

N° d'ordre : 07/2014/D/CH

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Faculté de Chimie



THESE

Présentée pour l'obtention du grade de DOCTEUR EN SCIENCES

EN : CHIMIE

SPECIALITE : CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE

Par : ASSAMI née MEZIANE Dalila

Thème

**Extraction assistée par micro-ondes des antioxydants à partir
du *Rosmarinus officinalis* L. et de ses coproduits**

Soutenue publiquement le : 08/06/2014, devant le jury composé de:

Mr A. BAALIOUAMER, Professeur à l'USTHB.	Président
Mr B.Y. MEKLATI, Professeur à l'USTHB.	Directeur de thèse
Mr F. CHEMAT, Professeur à l'UAPV, Avignon, (France).	Co-Directeur de thèse
Mme A. HASSANI Professeure à l'ENS Alger.	Examinatrice
Mme A. TAZEROUTI, Professeure à l'USTHB.	Examinatrice
Mr EH. BENYOUSSEF, Professeur à l'ENP Alger.	Examinateur

Remerciements

Ce travail a été réalisé essentiellement au Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (L.A.O.F - U.S.T.H.B) et pour une partie au Laboratoire du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (C.R.A.P.C.) de Bousmail avec le soutien de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France).

Je tiens à rendre un hommage particulier et respectueux à Monsieur B.Y. MEKLATI, Professeur à l'U.S.T.H.B et ancien Directeur du C.R.A.P.C, auquel je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir permis de poursuivre ma formation, de m'être inscrite en Doctorat et accepté de diriger ce travail avec beaucoup de patience, pour sa compréhension ainsi que pour ses conseils et encouragements.

Je ne saurais exprimer assez mes sincères remerciements à Monsieur F. CHEMAT, Professeur à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France), pour son encadrement. Je tiens à le remercier vivement et à lui exprimer toute ma reconnaissance, d'une part, pour la compétence, la patience et le soutien moral permanent qu'il m'a apportés tout au long de ce travail de thèse et d'autre part, pour m'avoir accueillie dans son Laboratoire durant un mois. Je suis reconnaissante à tous les membres de ce Laboratoire pour leur gentillesse, leur écoute et leur disponibilité durant mon séjour.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Professeur A. BAALIOUAMER, Directeur du Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie de l'U.S.T.H.B, de m'avoir accueillie dans son Laboratoire, et de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Ma gratitude va également à Madame A. HASSANI, Professeure à l'Ecole Normale Supérieure (ENS-Alger), qui m'a fait l'honneur d'examiner ce document et de juger ce travail.

Je prie Monsieur EH. BENYOUSSEF, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique (ENP-Alger) de trouver ici l'expression de mes vifs remerciements pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Madame A. TAZEROUTI, Professeure à l'U.S.T.H.B, pour avoir accepté de faire partie de ce Jury de thèse.

Je remercie vivement Mr M. HAZZIT, Maître de Conférences (A) à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA-Alger), pour sa participation active lors de la campagne d'échantillonnage à l'I.N.A.

Je tiens également à remercier Melle Ghouila, Mr et Mme Laboukhi, de m'avoir aidée dans l'échantillonnage réalisé dans différentes régions d'Algérie.

J'exprime mes remerciements à tous mes collègues du C.R.A.P.C et du Laboratoire L.A.O.F, pour l'aide et l'atmosphère amicale qu'ils ont su créer et pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont toujours manifestés tout au long de mes expérimentations.

Finalement, je ne saurais jamais exprimer assez mes sincères remerciements et ma reconnaissance à tous les membres de ma famille qui m'ont aidée, soutenue et encouragée tout au long de cette thèse.

INTRODUCTION GENERALE

1

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Les micro-ondes

I.1.	Introduction	3
I.2.	Généralités	4
I.3.	Instrumentation	7
I.3.1	Le magnétron	7
I.3.2.	Le guide d'ondes	8
I.3.3.	L'applicateur	8
I.4.	Chauffage micro-ondes	9
I.5.	Applications des micro-ondes	11
I.6.	Micro-ondes et sécurité	12
	Références bibliographiques	13

Chapitre II : Les substances actives

II.1.	Les huiles essentielles	16
II.1.1.	Facteurs de variabilité	17
II.1.2.	Utilisation des huiles essentielles	19
II.1.3.	Obtention des huiles essentielles	20
II.2.	Les antioxydants	23
II.2.1.	Généralités	23
II.2.2.	Classification	24
II.2.3.	Utilisation	27
II.2.4.	Procédés d'obtention	27
	Références bibliographiques	29

Chapitre III : Le Romarin

III.1.	Description	32
III.2.	Composition chimique	33
III.2.1.	Huile essentielle	34
III.2.2.	Antioxydants	37
III.3.	Propriétés du Romarin	39
III.3.1.	Activité hépatoprotectrice	40
III.3.2.	Activité détoxiquante	40

Sommaire

III.3.3.	Activités cholérétique et cholagogue	40
III.3.4	Activité anti-allergique	41
III.3.5.	Activité antioxydante	41
III.3.6	Activité anti-inflammatoire	41
III.4.	Utilisation	42
III.4.1.	Usage médicinal (Phytothérapie)	42
III.4.2.	Usage alimentaire	43
III.4.3.	Utilisation comme bio pesticide	43
III.4.4.	Utilisation en cosmétique	43
III.5.	Commercialisation du Romarin	44
III.6.	Toxicité	45
	Références bibliographiques	46

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV: Matériel et méthodes

IV.1.	Réactifs et solvants	50
IV.2.	Matière végétale	51
IV.3.	Echantillonnage	52
IV.4.	Etude des huiles essentielles	54
IV.4.1.	Extraction des huiles essentielles de Romarin de différentes régions	54
IV.4.2.	Analyse par CPG et CPG/SM	55
IV.4.3.	Analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	57
IV.5.	Etude des antioxydants	58
IV.5.1.	Extraction des antioxydants de Romarin de différentes régions	58
IV.5.2.	Analyse par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP)	58
IV.6.	Application d'un nouveau procédé d'extraction d'antioxydants	59
IV.6.1.	Extraction conventionnelle	59
IV.6.2.	Extraction innovante : Extraction par Soxhlet Assistée par Micro-ondes (SAM)	60
IV.6.3.	Analyse des extraits obtenus par Soxhlet et par SAM	62
IV.6.4.	Analyse statistique	63
IV.7.	Antioxydants	68
IV.7.1.	Récupération des déchets	68
IV.7.2.	Valorisation des déchets végétaux après extraction de l'huile essentielle	69

Sommaire

IV.7.3.	Teneur en phénols totaux	70
IV.7.4.	Evaluation de l'activité antioxydante	70
IV.7.4.1.	Test au Diphényl Picryl Hydrazyl (DPPH●)	70
IV.7.4.2.	Pouvoir antioxydant réducteur du fer (Ferric Reducing Antioxydant Power FRAP)	72
	Références bibliographiques	73

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre V : Substances actives du Romarin

V.1.	Huiles essentielles	75
V.1.1.	Etages bioclimatiques de végétation	75
V.1.2.	Taux d'humidité (Hu %)	78
V.1.3.	Influence du lieu de récolte de la plante sur la teneur et la qualité des huiles essentielles	78
V.1.4.	Cinétique de l'extraction	86
V.1.5.	Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)	86
V.2.	Antioxydants	88
V.2.1.	Extraction	88
V.2.2.	Analyse qualitative et quantitative des antioxydants de feuilles de Romarin de diverses régions	89
	Conclusion	93
	Références bibliographiques	94

Chapitre VI : Extraction par Soxhlet Assisté par Micro-ondes (SAM) : Application et optimisation

VI.1.	Description de l'étude	95
VI.1.1.	Méthodologie des plans d'expériences	95
VI.1.1.1.	Objectif de l'étude	95
VI.1.1.2.	Facteurs et domaine d'étude	95
VI.1.1.3.	Réponse	96
VI.1.1.4.	Réalisation des essais et résultats obtenus	96
VI.1.2.	Application	105
VI.1.2.1.	Analyse qualitative et quantitative des antioxydants	108
	Conclusion	110
	Références bibliographiques	111

Chapitre VII : Valorisation des déchets générés lors de l'extraction des huiles essentielles de Romarin

VII.1.	Valorisation des coproduits	112
VII.1.1.	Teneur en composés phénoliques totaux (TCP)	112
VII.1.2.	Activité antioxydante	115
VII.1.2.1.	Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH•	115
VII.1.2.1.1.	Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC ₅₀)	118
VII.1.2.2.	Mesure du Pouvoir réducteur (FRAP, «Ferric Reducing Antioxydant Power»)	120
	Conclusion	122
	Références bibliographiques	123
	CONCLUSION GENERALE	124

Liste des figures

Figure I.1	Brevet original déposé par la société Raytheon concernant l'utilisation des micro-ondes pour la cuisson des aliments	4
Figure I.2	Spectre électromagnétique et exemples d'ordre de grandeur et d'utilisations associées	5
Figure I.3	Gamme des hyperfréquences.	6
Figure I.4.a	Photographie représentant un magnétron	7
Figure I.4.b	Coupes schématiques d'un magnétron	8
Figure I.5	Schéma d'un four micro-ondes monomode (A) et multimode (B)	9
Figure I.6	Comparaison des modes de chauffage classique et micro-ondes	10
Figure I.7	Quelques applications des micro-ondes	11
Figure II.1	Familles chimiques des huiles essentielles	17
Figure II.2	Techniques conventionnelles d'extraction des huiles essentielles	21
Figure II.3	Familles des antioxydants	25
Figure III.1	Rameaux feuillés à fleurs de Romarin.	32
Figure IV.1	Carte géographique d'Algérie montrant les sites de récolte	51
Figure IV.2	Climagramme pluviothermique d'Emberger	54
Figure IV.3	Schéma du montage d'hydrodistillation sur un appareil de Clevenger modifié	55
Figure IV.4	Extracteur Soxhlet	60
Figure IV.5	Soxhlet Assisté par Micro-ondes	62
Figure IV.6	Schéma du montage expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes	69
Figure IV.7	Protocole d'extraction des antioxydants	69
Figure V.1	Rendements des huiles essentielles obtenues par HD, à partir de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. récolté dans seize régions d'Algérie.	78
Figure V.2	Teneurs en composés oxygénés et non oxygénés des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. de seize régions d'Algérie	82
Figure V.3	Cinétique d'extraction par HD de l'huile essentielle de Romarin séché	86

Liste des figures

Figure V.4	Structure de la feuille de la plante de Romarin observée au MEB	87
Figure V.5	Structure de la feuille de Romarin observée au MEB après extraction par HD	87
Figure V.6	Courbes d'étalonnages de l'acide Rosmarinique, du Carnosol et de l'acide Carnosique	89
Figure V.7	Répartition des trois composés phénoliques après leur extraction de l'espèce cueillie de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. dans seize régions d'Algérie	91
Figure VI.1	Diagramme de Pareto pour le rendement en antioxydants du Romarin	98
Figure VI.2a	Surfaces de réponses et d'iso réponses traduisant les effets combinés de temps de lessivage et du temps d'extraction sur le rendement en antioxydants	101
Figure VI.2b	Surfaces de réponses et d'iso réponses traduisant les effets combinés de la puissance micro-ondes et du temps d'extraction sur le rendement en antioxydants	103
Figure VI.2c	Surfaces de réponses et d'iso réponses traduisant les effets combinés de la puissance micro-ondes et du temps de lessivage sur le rendement en antioxydants	104
Figure VI.3	Cinétiques d'extractions des antioxydants de Romarin par SAM (a) et par Soxhlet (b)	106
Figure VII.1	Courbe d'étalonnage de l'acide Gallique	112
Figure VII.2	Contenu en composés phénoliques totaux des extraits étudiés	114
Figure VII.3	Taux d'inhibition des extraits de Romarin brut obtenus soit par agitation magnétique (Brut Ag), soit par micro-ondes (Brut Mo) et comparaison à celui du BHT	115
Figure VII.4	Taux d'inhibition des extraits obtenus à partir des déchets de Romarin (HD) soit par agitation magnétique, soit par micro-ondes	116
Figure VII.5	Taux d'inhibition des extraits obtenus à partir des déchets de Romarin (ESSAM à 300, 600 et 1000 W) soit par agitation magnétique, soit par micro-ondes	116
Figure VII.6	Activité de piégeage du radical DPPH• des différents extraits de Romarin comparée à celle du BHT	119
Figure VII.7	Pouvoir réducteur des extraits étudiés et de l'acide Ascorbique par la méthode FRAP. Ag : Agitation. Mo : Micro-ondes. B : Brut. HD : Hydrodistillation	120
Figure VII.8	Valeurs du pouvoir réducteur FRAP des extraits de Romarin (100 µg/ml) issus des échantillons de brut et des déchets traités par HD et ESSAM (300, 600, 1000)	121

Liste des tableaux

Tableau II.1	Procédés innovants d'extraction des huiles essentielles	22
Tableau II.2	Quelques antioxydants naturels et leurs sources	26
Tableau II.3	Exemples de techniques innovantes d'extraction des antioxydants naturels	28
Tableau III.1	Valeur nutritive dans 100g de Romarin	33
Tableau III.2	Huile essentielle chémotypée (H.E.C.T) de Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	36
Tableau III.3	Principaux antioxydants du Romarin	39
Tableau III.4	Prix de vente de quelques produits de Romarin	44
Tableau IV.1	Caractéristiques des produits chimiques utilisés	50
Tableau IV.2	Présentation du Romarin étudié	51
Tableau IV.3	Conditions opératoires de l'analyse par CPG	56
Tableau IV.4	Conditions opératoires de l'analyse par CG/SM	57
Tableau IV.5	Programmation (1) des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse CLHP	59
Tableau IV.6	Programmation (2) des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse CLHP	63
Tableau IV.7	Description des 20 expériences (exprimées en variables codées) intervenant dans le Plan Composite Centré	65
Tableau IV.8	Variables naturelles et codées appliquées aux facteurs testés	66
Tableau V.1	Lieu et climat des sites d'échantillonnage	76
Tableau V.2	Etages bioclimatiques de végétation	77
Tableau V.3	Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de Romarin obtenues par HD	80
Tableau V.4	Composés majoritaires des huiles essentielles de Romarin classés par étage bioclimatique	84
Tableau V.5	Rendements d'extraction en antioxydants de divers échantillons de feuilles de Romarin en fonction de leur aire de cueillette	88
Tableau V.6	Identification des antioxydants majoritaires du Romarin	89
Tableau V.7	Données relatives aux courbes d'étalonnage des acides Rosmarinique et Carnosique et du Carnosol	90

Liste des tableaux

Tableau V.8	Quantification de trois antioxydants majoritaires dans le Romarin originaire de seize régions d'Algérie	90
Tableau V.9	Composés phénoliques majoritaires de Romarin classés par étage bioclimatique	92
Tableau VI.1	Expériences réalisées dans le plan expérimental et rendements obtenus	97
Tableau VI.2	Données obtenues à partir de l'analyse de la variance du modèle statistique	99
Tableau VI.3	Résultats obtenus lors de l'optimisation de l'extraction des antioxydants par SAM	105
Tableau VI.4	Étalons utilisés pour la quantification	108
Tableau VI.5	Quantification de trois polyphénols retrouvés dans le Romarin étudié	109
Tableau VII.1	Teneur en composés phénoliques totaux des extraits étudiés	113
Tableau VII.2	Concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC ₅₀)	118

Introduction générale

Introduction générale

L'Algérie dispose d'énormes variétés de plantes aromatiques et médicinales peu exploitées et encore moins transformées. La réflexion à des voies de valorisation des produits naturels nationaux et de leurs co-produits, s'avère nécessaire, et indispensable d'une part, pour une meilleure connaissance scientifique de ces produits et de leurs composants et d'autre part pour trouver des solutions en vue d'améliorer les méthodes d'exploitation des ressources naturelles alimentaires, en tenant compte de l'intérêt socio-économique du pays. Dans ce contexte, le travail proposé vise, l'étude du potentiel de valorisation du Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et de ses co-produits sous forme d'extraits constitués d'une grande variété de produits naturels (huiles essentielles et antioxydants). Le choix du Romarin est dicté par son abondance très répandue et spontanée dans notre pays et par l'importance de ses composés naturels, qui exercent des effets bénéfiques sur la santé : prévention de maladies cardio-vasculaires, cancers, etc.... et qui constituent des produits à haute valeur ajoutée, pouvant être utilisés dans les secteurs de l'agro-alimentaire ou de la santé. De plus, l'industrie agroalimentaire, sous le poids de la sécurité alimentaire et de la demande des consommateurs, enlève tous les produits antioxydants de synthèse comme le tert-Butyl Hydroxy Toluène BHT (produit prohibé récemment), et est à la recherche d'antioxydants naturels extraits à partir de matrices végétales en utilisant des techniques plus avancées dans le but de contrecarrer les limites des techniques d'extraction conventionnelles.

