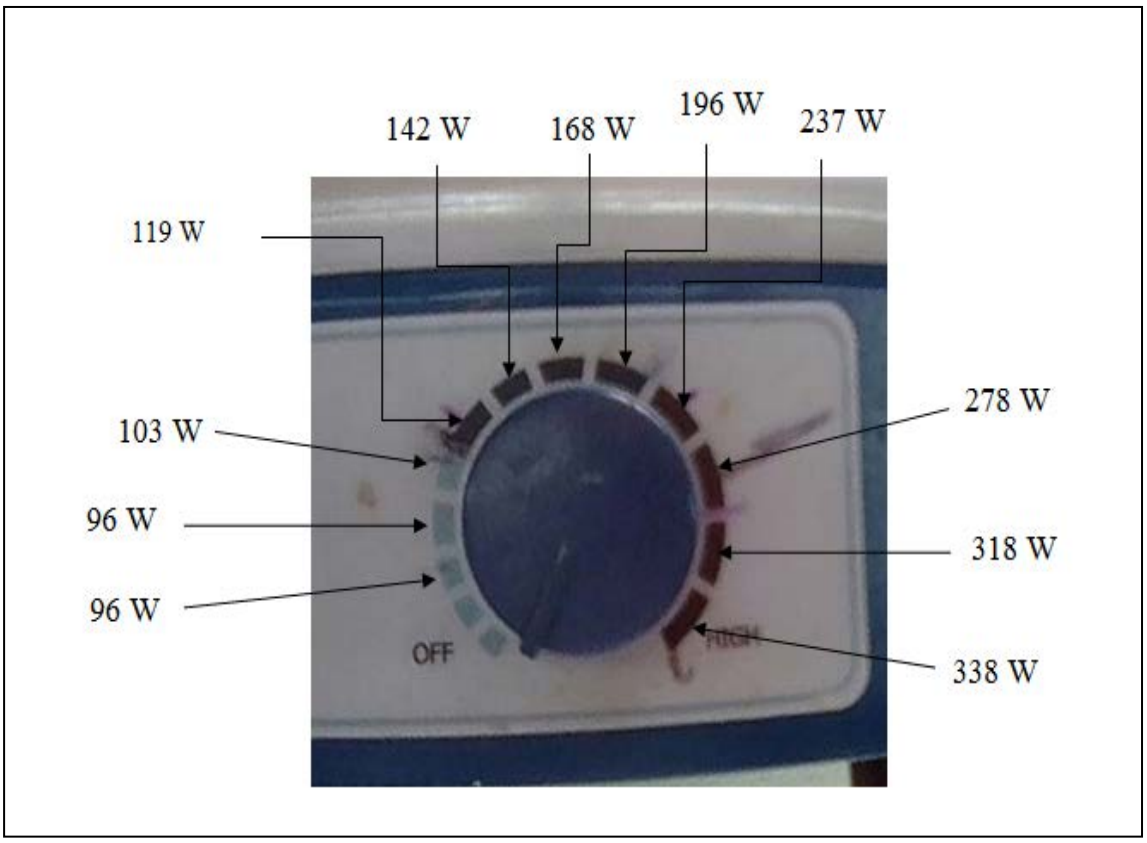
[101] : Maisuthisakul P., Suttajit M., Pongsawatmanit R., Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem. 100, 2007.

[102] : Wang W., Wu N., Zu YG. and Fu YJ., Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L oil compared to its main compounds. Food chemistry. 108 (3), 2008.

[103] : Gachkar L., Yadegari D., Rezaei MB., Taghizadeh M., Astaneh SA., Rasooli I., Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chemistry. 102, 2007.

[104] : Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissiou M. and Sokmen A., Antibacterial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha (Montbret et Aucher ex Benth.) and Salvia multicaulis p (Vahl). Food Chemistry. 84, 2004.

ANNEXES



Annexe 01 : l'étalonnage donnant la puissance de chauffage en fonction du débit du condensat.

Annexe 02 :

Tableau 01 : Influence de la durée d'extraction par HD sur le rendement en huile essentielle de Romarin.

t(min)	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135
M_{HE} (g)	0	1ère goute	0.1179	0.2139	0.2676	0.3102	0.3278	0.3315	0.3375	0.3375
R(%)	0	-	0.3930	0.7130	0.8920	1.0340	1.0926	1.1189	1.1250	1.1250
Taux de R(%)	0	-	34.93	63.37	79.28	91.91	97.12	98.84	100	100

Tableau 02 : Influence de la durée d'extraction par HD-US sur le rendement en huile essentielle de Romarin.

t(min)	0	10	20	30	40	50	60
M_{HE} (g)	0	1ère goute	0.3222	0.5088	0.6100	0.6882	0.6682
R(%)	0	-	0.4602	0.7268	0.8714	0.9831	0.9831
Taux de R(%)	0	-	46.81	73.92	88.63	100	100

Tableau 03 : Influence de la durée d'extraction par HD-MO sur le rendement en huile essentielle de Romarin.

t(min)	0	5	10	15	20	25	30
M_{HE} (g)	0	1ère goute	0.112	0.145	0.2761	0.3632	0.3632
R(%)	0	-	0.248	0.3229	0.6137	0.807	0.807
Taux de R(%)	0	-	30.73	40.01	76.04	100	100