Dans cette optique, les travaux de la présente thèse sont relatifs:

- d'une part, à l'extraction des métabolites secondaires du Romarin par différentes techniques : conventionnelle (hydrodistillation) et innovante (extraction sans solvant assistée par micro-ondes),
- d'autre part, à l'extraction des antioxydants du Romarin par différentes techniques traditionnelles (soxhlet et macération) et par application d'un nouveau procédé d'extraction assistée par micro-ondes,
- et enfin à la mise en valeur des déchets issus de l'extraction des huiles essentielles de Romarin.

Ce mémoire est réparti en trois parties, dont la première est une synthèse bibliographique regroupant trois chapitres, où nous apportons dans le premier chapitre un aperçu sur l'histoire des micro-ondes et leur développement au cours du temps. Ensuite, nous décrivons quelques applications originales des micro-ondes dans des domaines très variés.

Le deuxième chapitre élucide la composition, l'obtention et l'utilisation de deux groupes de substances actives produites par les plantes et qui sont les huiles essentielles et les antioxydants. Le dernier chapitre de la partie bibliographique, expose la plante choisie pour cette étude, le Romarin, comme source potentielle pouvant constituer une alternative aux produits de synthèse.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale dans laquelle les moyens et les techniques employés pour réaliser ce travail sont décrits. Pour cela, un descriptif de la matrice végétale est d'abord réalisé (zones d'échantillonnage, climat, taux d'humidité), suivi d'une présentation des différentes techniques utilisées pour l'extraction et l'analyse des huiles essentielles et des antioxydants. Ensuite, l'application et l'optimisation par analyse statistique du nouveau procédé d'extraction d'antioxydants et enfin la valorisation des co-produits issus des déchets de Romarin.

La troisième et dernière partie est réservée aux résultats et à leur discussion. Elle s'articule en trois chapitres, dont le premier relève les résultats de l'étude des huiles essentielles et des antioxydants issus du Romarin de seize régions d'Algérie. Le second chapitre discute de l'application et de l'optimisation du nouveau dispositif (Soxhlet Assisté par Micro-ondes (SAM)) permettant l'extraction rapide des antioxydants à partir de la matrice végétale étudiée. La dernière partie de ce manuscrit porte sur la mise en valeur des déchets de Romarin, générés après l'extraction des huiles essentielles, et sur l'étude de l'impact de la technique d'extraction utilisée pour une meilleure qualité du déchet récupéré.

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I :
Les micro-ondes

I.1. Introduction

La technologie des micro-ondes a vu le jour dès 1930 en Angleterre, sous l'impulsion d'un groupe de chercheurs britanniques dirigés par les professeurs Boot et Randall. En 1939, ils mettent au point «le magnétron», un tube à électrons qui génère des ondes ultracourtes (micro-ondes) qui augmentent nettement les capacités des radars à détecter les avions ennemis. Dans le cadre de l'effort militaire, les américains reprennent largement la technique, par l'intermédiaire de la société d'armement Raytheon Corp. Afin d'améliorer la qualité des radars, de nombreuses innovations sont réalisées de manière à rendre le magnétron plus performant, car les premiers magnétrons ne fonctionnaient pas de façon continue. A la fin de la Seconde Guerre Mondiale (1945), en travaillant à côté d'un magnétron, l'ingénieur physicien américain Percy Le Baron Spencer qui travaillait chez Raytheon, remarqua qu'une barre de chocolat qui se trouvait dans la poche de sa blouse avait fondue. Il soupçonna un lien entre le chocolat fondu et le magnétron produisant de la chaleur. Il fit un test avec un grain de maïs qui se transforma en pop corn en volant à travers la pièce. Dans d'autres essais, il testa un œuf à l'avant du magnétron et remarqua que l'œuf avait explosé. Il se rendit compte que les micro-ondes générées par le magnétron pouvaient véhiculer une énergie substantielle. Il entreprit alors la création d'une boîte métallique capable de chauffer très rapidement les aliments, le premier four micro-ondes était né. En 1950, la société Raytheon breveta cette technologie de cuisson (Figure I.1) [1]. En 1953, Raytheon commercialisa le premier four à micro-ondes. Il portait à ses débuts le nom de « Radarange ». Lourd et plutôt cher (1,8 m de haut, 340 kg de masse, 3500 dollars), il fut d'abord destiné à des cuisines d'hôpitaux et des cantines militaires. Il faudra attendre 1967, pour voir se miniaturiser son invention. C'est la société Amana, filiale de Raytheon qui mit au point le premier four à micro-ondes ménager. Les fours micro-ondes ont pu faire leur entrée dans les laboratoires et devenir un axe de recherche considérable. L'utilisation des micro-ondes pour la préparation d'échantillons est apparue pour la première fois dans les années 70 avec les travaux d'Abu-Samra et coll. [2] pour le dosage des éléments à l'état de traces provenant de matériaux biologiques. A ce jour, cette application est largement utilisée dans le milieu industriel et les foyers, mais a cependant nécessité de nombreuses années de recherche avant d'être populaire et acceptée par le grand public.

[1] Gallawa J. C. (2007).

[2] Abu-Samra A., Morris J.S., Koirtyohann S.R. (1975).

Actuellement, cette technologie est bien implantée dans différents domaines comme : l'agroalimentaire [3], l'environnement [4], la médecine [5] et la synthèse organique [6].

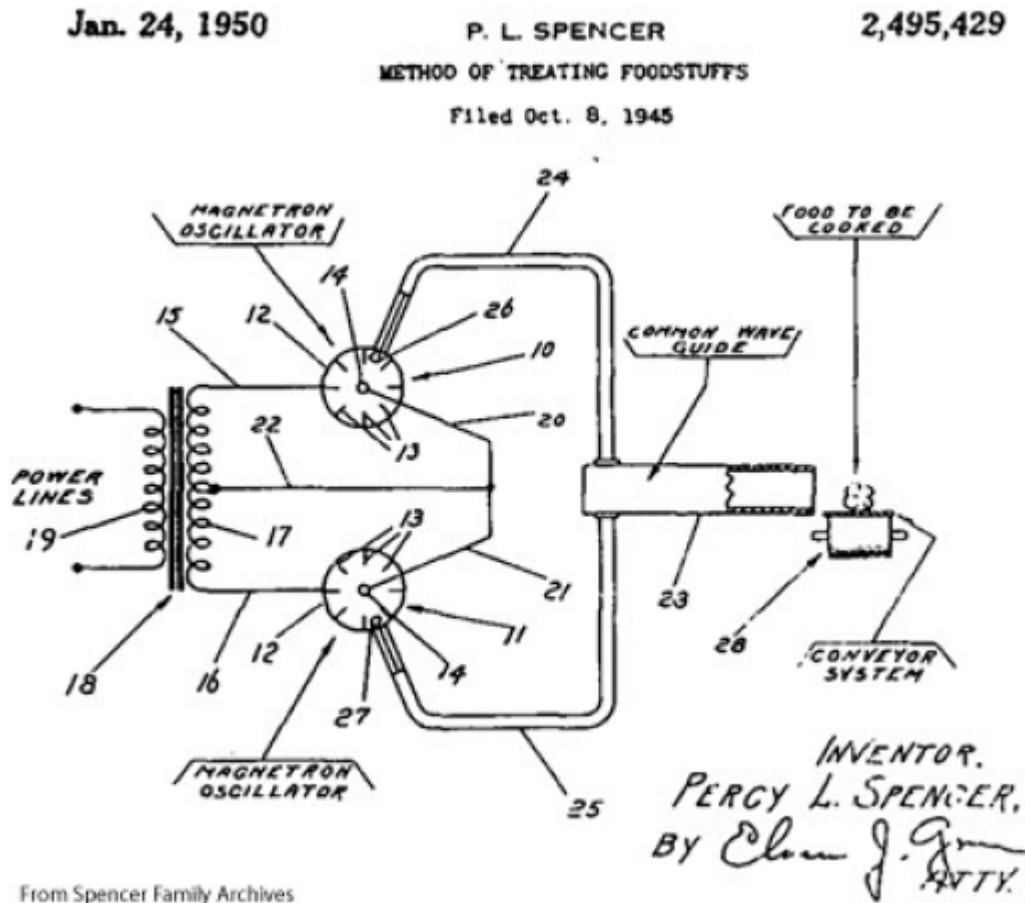


Figure I.1: Brevet original déposé par la société Raytheon concernant l'utilisation des micro-ondes pour la cuisson des aliments (Gallawa, 2007) [1].

I.2. Généralités

Les micro-ondes désignent les radiations non ionisantes comprises dans le spectre électromagnétique des hyperfréquences et ayant une longueur d'onde comprise entre l'infrarouge et les ondes radio (Figure I.2).

[3] Zill-e-Huma, Abert-Vian M., Elmaataoui M., Chemat F. (2011).

[4] Pérez Cid B., Fernández Alborés A., Fernández Gómez E., Falqué López E. (2001).

[5] Fang Q.Q., Meaney P.M., Paulsen K.D. (2010).

[6] Loupy A. (2004).

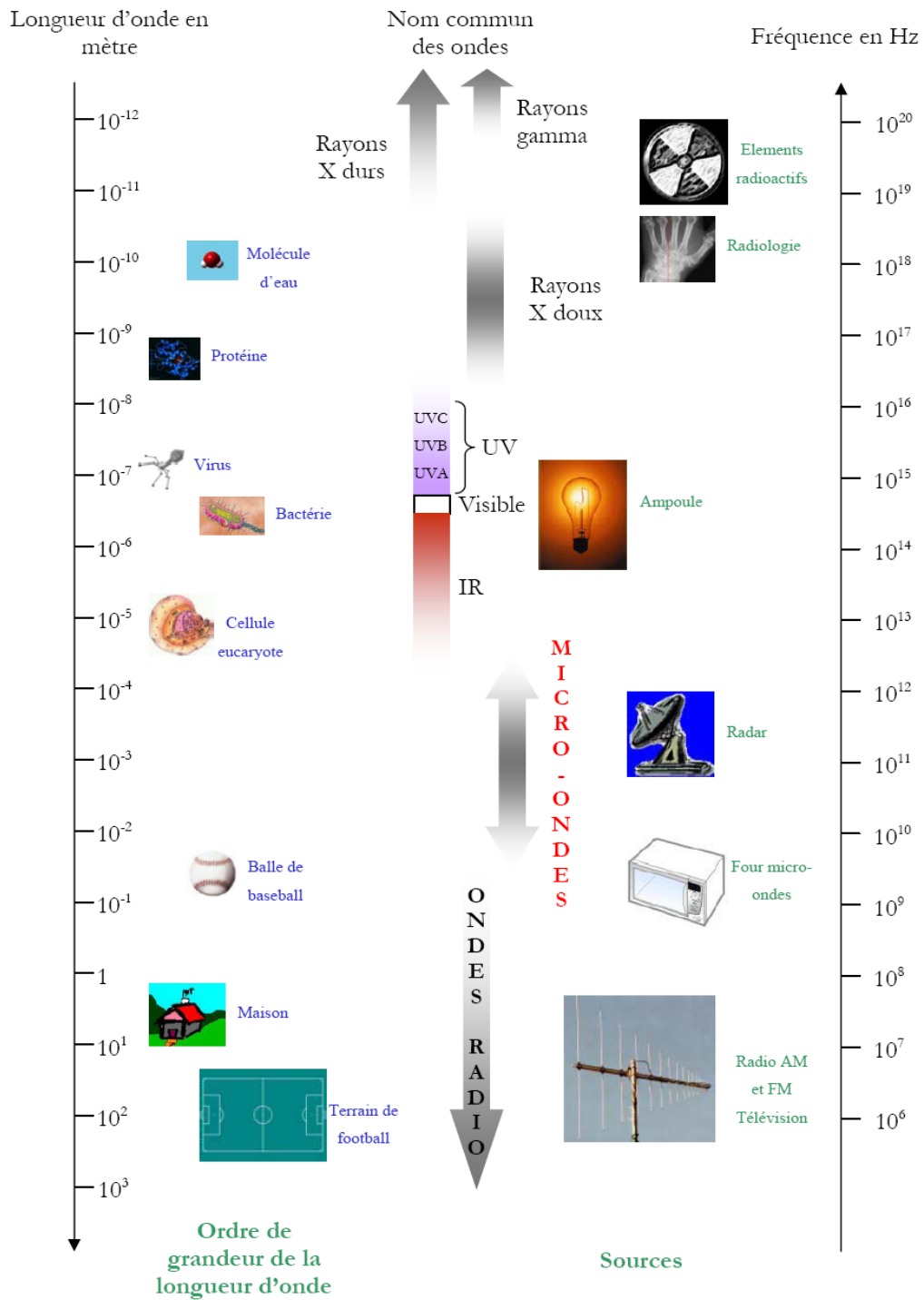


Figure I.2: Spectre électromagnétique et exemples d'ordre de grandeur et d'utilisations associées [7].

Radio AM : Modulation d'amplitude
Radio FM : Modulation de fréquence

UVA : Ultraviolet de 315 à 400 nm
UVB : Ultraviolet de 280 à 315 nm
UVC : Ultraviolet de 100 à 280 nm

[7] Rougier C. (2003).

Les micro-ondes couvrent la gamme des ondes décimétriques (UHF), centimétriques (SHF) et millimétriques (EHF) [8]. L'utilisation de ces ondes est répartie en deux catégories distinctes : l'onde peut être porteuse d'informations comme dans les télécommunications (téléphones portables, satellites, GPS, radars...) ou comme vecteur d'énergie (chauffage, décongélation, séchage, cuisson...) grâce à la friction et à l'agitation moléculaire produites par la migration des ions et la rotation dipolaire. La gamme de fréquences des micro-ondes est comprise entre 300 MHz et 300 GHz (Figure I.3), ce qui correspond à des longueurs d'ondes s'étendant de 1 mm à 1 m. La Commission Fédérale de Communication (FCC) a adopté à Genève un accord visant l'utilisation des micro-ondes dans les domaines industriels, scientifiques et médicaux (ISM). Ainsi, les fréquences suivantes ont été retenues: 915 ± 25 MHz, 2450 ± 13 MHz, 5800 ± 75 MHz et 22125 ± 125 MHz car elle permettent de ne pas créer d'interférences avec les fréquences des systèmes de télécommunications [9, 10, 11]. Les micro-ondes peuvent pénétrer les matières biologiques et agir sur les molécules polaires telles que l'eau pour leur induire un mouvement de fluctuation ce qui se traduit par une augmentation de la température de la matière [12].

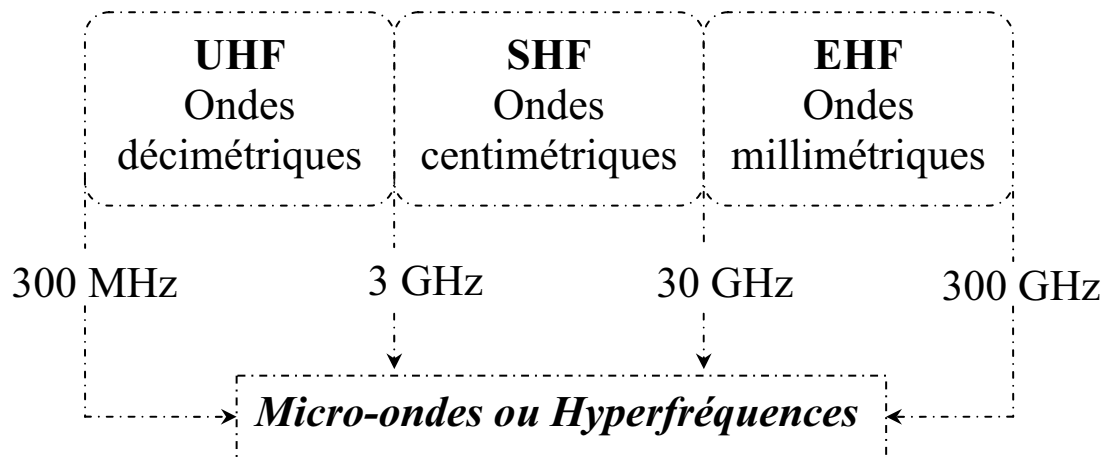


Figure I.3: Gamme des hyperfréquences.

UHF: Ultra High Frequency.

SHF: Super High Frequency.

EHF: Extremely High Frequency.

[8] Thuéry J. (1989).

[9] Virot M. (2009).

[10] Thostenson E.T., Chou T.W. (1999).

[11] Federal Communications Commission. (1972).

[12] Ben Amor B. (2008).

I.3. Instrumentation

Un four à micro-ondes est constitué de trois éléments principaux : le magnétron, le guide d'ondes et l'applicateur. Ces éléments constituent les pièces fondamentales d'un four micro-ondes. En outre, de nombreux éléments peuvent être ajoutés ou adaptés en fonction des besoins de l'expérience [1].

I.3.1. Le magnétron

Le magnétron (Figures I.4.a, I.4.b) est un générateur d'ondes qui transforme le courant électrique en rayonnement électromagnétique. C'est un tube à vide circulaire constitué:

- de deux aimants placés à l'extrémité du tube de façon perpendiculaire à l'axe du tube,
- d'une cathode centrale, chauffée par un filament,
- d'une anode cylindrique creuse, composée de plusieurs cavités résonnantes de formes différentes selon le magnétron considéré.

L'anode et la cathode sont séparées par un espace appelé « espace d'interaction » qui se trouve sous vide et qui consentira la conversion de l'énergie électrique en une énergie cinétique et enfin, en une énergie électromagnétique rayonnante à haute fréquence. Il existe un champ magnétique axial produit par les deux aimants et un champ électrique généré entre l'anode et la cathode, correspondant à une tension de plusieurs kilovolts, pour une distance inter-électrodes de quelques millimètres.

La cathode, chauffée par un filament, émet des électrons qui seront attirés vers l'anode sous l'action d'un champ électrique. Ce dernier accroît leur énergie cinétique et le champ magnétique incurve leur trajectoire. Les électrons ainsi accélérés rayonnent de l'énergie sous la forme d'ondes électromagnétiques. Pour les magnétrons de forte puissance, un système de refroidissement du bloc anodique à l'air ou bien par circulation d'eau est utilisé [8, 9, 13].

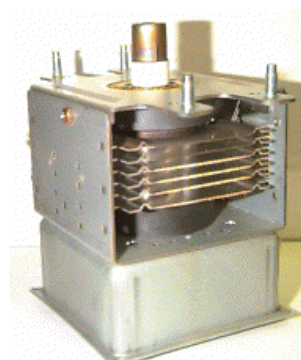


Figure I.4.a : Photographie représentant un magnétron.

^[13] Farhat A. (2010).

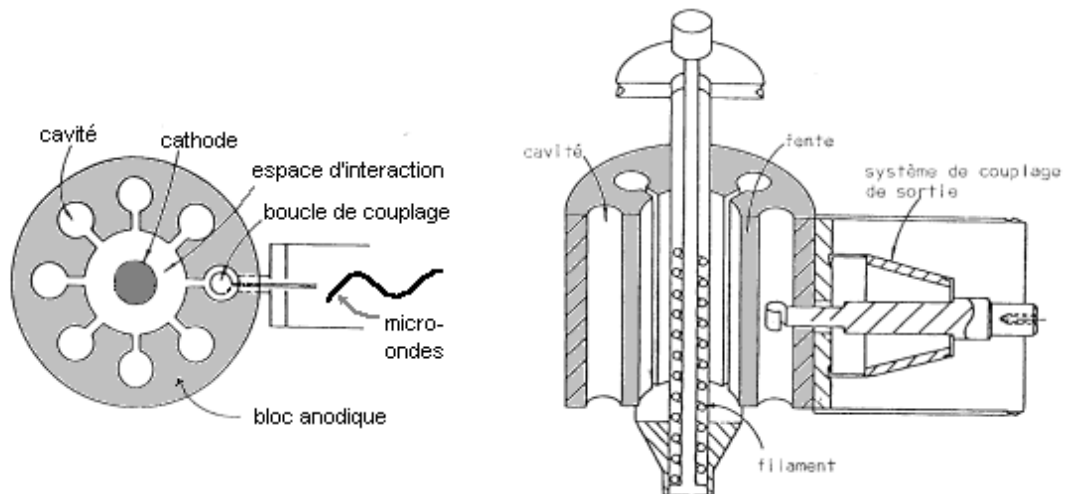


Figure I.4.b : Coupes schématiques d'un magnétron.

I.3.2. Le guide d'ondes

Les ondes électromagnétiques émises par le magnétron, vont être convoyées dans le guide d'ondes, en vue de leur propagation dans l'applicateur. Le guide d'ondes est généralement un tube métallique ou un conducteur cylindrique dont la section droite est limitée par un contour fermé pouvant contenir d'autres contours. Sa génératrice sera choisie comme axe de propagation. Deux modes de propagation peuvent exister : le mode TM (Transverse Magnétique), dans lequel le champ magnétique se réduit à sa composante transversale ($H_z = 0$) ou bien, le mode TE (Transverse Electrique) qui réduit le champ électrique à sa composante transversale ($E_z = 0$) [9, 14].

I.3.3. L'applicateur

L'applicateur est une cavité fermée dans laquelle est positionnée l'échantillon à traiter. Il doit assurer le transfert optimal de l'énergie électromagnétique provenant du magnétron en direction du matériau à traiter. Il existe deux grandes catégories d'applicateurs: les applicateurs monomodes et les applicateurs multimodes. Un applicateur est dit monomode lorsque ses dimensions géométriques sont choisies de telle sorte qu'à la fréquence de travail, il n'existe qu'une seule configuration de champ. Ce type d'applicateur permet ainsi le contrôle précis du champ électrique. Il est cependant réservé aux matériaux de petit volume. L'applicateur multimode consiste en une cavité suffisamment grande pour qu'il existe plusieurs types de configurations de champ. Le champ électrique n'est pas stable comme dans une cavité monomode et sa distribution varie.

^[14] Lucchesi M.E. (2005).

Ce genre d'applicateur est utilisé pour le traitement des volumes importants et des matériaux dont les paramètres électriques et magnétiques varient peu [14].

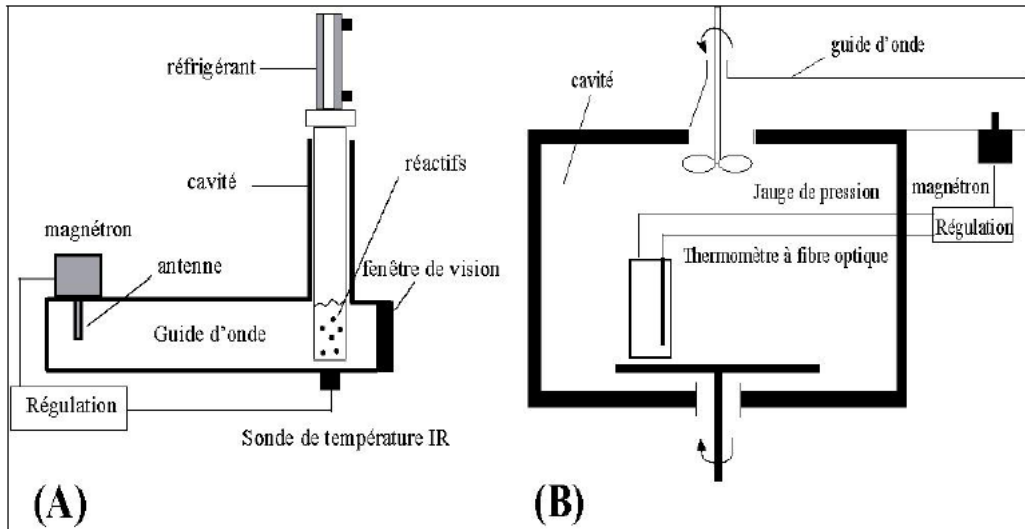


Figure I.5 : Schéma d'un four micro-ondes monomode (A) et multimode (B) [14].

I.4. Chauffage micro-ondes

Le principe de ce type de chauffage repose sur l'échauffement produit par l'agitation moléculaire du matériau diélectrique soumis au rayonnement micro-ondes. Ce chauffage est essentiellement le résultat de l'interaction entre le champ électromagnétique alternatif et un matériau diélectrique [15]. Il est lié au mouvement rotatif alternatif de molécules possédant un moment dipolaire qui tentent de s'aligner avec le champ électrique. L'alignement des dipôles est retardé par la présence d'interactions (liaisons hydrogènes, liaisons de Van der Waals) qui vont provoquer une friction moléculaire comparable à des frottements solide-solide. Les résultats de ces chocs moléculaires, rotations dipolaires et frictions moléculaires vont induire un dégagement de chaleur dans le milieu étudié [9].

Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel. Il induit un gradient de température allant de l'extérieur du récipient, vers l'intérieur. Pour les micro-ondes, la matrice, le mélange ou le volume traité absorbent l'énergie directement et s'échauffent rapidement, devenant eux-mêmes sources de chaleur. Il s'agit d'un chauffage en volume et non pas en surface. Les parois externes du récipient sont plus froides que le coeur de la solution (Figure I.6) [9].

[15] Chavan R.S. et Chavan S.R. (2010).

L'aptitude d'un matériau à absorber les micro-ondes est influencée significativement par [16]:

- la fréquence des micro-ondes,
- l'eau contenue dans le produit,
- la température du produit et sa composition (en particulier le taux de sel et les matières grasses).

Il a été trouvé que l'ajout de sel au produit, augmente la capacité d'absorption des micro-ondes et par conséquent un chauffage plus rapide [17]. D'autre part, la présence d'eau dans les végétaux et des lipides dans les aliments provoquent aussi un chauffage rapide [18, 19]

Chauffage classique



Chauffage par micro-ondes

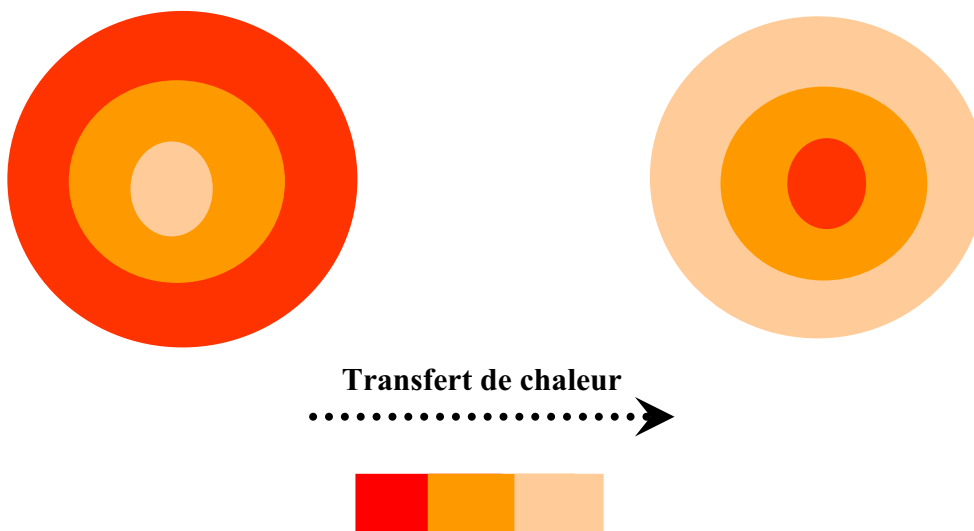


Figure I.6 : Comparaison des modes de chauffage classique et micro-ondes [13].

[16] Umesh Hebbar H., Rastogi Navin K. (2011)

[17] Anantheswaran R.S., Doores R., Heddleson R. et Kuhn G. (1993).

[18] Schiffman R.F. (1993)

[19] Flores L.M. (1994)

I.5. Applications des micro-ondes

Après plusieurs années de recherche, le recours à l'application des micro-ondes est largement répandu dans les milieux scientifique, industriel et dans les foyers. De nombreux scientifiques ont relaté les avantages des micro-ondes dans divers procédés physiques et/ou chimiques que ce soit au niveau de l'industrie ou du laboratoire. L'organigramme ci-dessous regroupe quelques applications des micro-ondes dans des domaines très variés.

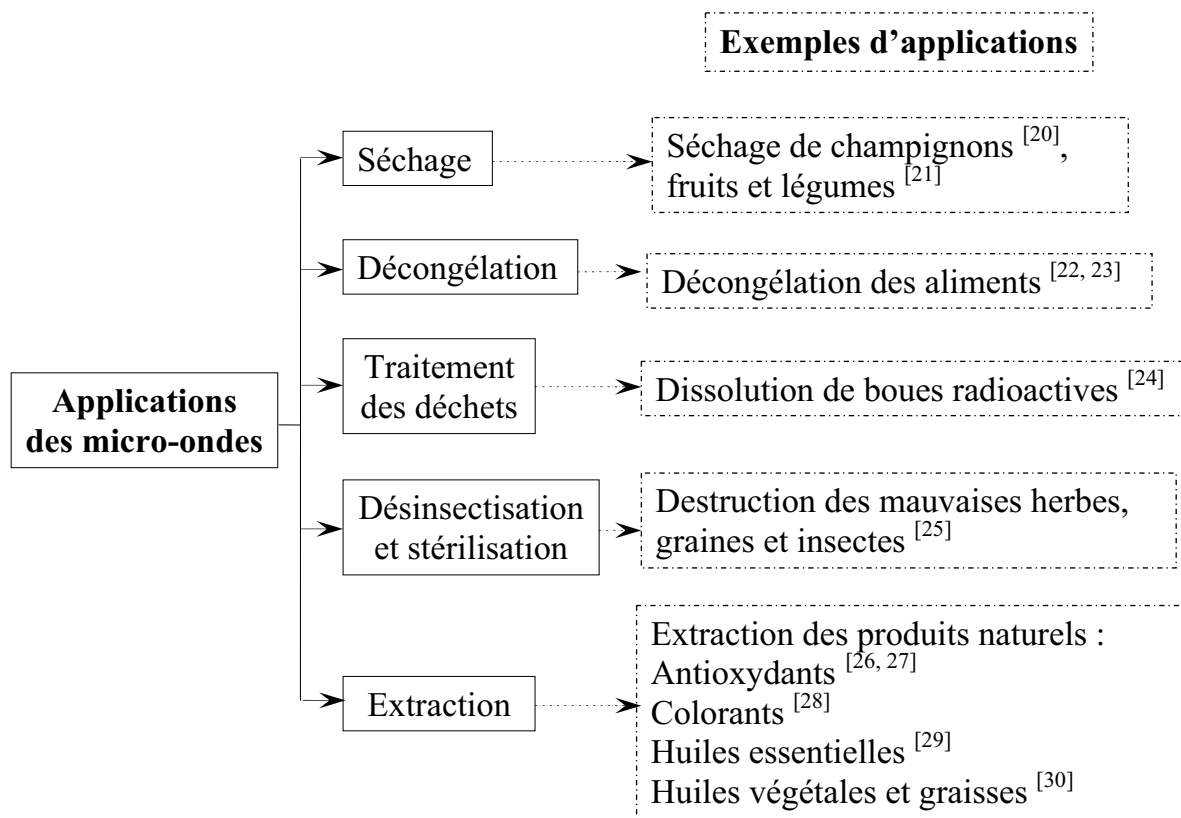


Figure I.7: Quelques applications des micro-ondes.

[20] Torringa E., Esveld E., Scheewe I., Van Den Berg R., Bartels P. (2001).

[21] Zhang M., Tang J., Mujumdar A.S., Wang S. (2006).

[22] Li B., Sun D-W. (2002).

[23] Seyhun N., Ramaswamy H., Sumnu G., Sahin S., Ahmed J. (2009).

[24] Jäggi M., Eikenberg J. (2009).

[25] Wall G. (2008).

[26] Hemwimon S., Pavasant P., Shotipruk A. (2007).

[27] Meziane Assami D., Tomao V., Ruiz K., Meklati B.Y., Chemat F. (2013).

[28] Lianfu Z., Zelong L. (2008).

[29] Ferhat M.A., Meklati B.Y., Smadja J., Chemat F. (2006).

[30] Virot M., Tomao V., Ginies C., Visinoni F., Chemat F. (2008).

I.6. Micro-ondes et sécurité

Vu l'intérêt porté à l'utilisation des micro-ondes, il est important de comprendre l'effet du chauffage par micro-ondes sur les utilisateurs et d'assurer la salubrité des aliments et la qualité des produits utilisés dans de telles conditions. Il a été démontré que d'un point de vue chimique, les micro-ondes ne permettent pas d'affecter le matériel biologique [31]. Cependant, plusieurs travaux de recherche [32,33] montrent que sous l'action des micro-ondes des effets thermiques (dégagement de chaleur) et des effets athermiques ou spécifiques (résonance cellulaire) sont apparents sur les tissus vivants. Dans le cas d'expositions chroniques, les dommages provoqués par ces effets, affectent le système nerveux (asthénie, troubles du sommeil, céphalées, perte de mémoire...), le système endocrinien (dysfonctionnement gonadique, surrénalien et thyroïdien) et le système immunitaire (modification lymphocytaire, macrophagique et hématopoïétique). Actuellement, le seuil minimum à partir duquel la nocivité pour la santé humaine et animale débute, n'est pas encore défini avec précision. Pour palier ces effets sur l'homme, la Commission Electrotechnique Internationale (C.E.I) et l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) testent et font évoluer régulièrement des normes de sécurité adjacentes à l'emploi de fours micro-ondes industriels et domestiques. De nouvelles contraintes de sécurité sont de ce fait fréquemment publiées, obligeant les constructeurs à être rigoureux. On relèvera, par exemple, les obligations de blindage des portes du four, les règles de sécurité concernant le verrouillage des portes, les réglementations sur les fréquences disponibles, les plaques signalétiques, les contrôles de fuites, ...etc [9].

[31] Stuerger D. (2006).

[32] Lai H., Singh N.P. (1996).

[33] Paulraj R., Behari J. (2006).

Références bibliographiques

- [1] Gallawa J. C. (2007). « The Complete Microwave Oven Service Handbook » Microtech, Florida. U.S.A.
- [2] Abu-Samra A., Morris J.S., Koirtyohann S.R. (1975). Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Anal. Chem.* 47, 1475-1477.
- [3] Zill-e-Huma, Abert-Vian M., Elmaataoui M., Chemat F. (2011). A novel idea in food extraction field: Study of vacuum microwave hydrodiffusion technique for by-products extraction. *J. Food Eng.* 105, 351–360.
- [4] Pérez Cid B., Fernández Alborés A., Fernández Gómez E., Falqué López E. (2001). Use of microwave single extractions for metal fractionation in sewage sludge samples. *Anal. Chim. Acta.* 431, 209–218.
- [5] Fang Q.Q., Meaney P.M., Paulsen K.D. (2010). Viable Three-Dimensional Medical Microwave Tomography: Theory and Numerical Experiments. *IEEE Trans. Antennas Propag.* 58, 449-458.
- [6] Loupy A. (2004). Solvent-free microwave organic synthesis as an efficient procedure for green chemistry. *C. R. Chim.* 7, 103-112.
- [7] Rougier C. (2003). « Etude des interactions entre la bactérie *Escherichia coli* et les micro-ondes appliquées en mode discontinu dans des conditions faiblement thermiques ». Thèse de doctorat. Université de Limoges, France.
- [8] Thuéry J. (1989). « Les micro-ondes et leurs effets sur la matière. Applications industrielles, agro-alimentaires et médicales ». Deuxième édition, Technique et Documentation – Lavoisier, Paris, France.
- [9] Virot M. (2009). « Soxhlet assisté par micro-ondes. Conception et application à l'extraction des matières grasses ». Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, France.
- [10] Thostenson E.T., Chou T.W. (1999). Microwave processing: fundamentals and applications. *Composites: Part A.* 30, 1055–1071.
- [11] Federal Communications Commission. (1972). Vol.2 Part.2. 7-84. Washington D.C, U.S.A.
- [12] Ben Amor B. (2008). « Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: Texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC ». Thèse de doctorat. Université de la Rochelle, France.

- [13] Farhat A. (2010). « Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application ». Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) et l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).
- [14] Lucchesi M.E. (2005). « Extraction sans solvant assistée par micro-ondes. Conception et application à l'extraction des huiles essentielles ». Thèse de doctorat. Université de la Réunion, France.
- [15] Chavan R.S., Chavan S.R. (2010). Microwave Baking in Food Industry: A Review. *Int J. Dairy Sci.* 5, 113-127.
- [16] Umesh Hebbar H., Rastogi Navin K. (2011). «Chapter 12: Microwave Heating of Fluid Foods. In: Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods». Edited by: Cullen P.J., Tiwari Brijesh K., Valdramidis V. ISBN: 978-0-12-381470-8. 369-409.
- [17] Anantheswaran R.S., Doores R., Heddleson R., Kuhn G. (1993). Destruction of Salmonella species heated in aqueous salt solutions by microwave energy. *J. Food Prot.* 56, 763-768.
- [18] Schiffmann R.F. (1993). Understanding microwave reactions and interactions. *Food Production Design*.
- [19] Flores L.M. (1994). « Survival of Escherichia coli O157:H7 in refrigerated and low fat ground beef and thermal inactivation in fresh low fat ground beef by microwave energy ». Thesis: University of Nebraska, U.S.A.
- [20] Torringa E., Esveld E., Scheewe I., Van Den Berg R., Bartels P. (2001). Osmotic dehydration as a pre-treatment before combined microwave-hot-air drying of mushrooms. *J. Food Eng.* 49, 185-191.
- [21] Zhang M., Tang J., Mujumdar A.S., Wang S. (2006). Trends in microwave related drying of fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Tech.* 17, 524-534.
- [22] Li B., Sun D.W. (2002). Novel methods for rapid freezing and thawing of foods. A Review. *J. Food Eng.* 54, 175-182.
- [23] Seyhun N., Ramaswamy H., Sumnu G., Sahin S., Ahmed J. (2009). Comparison and modeling of microwave tempering and infrared assisted microwave tempering of frozen potato puree. *J. Food Eng.* 92, 339-344.
- [24] Jäggi M., Eikenberg J. (2009). Separation of ⁹⁰Sr from radioactive waste matrices – Microwave versus fusion decomposition. *Appl. Radiat. Isot.* 67, 765–769.
- [25] Wall G. (2008). «A device and method for soil sterilization, insect extermination and weed killing using microwave energy». Patent WO 2008/057215.

- [26] Hemwimon S., Pavasant P., Shotipruk A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Sep. Purif. Technol.* 54, 44.
- [27] Meziane Assami D., Tomao V., Ruiz K., Meklati B.Y., Chemat F. (2013). Chapter 14: «Microwave Extraction of Antioxidants from Rosemary Leaves: A Green Approach. In: *Plant Extracts: Role in Agriculture, Health Effects and Medical Applications*». 1st edition, edited by Giordano A., Costs A. 327-342.
- [28] Lianfu Z., Zelong L., (2008). Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason. Sonochem.* 15, 731.
- [29] Ferhat M.A., Meklati B.Y. Smadja J., Chemat F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J. Chromatogr. A.* 1112, 121-126.
- [30] Virot M., Tomao V., Ginies C., Visinoni F., Chemat F. (2008). Green procedure with a green solvent for fats and oils determination Microwave integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *J. Chromatogr. A.* 1197, 147–152.
- [31] Stuerger D. (2006). «Chapter 1: Microwave – material interactions and dielectric properties, key ingredients for mastery of chemical microwave processes. In: *Microwaves in Organic Synthesis*». 2nd edition, Edited by Loupy A. Wiley Weinheim. 1-61.
- [32] Lai H., Singh N.P. (1996). Single and double strand breaks in rat brain cells after acute exposure to radio frequency electromagnetic radiation. *Int. J. Radiat Biol.* 69, 513-521.
- [33] Paulraj R., Behari J. (2006). Single strand DNA breaks in rat brain cells exposed to microwave radiation. *Mutat. Res.* 596, 76-80.

Chapitre II :
Les substances actives

II.1. Les huiles essentielles

L'étude des huiles essentielles (H.E) reste toujours d'actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. Les huiles essentielles sont définies comme des produits odorants, volatils, ayant des composés aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure et regroupés en plusieurs familles chimiques (Figure II.1). Ce sont les sous-produits du métabolisme de la plante et sont communément appelées métabolites secondaires des plantes aromatiques. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Elles se localisent dans les poils glanduleux ou dans les cavités de sécrétion de parois cellulaires des plantes et sont présentes sous forme de gouttelettes de liquide dans les feuilles, les tiges, les écorces, les fleurs, les racines et / ou fruits de différentes plantes [1], où dans la plupart des cas, le rendement en huiles essentielles ne dépasse pas les 2%, ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses.

[1] Koul O., Walia S., Dhaliwal G. S. (2008).

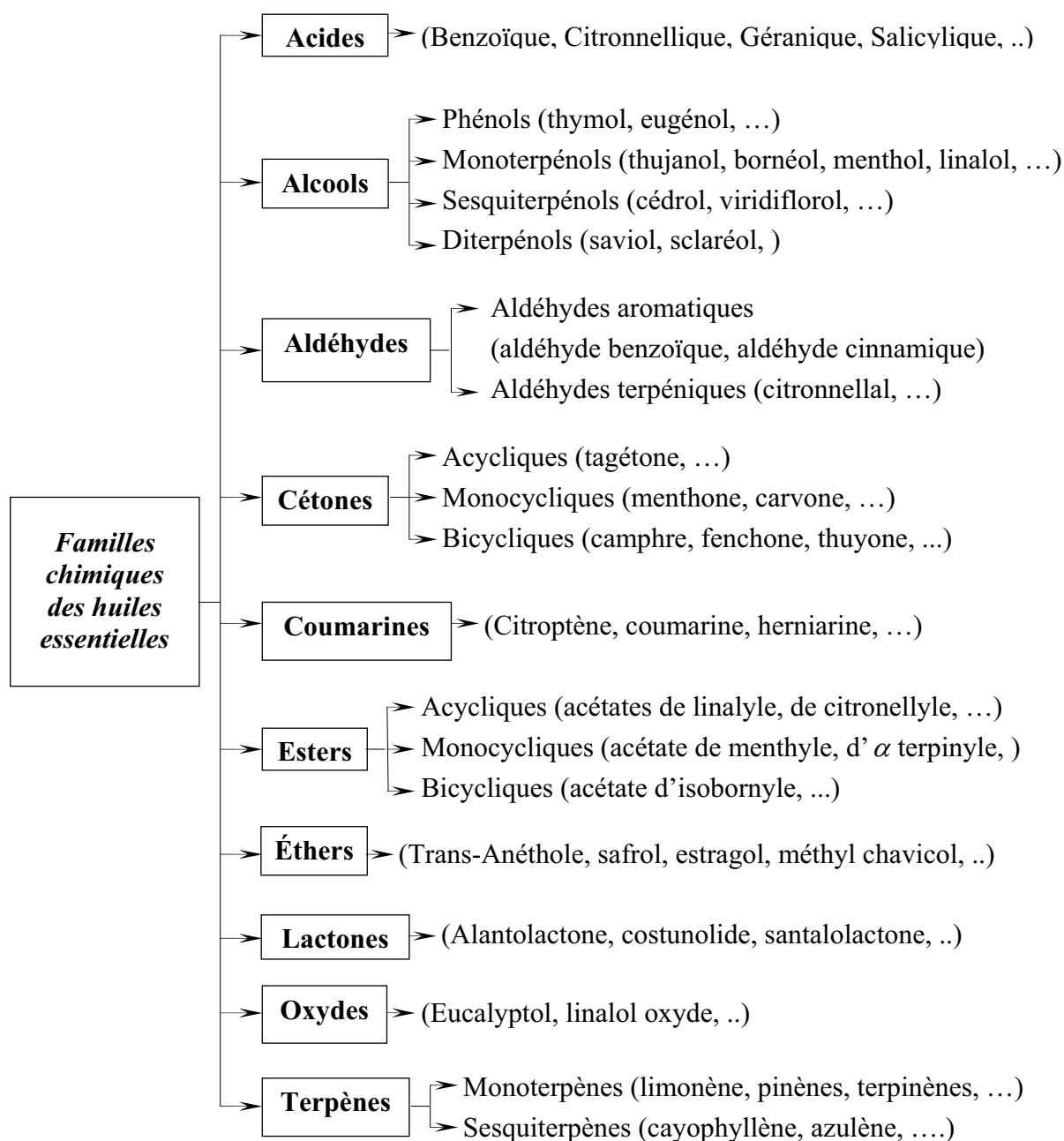


Figure II.1 : Familles chimiques des huiles essentielles

II.1.1. Facteurs de variabilité

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe. La connaissance approfondie de ses constituants permet de vérifier sa qualité, d'expliquer ses propriétés et de prévoir sa toxicité potentielle. Plusieurs études ont montré que la composition chimique, la qualité et la quantité extraite d'une huile essentielle dépendent d'une multitude de paramètres

d'ordre naturel (les facteurs génétiques, le degré de maturité, la localisation, le climat, le sol, l'environnement,...) ou technologique (type de culture, mode de récolte, mode d'extraction,...). Il arrive qu'au sein d'une même plante, la composition chimique de l'huile essentielle diffère d'un organe à un autre. D'après Guignard [2], dans le cas de la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), les feuilles donnent une huile riche en eugénol, les écorces fournissent un extrait où l'aldéhyde cinnamique est majoritaire, tandis que le camphre prédomine dans les racines. Les travaux de Jerkovic et coll. [3] ont montré des différences de composition des huiles essentielles de myrte en raison d'organes différents (feuilles, fruits et fleurs). D'autres travaux ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première. Ghnaya et coll. [4], ont constaté une composition différente des huiles essentielles de myrte, selon l'origine de la matière première (Tunisie et Algérie). Cette variation chimique génère la notion de chémotype (CT) ou chimiotype ou race chimique désignant la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle. Dans le cas du Romarin (*Rosmarinus officinalis*), Yesil et coll [5], ont démontré que la même plante a sécrété des essences chimiquement très différentes. Ils ont retrouvé deux chémotypes suivant la période de récolte : le type à 1,8-Cinéole caractérisant l'huile essentielle de la plante provenant de la Turquie (Izmir) et récoltée en décembre 2003, en mars et en septembre 2004 et celui à Verbénone, récolté dans la même région, au mois de juin 2004. Ces deux chémotypes ont présenté des activités antibactériennes différentes. Le chémotype à 1,8-Cinéole de l'huile essentielle de Romarin récolté en mars 2004 est trouvé être le plus actif. La diversité des chémotypes de l'huile essentielle de la même plante présente non seulement des activités différentes mais également des toxicités très variables. C'est la raison pour laquelle, une huile essentielle doit subir des contrôles réguliers et approfondis. Il est indispensable de bien préciser le chémotype qui peut conditionner l'activité et/ou la toxicité et qui permet la compréhension du mode d'action des huiles essentielles qui aboutira à l'emploi d'une thérapeutique naturelle, puissante et efficace.

[2] Guignard J.L. (1983).

[3] Jerkovic I., Radonic A., Borcic, I. (2002).

[4] Ghnaya A.B., Chograni H., Messoud C., Boussaid M. (2013).

[5] Yesil Celiktas O., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C. (2007).

II.1.2. Utilisation des huiles essentielles

Le grand intérêt de l'utilisation des huiles essentielles réside dans une réponse efficace et naturelle aux attentes des consommateurs qui cherchent toujours à utiliser des produits avec des ingrédients naturels de haute qualité et ayant une conservation saine et de longue durée. Dans le domaine de la recherche sur les substances naturelles, les huiles essentielles sont classées en qualité de métabolites secondaires, groupe de grande importance.

Du fait de leurs propriétés multiples, elles sont utilisées dans divers domaines :

- Phyto-protection (bio-pesticides,...) : Suite aux impacts écologique et sanitaire néfastes (résistance des ravageurs, contamination de l'environnement et des écosystèmes, perte de la biodiversité...) dûs à l'utilisation sans discernement des pesticides conventionnels de synthèse, les recherches récentes [6] ont eu recours aux bio-pesticides à base d'huiles essentielles qui présentent plusieurs caractéristiques intéressante et qui permettent aux plantes de se protéger contre leurs ennemis naturels.

- Parfumerie : L'utilisation des huiles essentielles comme base dans la fabrication de parfums a constitué une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations.

- Industrie cosmétique : Les huiles essentielles sont très appréciées par les fabricants de cosmétiques pour leurs excellentes propriétés, leurs parfums uniques et leur rôle naturel de conservateur. Certaines marques de produits cosmétiques se sont spécialisées dans les produits et soins à base d'huiles essentielles. Ces dernières sont destinées à diminuer les problèmes disgracieux (cellulite, vergetures..), à prendre soin de la peau (acné, rides...) et les cheveux (pellicules, cheveux cassants,...) et à parfumer les produits cosmétiques : savons, shampoings, gel-douches, crèmes cosmétiques et/ou hydratantes, etc...

- Industrie agro-alimentaire : Dans ce secteur, les quantités d'huiles essentielles mises en jeu, peuvent être très importantes. Elles sont utilisées pour rehausser le goût des aliments, pour conserver, parfumer et colorer.

- Industrie des produits d'entretien : La fabrication de produits domestiques ou industriels, d'entretien ménager, a également recours aux huiles essentielles pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques. Ce secteur consomme beaucoup d'huiles essentielles pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs.

[6] Evergetisa E., Michaelakisb A., Haroutouniana S.A. (2013).

- Aromathérapie : La thérapie par les huiles essentielles repose sur l'activité des molécules chimiques des huiles essentielles. C'est une méthode naturelle, dont la popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années. Les huiles essentielles utilisées en aromathérapie sont dites «chémotypées», elles sont particulièrement bien indiquées pour les usages thérapeutiques spécifiques, à titre d'exemple l'Huile Essentielle Chémotypée (H.E.C.T) du thym (*Thymus vulgaris*) [7] :

- H.E.C.T du *Thymus vulgaris* à Thymol; cette huile essentielle contient majoritairement du thymol ayant des propriétés anti-infectieuses majeures.

- H.E.C.T du *Thymus vulgaris* à Cinéole; cette huile essentielle contient majoritairement du cinéole à activité décongestionnante broncho-pulmonaire.

- H.E.C.T du *Thymus vulgaris* à *p*-Cymène; cette huile essentielle contient majoritairement du para-cymène à action anti-infectieuse et à forte action antalgique très recommandée en cas de rhumatismes et d'arthrose.

II.1.3. Obtention des huiles essentielles

Plusieurs techniques (Figure II.2) ont été utilisées pour l'extraction des huiles essentielles à partir des matrices végétales :

- L'entraînement à la vapeur d'eau : le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur d'eau. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées dans un essencier.

- L'hydrodistillation : La matière première est en contact direct avec l'eau.

- L'expression à froid : Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid, basé sur la rupture des parois des sacs oléifères, qui tapissent l'écorce du fruit.

Les rendements faibles ou laborieux des huiles essentielles obtenues par ces méthodes, ont poussé les chercheurs (Tableau II.1) à développer ces techniques classiques, pour améliorer les rendements, activer les vitesses d'extraction et appliquer les techniques innovantes à l'échelle industrielle.

[7] Zhiri A., Baudoux D. (2005).

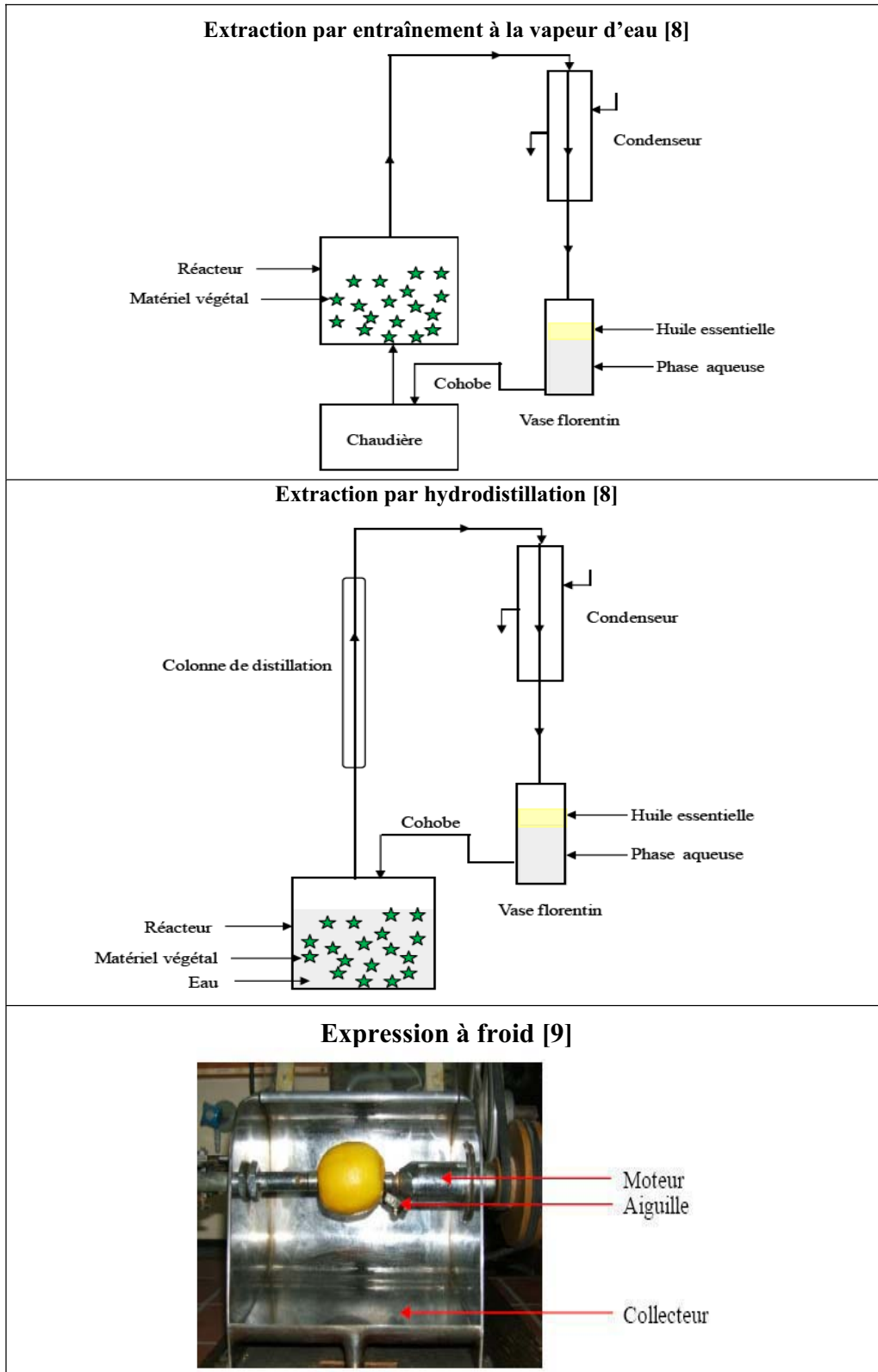


Figure II.2 : Techniques conventionnelles d'extraction des huiles essentielles

[8] Farhat A. (2010).

[9] Ferhat M.A. (2007).

Tableau II.1: Procédés innovants d'extraction des huiles essentielles

Travaux de recherche	Année	Référence
Entraînement à l'air assisté par micro-ondes : Compressed Air Microwave Distillation (CAMD)	1989	[10] Craveiro et coll.
Microwave extraction of volatile oils	1994	[11] Paré
Hydrodistillation assistée par micro-ondes : Microwave Assisted Hydrodistillation (MAHD)	2004	[12] Stashenko et coll.
		[13] Stashenko et coll.
Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : Solvent Free Microwave Extraction (SFME)	2004	[14] Chemat et coll.
		[15] Chemat et coll.
Extraction sans solvant améliorée assistée par micro-ondes : Improved Solvent Free Microwave Extraction (Improved SFME)	2006	[16] Wang et coll.
Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité : Microwave Hydrodiffusion and Gravity (MHG)	2008	[17] Chemat et coll.
Entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes : Microwave Steam Distillation (MSD)	2008	[18] Sahraoui et coll.
Vapo-diffusion Assistée par Micro-ondes : Microwave Steam Diffusion (MSDf)	2009	[19] Farhat et coll.
Comparaison des huiles essentielles obtenues par : Steam distillation (SD), Turbohydrodistillation (THD), Ultrasound assisted extraction followed by steam distillation (US-SD), In situ microwave-generated hydrodistillation (ISMH), (MSD), (MHG).....	2013	[20] Périno-Issartier et coll.

II.2. Les antioxydants

II.2.1. Généralités

D'après Halliwell [21], le terme « antioxydant » est largement utilisé, mais il est difficile à définir clairement. Il couvre un grand nombre de molécules et des domaines très divers comme l'alimentation, l'industrie chimique et l'industrie pharmaceutique. Pour englober ces différentes complexités, Halliwell utilise une large définition, il considère un antioxydant comme étant « toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle des substrats oxydables, ralentit ou empêche significativement l'oxydation de ces substrats ». Le terme « substrats oxydables » comprend tous les types de molécules trouvées dans les organismes vivants [56, 57]. Les substrats oxydables peuvent être des lipides, des protéines, des glucides ou des acides nucléiques. Les antioxydants protègent donc les cellules contre les dommages causés par les substances oxydantes. Les oxydants les plus répandus sont les radicaux libres. Ces derniers, naturellement présents dans l'organisme, aident à détruire les virus et les bactéries, et sont également impliqués dans la production de certaines hormones et enzymes. Ils sont définis comme des molécules ayant un nombre impair d'électrons, avec un électron célibataire qui peut jouer le rôle d'oxydant en captant un autre électron à une molécule qui se trouve alors oxydée ou de réducteur en donnant cet électron à une autre molécule qui se trouve alors réduite [23]. Notre organisme produit en permanence ces radicaux libres, qui sont en général instables et très réactifs. Ils sont créés par toutes les actions impliquant l'oxygène, comme la digestion et la respiration. Ils sont parfois fabriqués en excès suite aux réactions de défense de l'organisme contre les agresseurs éventuels notamment sous l'effet de la pollution, du stress, de l'exposition excessive au soleil ou au divers rayonnements, ainsi que l'ingestion des médicaments, des additifs alimentaires et aliments gras, alcool, tabac, etc.. [24]. Il convient de souligner que, la formation excessive de radicaux libres, peut engendrer le vieillissement prématuré des cellules de l'organisme et le développement de certaines maladies telles que le cancer, l'athérosclérose [25]. Parmi les radicaux libres retrouvés : radical superoxyde (O_2^{\bullet}), radical hydroxyle (HO^{\bullet}), radical hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}), radical peroxyde (RO_2^{\bullet}), radical alkoxyde (RO^{\bullet}), oxyde nitrique NO^{\bullet} , dioxyde d'azote NO_2^{\bullet} et les peroxydinitrites ($ONOO^{\bullet}$).

[21] Halliwell B. (2001).

[22] Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999).

[23] Rullier B. (1995).

[24] Phyllis A. Balch. (2006).

[25] Aruoma O.I. (1998).

Les radicaux libres, peuvent être également convertis en espèces non radicalaires, mais également réactives, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'acide hypochloreux (HOCl) et l'acide hypobromeux (HOBr).

II.2.2. Classification

Les antioxydants peuvent être produits par l'organisme, (antioxydants endogènes), ou proviennent de l'extérieur, (donc exogènes). Ils sont soit naturels ou synthétiques (Figure II.3).

- Les antioxydants synthétiques ont pour exemples, le BHT (3,5-di-tert-butyl-4-Hydroxytoluène : E321), le BHA (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyanisole : E320), le BHQT (Butylhydroquinone tertiaire : E319) et le PG (gallate de propyle : E310).

- Les antioxydants naturels, sont de deux types : enzymatique ou non enzymatique.

Les antioxydants enzymatiques sont directement synthétisés par l'organisme (les superoxydes dismutases (SOD), les glutathions peroxydases (GPX), la catalase (CAT),...) [26].

Les antioxydants non enzymatiques comprennent de nombreuses substances endogènes et exogènes. Parmi les substances endogènes, nous pouvons citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque et le coenzyme Q. Dans la catégorie d'antioxydants non enzymatiques (Tableau II.2) exogènes, nous retrouvons :

- les oligoéléments qui sont des micronutriments présents en très petites quantités dans l'organisme (éléments minéraux à l'état de trace), et indispensables à son bon fonctionnement;
- les vitamines ;
- les polyphénols ;
- les caroténoïdes qui sont des pigments liposolubles naturels présents principalement dans les plantes, les algues, les fruits, les légumes et les bactéries photosynthétiques.

[26] Denisov E.T., Afanas'ev I.B. (2005).

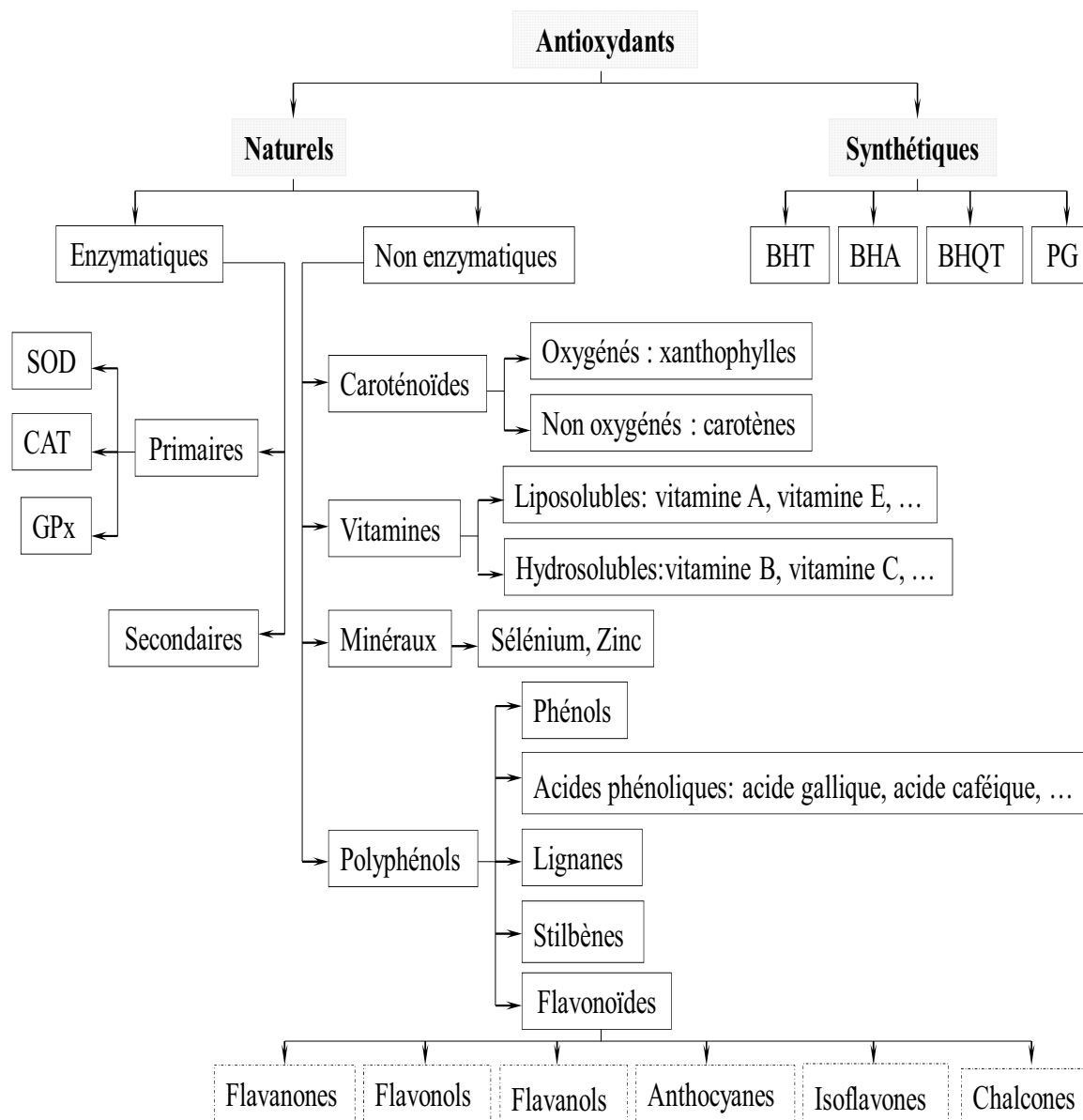


Figure II.3 : Familles des antioxydants [27]

BHT : Butylhydroxytoluène (3,5-di-tert-butyl-4-Hydroxytoluène)

BHA : Butylhydroxyanisole (3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyanisole)

BHQT : Butylhydroquinone tertiaire

PG : Gallate de propyle

SOD : Superoxydes dismutases

CAT : Catalase

GPx : Glutathions peroxydases

[27] Meziane Assami D., Tomao V., Ruiz K., Meklati B.Y., Chemat F. (2013)

Tableau II.2 : Quelques antioxydants naturels et leurs sources.

Antioxydants			Sources [23, 28]
Caroténoïdes	Carotènes	Lycopène	Pigment rouge de la tomate
		β -Carotène	Fruits et légumes de couleurs jaune, orange, rouge et vert foncé (mangue, carottes, abricots, épinards)
	Xanthophylles	β -Cryptoxanthine	Agrumes
		Lutéine et Zéaxanthine	Légumes verts à feuilles, pois, maïs, brocoli, kaki, jaune d'œuf
Oligoéléments	Sélénium		Noix, noix de cajou, germes de soja, céréales
	Cuivre		Cerises, olives, cacao, noix de cajou
	Manganèse		Céréales complètes, germes de blé, noix, thé noir, gingembre, clous de girofle, légumes verts
Vitamines	Vitamine E	Tocophérols et tocotriénols	Blé, noix, noisettes, kiwi, citron, abricot, fenouil, petits pois, persil, épinards, choux, poivron
	Vitamine C	Acide ascorbique	Cassis, kiwi, fraise, agrumes, persil, mangue, poivron, piment, brocoli, choux, fenouil, légumes à feuilles.
Composés phénoliques	Acides phénoliques	Acide rosmarinique	Romarin, sauge, basilic, mélisse, menthes, lavande
		Acide gallique	Feuilles de thé
		Acide caféique	Mélisse, menthe poivrée, thym, Café
		Acide férulique	Blé, maïs, riz, café, pomme,
		Acide vanillique	Fraises
	Alcools phénoliques	Tyrosol	Feuilles d'olivier, huile d'olive, huile d'argane
		Hydrotyrosol	Huile d'olive
		Oleuropéine	Feuilles d'olivier, huile d'olive, huile d'argane
	Stilbènes	Trans-Picéide	Cacao
		Trans-resvératrol	Raisin
	Diterpènes phénoliques	Acide carnosique	Romarin, sauge
		Carnosol	Romarin
	Flavonoïdes		Raisin,
	Tanins		Thé, raisin
	Anthocyanes		Pigments bleus, rouges, violets, des fruits rouges comme les baies, framboise, cassis, raisin
Lignanes		Sésame, lin	

^[23] Rullier B. (1995).

^[28] Mortimore D. (1998).

II.2.3. Utilisation

Les antioxydants sont employés pour retarder l'oxydation d'une substance organique. Ceci augmente la durée d'utilité ou de conservation de ce matériau. Ils sont largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire sous forme d'additifs ayants des codes de type Exxx, définis par une directive de l'Union Européenne. Ces additifs permettent de faire en sorte que les produits alimentaires conservent leur goût, leur odeur et leur couleur et demeurent longtemps comestibles. Parmi les additifs alimentaires les plus utilisés sont le BHA (E 320) et le BHT (E 321). Ils sont notamment très présent dans les raisins secs, les céréales sèches, le fromage fondu, les chewing-gums, les bonbons, les soupes instantanées, le beurre de cacahuètes... Les antioxydants (minéraux, vitamines, etc...) rentrent dans la composition de certains produits pharmaceutiques. Ils sont également intégrés dans l'industrie cosmétique, en les mélangeant à d'autres ingrédients. De nombreuses gammes de cosmétiques associent dans leur crème des antioxydants reconnus et synthétisés par l'industrie cosmétique : vitamines A, C et E, sélénium. Le BHA et le BHT sont aussi retrouvés dans plusieurs produits de beauté. Ils sont parfois ajoutés dans les emballages pour préserver la fraîcheur des produits.

Néanmoins, l'utilisation des antioxydants synthétiques est actuellement remise en question en raison de leurs risques toxicologiques. D'un point de vue scientifique, il a été démontré que le BHA et le BHT sont des promoteurs de tumeurs [29]. A cet effet, la recherche des antioxydants naturels s'est imposée ces dernières décennies, pour remplacer leurs homologues synthétiques.

II.2.4. Procédés d'obtention

L'extraction des molécules d'intérêt à partir des sites actifs de la matrice végétale est l'étape primordiale qui détermine la nature et la quantité des molécules extraites et par conséquent le succès du produit fini à utiliser. L'extraction des antioxydants naturels est réalisée par les techniques classiques comme la macération [30], l'agitation et l'extraction par Soxhlet. Ces méthodes nécessitent l'utilisation de grandes quantités de solvant, de longues durées d'extraction et une consommation importante d'énergie. De plus, les rendements d'extraction sont faibles et les solvants utilisés sont difficilement séparés des extraits récupérés.

^[29] Kahl, R., Kappus, H. (1993).

^[30] Hernández- Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M.E., Guerrero Legarreta, I. (2009).

L'ensemble de ces inconvénients, ont incité les chercheurs à mettre au point de nouveaux procédés capables d'assurer l'efficacité en termes de productivité, de sélectivité d'exaction et d'économie de temps qui permet un gain au niveau énergétique. Parmi les travaux réalisés dans cette optique, figurent les travaux cités dans le Tableau II.3.

Tableau II.3 : Exemples de techniques innovantes d'extraction des antioxydants naturels.

Technique d'extraction d'antioxydants naturels	Année	Référence
Extraction assistée par ultrasons : Ultrasound-Assisted Extraction (UAE)	2006	[31] Özcan
Extraction par fluides supercritiques : Supercritical fluid extraction (SFE)	2009	[32] Nobre et coll.
Extraction accélérée par solvants : Accelerated Solvent Extraction (ASE)	2010	[33] Herrero et coll.
Pressurised solvent-free microwave assisted extraction (PSFME)	2011	[34] Michel et coll.
Microwave Integrated Soxhlet extraction (MIS)	2013	[27] Meziane Assami et coll.
Microwave Hydrodiffusion and Gravity (MHG)	2013	[35] Al Bittar et coll.

[27] Meziane Assami D., Tomao V., Ruiz K., Meklati B.Y., Chemat F. (2013)

[31] Özcan E. (2006).

[32] Nobre B.P., Palavra A.F., Pessoa F.L.P., Mendes R.L. (2009).

[33] Herrero M., Plaza M., Cifuentes A., Ibáñez E. (2010).

[34] Michel T., Destandau E., Elfakir C. (2011).

[35] Al Bittar S., Issartier S.P., Dangles O., Chemat F. (2013).

Références bibliographiques

- [1] Koul O., Walia S., Dhaliwal G. S. (2008). Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.* 4, 63–84.
- [2] Guignard J.L. (1983). « Abrégé de botanique ». Masson, 5^{ème} édition, Paris. 259.
- [3] Jerkovic I., Radonic A., Borcic I. (2002). Comparative Study of Leaf, Fruit and Flower Essential Oils of Croatian *Myrtus communis* L. Year Vegetative Cycle. *J Essent Oil Res.* 14, 266-270.
- [4] Ghnaya A.B., Chograni H., Messoud C., Boussaid M. (2013). Comparative Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Myrtus communis* L. Essential Oils Isolated from Tunisian and Algerian Population. *J Plant Pathol Microb.* 4: 186 doi:10.4172/2157-7471.1000186.
- [5] Yesil Celiktas O., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., Baser K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100, 553-559.
- [6] Evergetisa E., Michaelakisb A., Haroutouniana S.A. (2013). Exploitation of Apiaceae family essential oils as potent biopesticides and rich source of phellandrenes. *Ind Crop Prod.* 41, 365– 370.
- [7] Zhiri A., Baudoux D. (2005). « Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies ». *Aromathérapie scientifique*. Edition Inspir Development, Luxembourg. 9.
- [8] Farhat A. (2010). « Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application ». Thèse de Doctorat de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & L'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunis).
- [9] Ferhat M.A. (2007). « Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes des huiles essentielles des Citrus d'Algérie : Compréhension, Application et Valorisation ». Thèse de l'USTHB, Algérie.
- [10] Craveiro A.A., Matos F.J.A., Alencar J.W. Plumel M.M. (1989). Microwave oven extraction of an essential oil. *Flavour Frag J.* 4, 43-44.
- [11] Paré J.R.J. (1994). Microwave extraction of volatile oils. American Patent, US 5 338 557.
- [12] Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R. (2004). Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1025, 105-113.

- [13] Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E., Martinez, J.R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatogr. A.* 1025, 93-103.
- [14] Chemat F., Smadja J., Lucchesie M.E. (2004). Solvent Free Micro-wave extraction of volatile natural compounds. European Patent, EP 1 439218 B1.
- [15] Chemat F., Lucchesie M.E., Smadja J. (2004). Solvent Free Microwave Extraction of volatile natural substances. American Patent, US 0187340 A1.
- [16] Wang, Z., Ding, L., Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H., Liu, L., Li, Y., Liu, Z., Wang, H., Zeng, H., He, H. (2006). Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *J. Chromatogr. A.* 1102, 11-17.
- [17] Chemat F., Vian M., Visioni F. (2008). Microwave hydrodiffusion for isolation of natural products. European Patent, EP 1 955 749 A1.
- [18] Sahraoui, N., Abert Vian, M., Bornard, I., Boutekedjiret, C., Chemat, F. (2008). Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils Comparison with conventional steam distillation. *J. Chromatogr. A.* 1210, 229-233.
- [19] Farhat A., Ginies C., Romdhane M., Chemat F. (2009). Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy Experimental and theoretical study. *J. Chromatogr. A.* 1216, 5077-5085.
- [20] Périno-Issartier, S., Ginies, C., Cravotto, G., Chemat, F. (2013). A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *J. Chromatogr. A.* 1305, 41– 47.
- [21] Halliwell, B. (2001). « Free Radicals and other reactive species in Disease ». National University of Singapore. Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group.
- [22] Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999). « Free Radicals in Biology and Medicine ». Third edition. Oxford: Clarendon Press.
- [23] Rullier B. (1995). « L'hygiène alimentaire ». Edition Nathan, Paris.
- [24] Phyllis A. Balch. (2006). « Prescription for Nutritional Healing. A practical A to Z reference to drug free remedies using vitamins, minerals, herbs and food supplements ». Fourth edition. Published by the Penguin Group, USA.
- [25] Aruoma O.I. (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *J Am Oil Chem Soc.* 75, 199-212.
- [26] Denisov E.T., Afanas'ev I.B. (2005). « Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology ». CRC Press Books published by Taylor & Francis Group, USA.

- [27] Meziane Assami D., Tomao V., Ruiz K., Meklati B.Y., Chemat F. (2013). « Plant Extracts: Role in Agriculture, Health Effects and Medical Applications. Chapter 14: Microwave Extraction of Antioxidants from Rosemary Leaves: A Green Approach ». Nova Science Publishers. 327-342.
- [28] Mortimore D. (1998). « En bonne santé par l'alimentation ». Edition française Könemann.
- [29] Kahl R., Kappus H. (1993). Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Z Lebensm Unters Forsch.* 196, 329-38.
- [30] Hernández- Hernández E., Ponce-Alquicira E., Jaramillo-Flores M.E., Guerrero Legarreta I. (2009). Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Sci.* 81, 410-417.
- [31] Özcan E. (2006). « Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace ». Thesis of the Graduate School of Natural and Applied Sciences, Middle East Technical University.
- [32] Nobre B.P., Palavra A.F., Pessoa F.L.P., Mendes R.L. (2009). Supercritical CO₂ extraction of trans-lycopene from Portuguese tomato industrial waste. *Food Chem.* 116, 680-685.
- [33] Herrero M., Plaza M., Cifuentes A., Ibáñez E. (2010). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J. Chromatogr. A.* 1217, 2512–2520
- [34] Michel T., Destandau E., Elfakir C. (2011). Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. *Food Chem.* 126, 1380–1386
- [35] Al Bittar S., Issartier S.P., Dangles O., Chemat F. (2013). An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food Chem.* 141, 3268–3272.

Chapitre III :

Le Romarin

III.1. Description

Le Romarin (Figure III.1), est une plante aromatique persistante de la famille des Lamiacées (ou Labiées), poussant spontanément à l'état sauvage dans les régions méditerranéennes, sur les sols calcaires ensoleillés. Actuellement, il est retrouvé dans d'autres parties du monde [1]. Son nom latin "*Rosmarinus*" signifie "Rosée de Mer". Deux espèces du genre *Rosmanirus* ont été décrites : le *Rosmanirus Tournefortii* de Noé et le *Rosmanirus officinalis* L. Ce dernier est retrouvé dans toute l'Algérie [2] et c'est le plus connu. Il se présente sous forme d'un arbrisseau pouvant atteindre deux mètres de hauteur. Ses feuilles opposées, étroites, linéaires, disposées le long des branches brunes sont vertes en dessus, hispides blanchâtres en dessous, en forme d'aiguilles de deux cm de long environ. Son fruit est un tétrakène lisse et globuleux, de couleur brune. Ses fleurs, présentes en grappes, sont bleues violacées. La floraison commence dès le mois de février, parfois en janvier, et se poursuit jusqu'en avril-mai. Certaines variétés peuvent fleurir une deuxième fois en début d'automne [3].

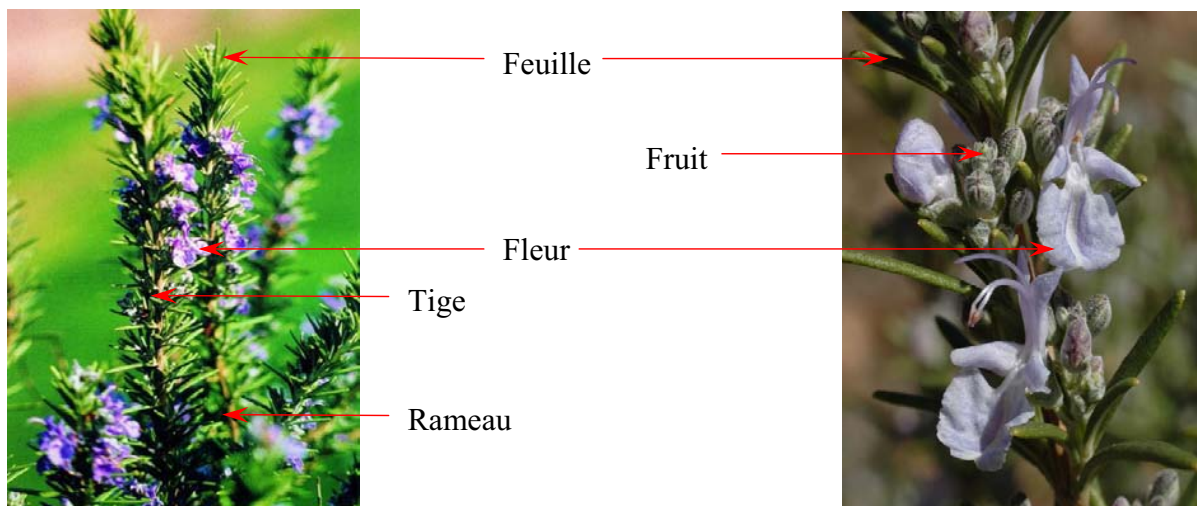


Figure III.1 : Rameaux feuillés à fleurs de Romarin.

Description botanique :

Nom commun : Romarin

Nom vernaculaire arabe : Klil, Hassalban

Règne : Plantae

Classe : Magnoliopsida

Famille : Lamiacées (ou Labiées)

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L.

Nom vernaculaire berbère : Iazir

Division : Magnoliophyta

Ordre : Lamiales

Genre : *Rosmarinus*

[1] Šarić L.Č., Škrinjar M.M., Sakač M.B., Beljkaš B.M., Čabarkapa I.S., Plavšić D.V. (2008).

[2] Quezel P., Santa S. (1963).

[3] McVicar J. (2006).

III.2. Composition chimique

De nombreuses études ont révélé que le *Rosmarinus officinalis* L. communément appelé le Romarin, est une source de plusieurs composés précieux (Tableaux III.1-III.3), dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). Deux groupes de composés sont principalement responsables des activités biologiques du Romarin: la fraction volatile et les composés phénoliques [4].

Tableau III.1 : Valeur nutritive dans 100g de Romarin [12, 13]

100 g de Romarin	
Energie (kcal)	331
Protéines (g)	4,9
Graisse (g)	15,2
CHO total (g)	64,1
Fibres (g)	17,7
Cendres (g)	6,5
Calcium (mg)	1280
Fe (mg)	29
Mg (mg)	220
P (mg)	70
K (mg)	955
Na (mg)	50
Zn (mg)	3
Acide ascorbique (mg)	61
Niacine (mg)	1
Vitamine A (IU)	3 128

[4] Mulinacci N., Innocenti M., Bellumori M., Giaccherini C., Martini V., Michelozzi M. (2011).

[12] Farrell, K. T. (1990).

[13] Peter K.V. (2004).

III.2.1. Huile essentielle

L'huile essentielle de Romarin a fait l'objet d'un grand nombre d'investigations. Elle contient un certain nombre de composés chimiques très complexes et divers, ayant chacun des propriétés différentes. Ces diverses compositions ont été décrites en fonction des constituants majoritaires, sous la désignation d'Huile Essentielle Chémotypée (H.E.C.T) de *Rosmarinus officinalis* L. (Tableau III.2):

- H.E.C.T de *Rosmarinus officinalis* à Camphre (Camphoriferum : Camphre > 20% [5]). Elle contient majoritairement du camphre ayant pour propriétés une action contre les contractures musculaires ou les crampes et des actions anti-inflammatoires [6].
- H.E.C.T de *Rosmarinus officinalis* à 1,8 Cinéole (Cineoliferum). Le composé principal est le 1,8 Cinéole, ayant des propriétés anti-catarrhales et expectorantes. Elle a spécialement des actions antiseptiques pulmonaires et mucolytiques [6].
- H.E.C.T de *Rosmarinus officinalis* à Verbénone (Verbenoniferum : Verbénone > 15% [5]). Cette Huile Essentielle contient majoritairement de la Verbénone avec des propriétés cicatrisantes, bactéricides, expectorantes mucolytiques, cholagogues et hépatodrainantes [6].
- H.E.C.T de *Rosmarinus officinalis* à α -Pinène [7].

Dotée de plusieurs propriétés (antioxydante, antimicrobienne, analgésique, revitalisante,...), l'huile essentielle de Romarin agit comme agent aromatisant et conservateur. Elle est largement utilisée dans les secteurs de l'industrie alimentaire, cosmétique et autre. L'huile essentielle de Romarin contenant 35% de camphre, a été récemment utilisée pour préserver les propriétés sensorielles et chimiques du fromage [8].

[5] Napoli E.M., Curcuruto, G., et Ruberto, G. (2010).

[6] Zhiri A., Baudoux D. (2005).

[7] Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Macchia M., et Ceccarini L. (2002).

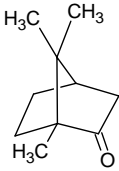
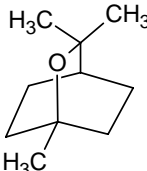
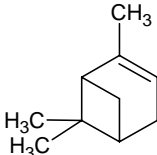
[8] Olmedo R.H., Nepote V, Grosso N.R. (2013).

D'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ont été prouvées pour les huiles essentielles de Romarin. Lopez-Bote et coll [9] ont observé une inhibition significative de l'oxydation des lipides dans la viande de poulet, après administration d'huile de Romarin par voie alimentaire. Elle est aussi employée comme bio-pesticides. Actuellement, les insecticides à base d'huiles essentielles font l'objet d'études pour prendre la place des insecticides chimiques dans le domaine de la phytoprotection. Un insecticide / acaricide à base d'huile de Romarin a été récemment introduit pour une utilisation sur les cultures horticoles sous le nom EcoTrol™. Un autre produit contenant de l'huile de Romarin en tant qu'ingrédient actif, est un fongicide vendu sous le nom de Sporan™ [10].

[9] Lopez-Bote C.J., Gray J.I., Gomaa E.A et Flegal C.J. (1998).

[10] Koul O., Walia S et Dhaliwal G. S. (2008).

Tableau III.2: Huile essentielle chémotypée (H.E.C.T) de Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.)

		H.E.C.T de <i>Rosmarinus officinalis</i> à Camphre (Camphoriferum)	H.E.C.T de <i>Rosmarinus officinalis</i> à Eucalyptol (Cineoliferum)	H.E.C.T de <i>Rosmarinus officinalis</i> à α -Pinène
		Camphre (C ₁₀ H ₁₆ O) 	1,8-Cinéole (eucalyptol : C ₁₀ H ₁₈ O) 	α -Pinène (C ₁₀ H ₁₆) 
Composé majoritaire				
Principaux constituants biochimiques [11]	Monoterpénones (Cétones)	Camphre (39,7%) , verbénone (2,8%)	Camphre (21,7%), verbénone (4,1%)	Camphre (13,2%), verbénone (4,6%)
	Monoterpènes	α -Pinène (8,9%), camphène (5,8%) limonène (3,7%), myrcène (3,2%)	α -Pinène (13,3%), camphène (6%) β -pinène (2,4%), ρ -cymène (2,1%)	α-Pinène (22,3%) , camphène (7,8%), ρ -cymène (3,7%), limonène (3,5%), myrcène (3,1%), α -phellandrène (0,6%), [β -pinène, γ -terpinène, terpinolène, α -terpinène] 0,9% de chaque composé.
		β -pinène (1,8%), ρ -cymène (0,9%) terpinolène (0,9%), γ -terpinène (0,8%), α -terpinène (0,5%), α -phellandrène (0,3%).	limonène (1,9%), myrcène (1,8%) γ -terpinène (0,9%), terpinolène (0,7) α -terpinène (0,7%), α -phellandrène (0,2%)	
	Monoterpénols	Bornéol (4,6%), α -terpinéol (2,3%) linalol (1%), terpinène-4-ol (0,9%).	Bornéol (4,4%), α -terpinéol (3,3%), terpinène-4-ol (1,1%), linalol (0,4%).	Bornéol (5,3%), α -terpinéol (2,9%), linalol (0,8%), terpinène-4-ol (1,3%)
	Oxyde terpénique	1,8- Cinéole (13,6%)	1,8- Cinéole (26,4%)	1,8- Cinéole (20,7%)
	Sesquiterpènes	β -Caryophyllène (2%),	β -Caryophyllène (1,2%),	β -Caryophyllène (0,6%),
Esters terpéniques	Acétate de bornyle (1,4%)	Acétate de bornyle (1,1%)	Acétate de bornyle (0,6%)	
Propriétés organoleptiques	Aspect	Liquide volatil, très fluide, entraînable à la vapeur d'eau, insoluble dans l'eau.		
	Couleur	Incolore à jaune pâle		
	Odeur	Aromatique, herbacée, fraîche		
Densité	0,895 – 0,910	0,907 – 0,920	-	
Point éclair	42°C	42°C	-	

[11] Jordán M.J., Lax V., Rota, M.C., Lorán S., Sotomayor J.A. (2013).

III.2.2. Antioxydants

La première utilisation de l'extrait de feuilles de Romarin comme antioxydant a été rapportée en 1955 par Rac et Ostric-Matijasevic [14]. La production d'un extrait antioxydant de Romarin a fait l'objet de brevets en 1973 par Berner et Jacobson [15] et en 1996 par Inahata et coll. [16] sur la production d'antioxydants inodores et non dangereux de Romarin par extraction répétée. Actuellement, les travaux menés par les chercheurs ont révélé que le Romarin possède d'excellentes propriétés antioxydantes en raison de la nature de ses composés, parmi lesquels les diterpènes phénoliques (Carnosol, acide Carnosique, méthyl Carnosate, Rosmarinol, ..), les acides phénoliques (acide Rosmarinique, acide Cafféique,..) [17], le β -Carotène, l'acide Ascorbique (vitamine C), le Tocophérol et le Sélénium [18]. Après plusieurs études sur les composés isolés du Romarin, des scientifiques ont conclu que l'effet antioxydant d'extraits de Romarin est principalement lié à la conjugaison de l'acide Rosmarinique, de l'acide Carnosique et du Carnosol [19, 20].

Acide Rosmarinique : Ce composé (Tableau III.3) a été nommé acide Rosmarinique par rapport à *Rosmarinus officinalis*, à partir duquel il a été isolé comme composé pur, pour la première fois en 1958 par deux chimistes italiens Scarpati et Oriente [21, 22]. Il est isolé par extraction à partir de plante [23], ou encore produit par un procédé biotechnologique de culture de cellules végétales [24]. Il est connu pour présenter des activités biologiques remarquables: antivirales, antibactériennes, anti-inflammatoires et antioxydantes [22]. Récemment, il a été décrit comme susceptible d'avoir un effet bénéfique sur les intoxications alimentaires, suite au produit innovant de Laurent et coll. (2012), qui se rapporte à l'utilisation de l'acide Rosmarinique et de ses dérivés pour la fabrication d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des intoxications alimentaires par les poissons, en particulier aux intoxications dues aux ciguatoxines (polyéthers liposolubles, thermostables, de faible poids moléculaire, qui font partie des plus puissantes biotoxines marines puisqu'il suffit d'à peine un microgramme pour tuer un homme [25]).

[14] Peter K.V. (2001).

[15] Berner D.L et Jacobson G.A. (1973).

[16] Inahata K., Nakasaki T., Matsumora S et Nakahara T. (1996).

[17] Vázquez E, García-Risco M.R, Jaime L, Reglero G, Fornari T. (2013).

[18] Cseke L.J, Kirakosyan A, Kaufman P.B, Warber S.L, Duke J.A, Briemann H.L. (2006).

[19] Bracco U., Lölliger J., Viret J.L. (1981).

[20] Rodríguez-Rojo S., Visentin A., Maestri D., Cocero M.J. (2012).

[21] Scarpati M.L., Oriente G. (1958).

[22] Petersen M, Simmonds M.S.J. (2003).

[23] Zgorka G., Głowniak K. (2001).

[24] Hippolyte I., Marin B., Baccou J.C., Jonard R. (1992).

[25] Laurent D., Pauillac S., Chinain M., Darius T., Kumar-Roine S. (2012).

Acide Carnosique : C'est un diterpène phénolique répondant à la formule brute $C_{20}H_{28}O_4$ (Tableau III.3). C'est un constituant naturel présent à l'état natif dans le Romarin et la Sauge, où il est localisé principalement dans les feuilles [26]. Il a été trouvé pour la première fois en 1964, par Linde dans la Sauge officinale (*Salvia officinalis*) [27] et en 1965 par Wenkert et coll. dans le Romarin (*Rosmarinus officinalis*) [28]. C'est un composé réactif, très sensible à l'oxydation, et donc très sensible aussi vis-à-vis de toutes les opérations usuellement pratiquées pour l'isolation des substances naturelles (extraction, partition liquide-liquide, fractionnement chromatographique, etc.). En revanche, il a été trouvé que, sous sa forme purifiée et cristallisée, l'acide Carnosique est stable et peut être manipulé sans précautions excessives, mais que son obtention sous forme cristallisée ne peut être réalisée qu'à partir d'une préparation de matériel végétal déjà enrichie en acide Carnosique [26].

En 1969, il a été identifié comme étant un excellent antioxydant naturel [29]. Selon une série de travaux russes, où il porte le nom de « salvine », il a été décrit comme un antibiotique contre *Staphylococcus aureus* et contre certains microorganismes responsables de la carie des dents et de la mauvaise haleine. La littérature le cite au sujet de cette dernière propriété pour la préparation de dentifrices et d'eaux pour les soins de la bouche [26]. Par la suite, en 1994, l'utilisation de l'acide Carnosique pour ses propriétés anticarcinogènes et antivirales a fait l'objet d'une découverte qui concerne l'emploi de ce composé pour la fabrication d'une composition destinée à prévenir ou à traiter le cancer et à traiter l'herpès [26].

Carnosol : C'est un diterpène phénolique possédant la structure présentée dans le Tableau III.3. Ce composé a été isolé pour la première fois en 1942, à partir de la Sauge (*Salvia carnososa*) et sa structure chimique a été mise en évidence en 1964 par Brieskorn et coll. [30]. On estime qu'environ 5% du poids sec des feuilles de Romarin contiennent du Carnosol et de l'acide Carnosique et que cette fraction est responsable de plus de 90% de l'activité antioxydante de la plante [31]. Wenkert et coll. [28] ont montré que le Carnosol est un artefact oxydatif de l'acide Carnosique. Cette oxydation a lieu en présence d'oxygène, après la récolte du Romarin ou de la Sauge, dans les feuilles laissées à sécher à l'air [26].

[26] Aeschbach R., Philipposian G. (1994).

[27] Linde H. (1964).

[28] Wenkert E., Fuchs A., McChesney J.D. (1965).

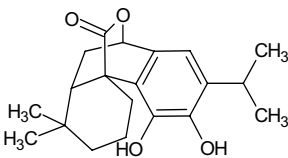
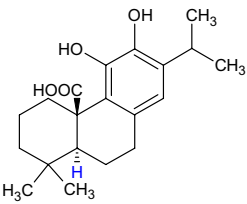
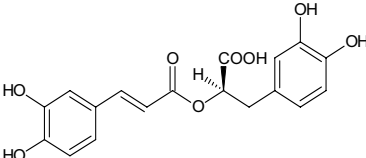
[29] Brieskorn C.H., Dömling H.J. (1969).

[30] Brieskorn C.H., Fuchs A., Bredenberg J. B-son., McChesney J.D., Wenkert Ernest. (1964).

[31] Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R., Lorigers J. (1992).

Plusieurs études répertoriées par J.J. Johnson [32], ont déterminé l'intérêt porté à ce composé par son utilisation potentielle en tant qu'agent anti-cancéreux, anti-inflammatoire prometteur et antioxydant. L'action de ce composé a été étudiée pour la prévention et le traitement du cancer de la prostate [33], le cancer de la peau, le cancer du côlon et la leucémie [32]. En 2011, Goralczyk et coll., [34] ont présenté un produit innovant relatif à une composition orale comprenant du Carnosol, qui améliore l'apparence des cheveux et de la peau et qui possède notamment un effet anti-grisonnant.

Tableau III.3 : Principaux antioxydants du Romarin

Antioxydants naturels			
Composé	Carnosol	Acide Carnosique	Acide Rosmarinique
Synonyme	(7β)-11,12-Dihydroxy-7,20-epoxyabieta-8,11,13-trien-20-one	11,12-Dihydroxyabieta-8(14),9(11),12-trien-20-oic acid	(2R)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) prop-2-enoyl]oxy}propanoic acid
Formule chimique	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
Structure			
Poids moléculaire (g/mol)	330,418	332,433	360,31

III.3. Propriétés du Romarin

Les vertus du Romarin sont multiples. En effet, il possède des propriétés curatives et nutritives prouvée par plusieurs résultats de travaux de recherche :

[32] Johnson J.J. (2011).

[33] Johnson J.J., Syed D.N., Heren C.R., Suh Y., Adhami V.M., Mukhtar H. (2008).

[34] Goralczyk R., Mayne-Mechan A.O., Mohajeri H., Piussi J., Rieger H., Schwager J. (2011).

III.3.1. Activité hépatoprotectrice

Selon les données de l'Institut Européen des Substances Végétales (IESV) de Paris, cet effet du Romarin est lié à la fois à la présence conjuguée d'acide Carnosique, de Carnosol et d'acide Rosmarinique. L'action hépatoprotectrice de l'acide Carnosique et du Carnosol a été observée par leur capacité à maintenir ou à augmenter l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPx) et de la superoxyde dismutase, dont l'activité est diminuée en présence d'un composé toxique [35].

In vivo, le Romarin a montré un effet protecteur vis-à-vis de la stéatose hépatique en diminuant le niveau de triglycérides hépatiques chez des rats nourris avec un régime riche en lipides [36].

III.3.2. Activité détoxiquante

L'organisme humain est fréquemment exposé à des composés potentiellement toxiques et est capable de métaboliser activement de nombreuses substances étrangères à l'organisme, polluants chimiques, médicaments et autres xénobiotiques. L'extrait de Romarin possède une activité détoxiquante, puisque, *in vitro*, après administration de cet extrait par voie alimentaire aux rats, il a été montré que l'extrait de Romarin était l'activateur des enzymes du métabolisme des xénobiotiques dans le foie des rats étudiés [37]. Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, particulièrement les cytochromes P450 (CYP), jouent un rôle central dans la biotransformation, le métabolisme et/ou la détoxification de composés étrangers à l'organisme [38].

III.3.3. Activités cholérétique et cholagogue

Le Romarin est réputé pour activer et faciliter les fonctions digestives, en particulier le travail de la vésicule biliaire. Il est reconnu pour ses effets cholérétiques, facilitant la sécrétion de la bile (liquide participant à la digestion des graisses) et pour ses effets cholagogues, facilitant l'évacuation de la bile vers l'intestin, effets confirmés par l'expérimentation animale [39].

[35] Wijeratne S.S.K., Cuppett S.L. (2007).

[36] Harach T., Aprikian O., Monnard I., Moulin J., Membrez M., Beolor J.C., Raab T., Mace K., Darimont C. (2010).

[37] Debersac P., Vernevaut M. F., Amiot M. J., Suschetet M., Siess, M.H. (2001).

[38] Gueguen Y., Mouzat K., Ferrari L., Tissandie E., Lobaccaro J.M., Batt A.M., Paquet F., Voisin P., Aigueperse J., Gourmelon P. et Souidi M. (2006).

[39] Bruneton J. (2009).

III.3.4. Activité anti-allergique

Chez les patients atteints de Rhino-conjonctivite Allergique Saisonnière (RAS), Les travaux de Takano et coll [40], ont montré, que par comparaison à un placebo, l'acide Rosmarinique diminuerait significativement les symptômes des allergies saisonnières. Un traitement enrichi en acide Rosmarinique a entraîné une augmentation significative des taux de réponse pour le nez qui pique, le larmoiement et le picotement des yeux.

III.3.5. Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de Romarin a été mise en évidence sur différents modèles et avec divers produits alimentaires (lipides, viandes, charcuteries, etc...). Cette activité, est due à l'acide Rosmarinique, au Carnosol et à l'acide Carnosique, dont l'efficacité est supérieure à celle des antioxydants synthétiques actuellement utilisés [39]. En 2006, D'Evoli et coll. [41] ont déterminé le rôle potentiel des extraits de Romarin dans l'inhibition de l'oxydation des stérols végétaux contenus dans l'huile d'olive extra vierge au cours du chauffage. Ils ont conclu que l'action de ces constituants empêchent la formation de composés potentiellement nocifs pour la santé humaine.

L'effet antioxydant de l'acide Rosmarinique a été mis à profit pour inhiber la production de monoxyde d'azote ainsi que celles d'autres molécules réactives de l'oxygène et de l'azote. Dans des macrophages en culture, cet acide éviterait des dommages importants causés par le stress oxydant ou par le vieillissement cellulaire [42].

III.3.6. Activité anti-inflammatoire

Des travaux de recherche ont déduit que le Romarin était capable d'induire un mécanisme avantageux dans la protection cellulaire et dans la résolution de l'inflammation. Les résultats trouvés par Poeckel et coll. [43] indiquent que cette plante, et plus particulièrement ses composés, le Carnosol et l'acide Carnosique, agissent en inhibant l'activation de la 5-lipoxygénase, enzyme qui permet la synthèse des leucotriènes et diminue ainsi les réponses pro inflammatoires dans des leucocytes stimulés.

[40] Takano H., Osakabe N., Sanbongi C., Yanagisawa R., Inoue K.I, Yasuda A., Natsume M., Baba S., Ichiishi E.I., Yoshikawa T. (2004).

[41] D'Evoli L., Huikko L., Lampi A.M., Lucarini M., Lombardi-Boccia G., Nicoli S. et Piironen V. (2006).

[42] Qiao S., Li W., Tsubouchi R., Haneda M., Murakami K., Takeuchi F., Nisimoto Y., Yoshino M. (2005).

[43] Poeckel D., Greiner C., Verhoff M., Rau O., Tausch L., Hornig C., Steinhilber D., Schubert-Zsilavec M., Werz, O. (2008).

III.4. Utilisation

Le Romarin est une herbe condimentaire et une plante mellifère (le miel de romarin est très réputé). Il est cultivé et utilisé depuis l'Antiquité pour conserver les viandes et les salaisons : les gens enveloppaient les viandes dans des feuilles de Romarin à la fois pour les préserver et pour leur donner une saveur particulière. Les Egyptiens l'utilisaient dans le processus de momification et les Romains pour la confection de couronnes et de bouquets dans les cérémonies. C'est un produit fréquemment utilisé en parfumerie et qui possède de nombreuses applications :

III.4.1. Usage médicinal (Phytothérapie)

Dans le domaine médical, le Romarin servait à régler les problèmes respiratoires, gastro-intestinaux et les maux de tête. Les Chinois, pour leur part, le mêlaient au gingembre pour traiter les maux de tête, les indigestions, l'insomnie et la malaria. Plusieurs sociétés accrochaient du Romarin dans les hôpitaux et près des chambres des malades à la fois pour soigner ces derniers et pour éviter la contagion [44].

Les Anciens avaient raison de croire que le Romarin pouvait conserver les viandes puisqu'il contient des antioxydants qui préviennent la dégradation. Ces dernières années, l'utilisation de cette plante a connu un intérêt croissant. La littérature [45] a montré que le Romarin renferme des constituants, tels que les huiles essentielles, les flavonoïdes (Apigénine, Diosmine), les tanins, l'acide Rosmarinique, les diterpènes et la Rosmaricine, auxquels il doit ses actions bienfaisantes: stimulant général, cicatrisant, astringent, stimulant de la sécrétion biliaire, antioxydant et anti-inflammatoire.

- Stimulant cérébral : Le Romarin stimule la circulation cérébrale, améliorant concentration et mémoire. Il soulage également des céphalées et migraines. Il favorise la pousse des cheveux en stimulant l'irrigation du cuir chevelu [45].
- Insuffisance circulatoire : Pour ses propriétés hypertensives, la plante est employée en cas d'évanouissements liés à une insuffisance circulatoire [45].
- Fortifiant : Le Romarin accélère la convalescence à la suite de maladies chroniques ou de stress prolongé. Il stimulerait les glandes surrénales et se révélerait très efficace dans le traitement de l'asthénie [45].
- Stimulant psychique : Le Romarin est souvent prescrit pour les personnes surmenées et fatiguées. Il est apprécié pour ses propriétés stimulantes et légèrement antidépressives [45].

^[44] Jourdain D. (1997).

^[45] Encyclopédie des plantes médicinales. (2001).

- En lotion, il soulage des douleurs rhumatismales [45].

III.4.2. Usage alimentaire

Le Romarin est relativement peu employé en cuisine en Afrique du Nord, au Portugal et en Espagne, mais les cuisines britannique et italienne en font un usage abondant. Il sert à aromatiser les viandes, les sauces, les fruits de mer, les plats à base de légumes, etc... [46].

L'industrie agroalimentaire a découvert les puissantes propriétés antioxydantes et conservatrices du Romarin. Ce dernier pourrait en effet remplacer les antioxydants de synthèse utilisés pour la conservation des aliments, suspectés d'être cancérigènes et responsables de lésions hépatiques [47].

III.4.3. Utilisation comme bio pesticide

Actuellement, les scientifiques sont en cours de recherche des alternatives de lutte pour remplacer les pesticides organiques de synthèse par des biopesticides végétaux biodégradables et respectueux de l'environnement. Le Romarin a fait l'objet de récentes recherches dans ce domaine. L'efficacité des huiles essentielles par contact sur les insectes des denrées stockées a été mise en valeur par de nombreux auteurs, parmi lesquels Papachristos et coll. [48]. L'étude de ces derniers a permis de mettre en exergue la bioactivité insecticide efficace de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. sur l'*Acanthoscelides obtectus*, un insecte ravageur des haricots secs.

III.4.4. Utilisation en cosmétique

D'un point de vue cosmétique, le Romarin est réputé pour apporter dynamisme et beauté à la peau et aux cheveux. Il est utilisé pour guérir l'acné, pour lutter contre les pellicules, pour donner une couleur noire aux cheveux et pour améliorer la pousse des cheveux. Ses huiles rentrent dans la composition des savons, des déodorants, des parfums, des lotions pour la peau et des shampooings pour cheveux [13].

[13] Peter K.V. (2004).

[45] Encyclopédie des plantes médicinales. (2001).

[46] Chemonics International Inc. (2006).

[47] Wang W., Weng X., Cheng D. (2000).

[48] Papachristos D.P., Stamopoulos D.C. (2002).

III.5. Commercialisation du Romarin

Actuellement, certains pays s'intéressent à l'exploitation du Romarin, suite à l'importance commerciale prise par ses substances actives, ce qui a contribué à l'émergence de nombreuses sociétés qui se sont spécialisées dans la production et dans la commercialisation d'extraits végétaux naturels, à destination des industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Parmi celles-ci, nous citerons, Naturex, qui a lancé en 1996 auprès de l'Union Européenne, le processus d'enregistrement des extraits de Romarin en tant qu'antioxydants alimentaires. Elle a investi dans les études toxicologiques et a appuyé l'ensemble de la procédure en collaboration avec deux autres producteurs, Raps et Robertet, les trois entreprises constituant l'E.R.E.M.G. (European Rosemary Extracts Manufacturers Group), qui emploie 900 personnes et qui dispose de 11 usines réparties en Europe (France, Italie, Espagne, Suisse et Angleterre), aux USA (New Jersey et en Californie), au Brésil, en Australie et au Maroc. Ce dernier pays dispose d'un potentiel d'environ 1 million d'hectares de Romarin et produit environ 60 tonnes d'huiles essentielles et 15 000 à 20 000 tonnes de feuilles séchées dudit produit. Le Romarin a pu résister aux conditions de sécheresse et à la pression des exploitants et présente un intérêt économique certain pour les populations de la région. Un hectare de Romarin bien géré peut rapporter respectivement plus que l'équivalent de 35 et 70 quintaux de blé, [46]. L'Espagne est le plus gros exportateur de Romarin [13]. Les commandes en feuilles séchées sur le marché international avaient débuté en 1998 pour servir à des extractions autres que les huiles essentielles et principalement pour les antioxydants. Dés lors, les adjudicataires des lots de Romarin utilisent une quantité importante de la biomasse exploitée sous forme de feuilles séchées [46]. Les prix de vente (Tableau III.4) du Romarin et de ses constituants sont variables d'une année à une autre et tous dépendent de la concurrence et des commandes sur le marché international.

Tableau III.4 : Prix de vente de quelques produits de Romarin

	Quantité	Prix (euro)	Année	Origine
Acide Carnosique	5 mg	284,50	2014	Supelco
Acide Rosmarinique	10 mg	34,00	2014	Supelco
Carnosol	10 mg	109,50	2014	Supelco
Extrait de Romarin (additif alimentaire E392)	1 Kg	200	2014	Nulent Chem
Huile essentielle de Romarin	1 L	43	2014	Aromazone

III.6. Toxicité

Le Romarin peut s'avérer extrêmement toxique à certaines doses non recommandées. Son utilisation est déconseillée au cours de la grossesse et durant l'allaitement. Il est également déconseillé pour les personnes atteintes d'hypertension, d'insomnie ou d'épilepsie. Il peut provoquer certaines réactions allergiques, telles que l'irritation de la peau, les irritations stomacales et intestinales [13, 44].

^[13] Peter K.V. (2004).

^[44] Jourdain D. (1997).

Références bibliographiques

- [1] Šarić L.Č., Škrinjar M.M., Sakač M.B., Beljkaš B.M., Čabarkapa I.S., Plavšić D.V. (2008). An effect of the rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the production of Aflatoxin B₁ *Aspergillus flavus*. *Food Processing, Quality and Safety*. 4, 169-173.
- [2] Quezel P., Santa S. (1963). « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ». Tome II. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. 793.
- [3] McVicar J. (2006). « Le Grand Livre des Herbes ». Editions de Borée. 288.
- [4] Mulinacci N., Innocenti M., Bellumori M., Giaccherini C., Martini V., Michelozzi M. (2011). Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. *Talanta*. 85, 167–176
- [5] Napoli E.M., Curcuruto G., Ruberto G. (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. *Biochem Syst Ecol*. 38, 659-670.
- [6] Zhiri A., Baudoux D. (2005). « Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies ». *Aromathérapie scientifique*. Edition Inspir Development, Luxembourg. 9.
- [7] Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Macchia M., Ceccarini L. (2002). Main Agronomic-Productive Characteristics of Two Ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and Chemical Composition of Their Essential Oils. *J. Agric. Food Chem*. 50, 3512–3517.
- [8] Olmedo R.H., Nepote V, Grosso N.R. (2013). Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT - Food Sci Technol*. 53, 409-417.
- [9] Lopez-Bote C.J., Gray J.I., Gomaa E.A., Flegal C.J. (1998). Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat. *Br Poult Sci*. 39, 235-240.
- [10] Koul O., Walia S., Dhaliwal G. S. (2008). Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int*. 4, 63–84.
- [11] Jordán M.J., Lax V., Rota M.C., Lorán S., Sotomayor J.A. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control*. 30, 463-468.
- [12] Farrell K. T. (1990). « Spices, Condiments and Seasonings ». Second edition. AVI book, Van Nostrand Reinhold, New York.
- [13] Peter K.V. (2004). « Handbook of herbs and spices ». Volume 2. Woodhead Publishing in Food Science and Technology. Abington Cambridge CB1 6AH, England. p.365.
- [14] Peter K.V. (2001). « Handbook of herbs and spices ». Volume 1. Chapter 23: Rosemary and sage as antioxidants. Publishing Limited, Abington, England. 332.

- [15] Berner D.L., Jacobson G.A. (1973). Spice antioxidant principle and process for the extraction thereof. US Patent, 3 732 111.
- [16] Inahata K., Nakasaki T., Matsumora S et Nakahara T. (1996). Odorless and safe antioxidants derived from rosemary and their preparation, Jpn Kokai Tokkyo Koho JP, 08 67 874.
- [17] Vázquez E., García-Risco M.R., Jaime L., Reglero G., Fornari T. (2013). Simultaneous extraction of rosemary and spinach leaves and its effect on the antioxidant activity of products. J Supercrit Fluid. 82, 138-145
- [18] Cseke L.J, Kirakosyan A, Kaufman P.B, Warber S.L, Duke J.A, Brielmann H.L. (2006). « Natural Products from Plants ». Second Edition by Taylor & Francis Group, LLC.
- [19] Bracco U., Lölliger J., Viret J.L. (1981). Production and use of natural antioxidants. J Amer Oil Chem Soc. 58, 686–90.
- [20] Rodríguez-Rojo S., Visentin A., Maestri D., Cocero M.J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. J Food Eng. 109, 98–103.
- [21] Scarpati M.L., Oriente G. (1958). Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus off.*). Ric. Sci. 28, 2329–2333.
- [22] Petersen M, Simmonds M.S.J. (2003). Rosmarinic acid. Phytochemistry. 62. pp. 121-125.
- [23] Zgorka G., Głowniak K. (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. J Pharmaceut Biomed. 26, 79–87.
- [24] Hippolyte I., Marin B., Baccou J.C., Jonard R. (1992). Growth and rosmarinic acid production in cell suspension cultures of *Salvia officinalis* L. Plant Cell Rep. 11, 109–112.
- [25] Laurent D., Pauillac S., Chinain M., Darius T., Kumar-Roine S. (2012). Utilisation de l'acide rosmarinique et de ses dérivés pour traiter la ciguatéra. Brevet international, WO 2011012780 A1.
- [26] Aeschbach R., Philipposian G. (1994). Utilisation de l'acide carnosique pour ses propriétés anticarcinogènes et antivirales. Brevet, EP 0582318 A1.
- [27] Linde H. (1964). Ein neues Diterpen aus *Salvia officinalis* L und eine Notiz zur Konstitution von Pikrosalvin. Helv Chim Acta. 47, 1234–1239.
- [28] Wenkert E., Fuchs A., McChesney J.D. (1965). Chemical Artifacts from the Family Labiatae. J. Org. Chem. 30, 2931-2934.
- [29] Brieskorn C.H., Domling H-J. (1969). Carnosolsäure, der wichtige antioxidativ wirksame Inhaltsstoff des Rosmarin- und Salbeiblattes. Z Lebensm Unters Forsch. 141, 10–16.
- [30] Brieskorn C.H., Fuchs A., Bredenber J. B-son., McChesney J.D., Wenkert Ernest. (1964). The Structure of Carnosol. J. Org. Chem. 29, 2293–2298.

- [31] Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R., Loligers J. (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*. 22, 257–268.
- [32] Johnson J.J. (2011). Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Lett*. 305, 1–7.
- [33] Johnson J.J., Syed D.N., Heren C.R., Suh Y., Adhami V.M., Mukhtar H. (2008). Carnosol, a dietary diterpene, displays growth inhibitory effects in human prostate cancer PC3 cells leading to G2-phase cell cycle arrest and targets the 50-AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway. *Pharm Res*. 25, 2125–2134.
- [34] Goralczyk R, Mayne-Mechan A.O, Mohajeri H, Piussi J, Rieger H, Schwager J. (2011). Carnosol pour les soins capillaires et cutanés. Brevet, WO 2011018477 A3.
- [35] Wijeratne S.S.K., Cuppett S.L. (2007). Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Diterpenes in Preventing Lipid Hydroperoxide-Mediated Oxidative Stress in Caco-2 Cells. *J. Agric. Food Chem*. 55, 1193–1199.
- [36] Harach T., Aprikian O., Monnard I., Moulin J., Membrez M., Beolor J.C., Raab T., Mace K., Darimont C. (2010). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Leaf Extract Limits Weight Gain and Liver Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet. *Planta Med*. 76, 566-571.
- [37] Debersac P., Vernevaut M. F., Amiot M. J., Suschetet M., Siess, M.H. (2001). Effects of a watersoluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Food Chem Toxicol*. 39, 109-117.
- [38] Gueguen Y., Mouzat K., Ferrari L., Tissandie E., Lobaccaro J.M., Batt A.M., Paquet F., Voisin P., Aigueperse J., Gourmelon P., Souidi M. (2006). Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance. *Ann Biol Clin*. 64, 535-48.
- [39] Bruneton J. (2009). « Composés phénoliques: phénols, acides phénoliques. Dans: Pharmacognosie : Phytochimie. Plantes médicinales ». 4^{ème} édition. Lavoisier. 285-288.
- [40] Takano H., Osakabe N., Sanbongi C., Yanagisawa R., Inoue K.I., Yasuda A., Natsume M., Baba S., Ichiishi E.I., Yoshikawa T. (2004). Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Exp Biol Med*. (Maywood.) 229, 247-254.
- [41] D'Evoli L., Huikko L., Lampi A.M., Lucarini M., Lombardi-Boccia G., Nicoli S. et Piironen V. (2006). Influence of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on plant sterol oxidation in extra virgin olive oil. *Mol. Nutr. Food Res*. 50, 818 – 823.
- [42] Qiao S., Li W., Tsubouchi R., Haneda M., Murakami K., Takeuchi F., Nisimoto Y., Yoshino M. (2005). Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radic. Res*. 39, 995-1003.

- [43] Poeckel D., Greiner C., Verhoff M., Rau O., Tausch L., Hornig C., Steinhilber D., Schubert-Zsilavec M. Werz, O. (2008). Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol.* 76, 91-97.
- [44] Jourdain D. (1997). « Dictionnaire des plantes médicinales. Editions Quebecor ». 166. ISBN, 276400107X, 9782764001073.
- [45] « Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparation, soins ». (2001). Editeur, LAROUSSE. ISBN, 2-03-560252-1.
- [46] Chemonics International Inc. Projet filière des plantes aromatiques et médicinales. (2006). Soumis à l'agence Américaine pour le développement international.
- [47] Wang W., Weng X., Cheng D. (2000). Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chem.* 71, 45-49.
- [48] Papachristos D.P., Stamopoulos D.C. (2002). Toxicity of vapours of three essential oils to the immature stages of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.* 38, 365-373.

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV :
Matériel et méthodes

IV.1. Réactifs et solvants

Les produits chimiques utilisés dans les différentes investigations, ainsi que leur origine et pureté, sont présentés dans le Tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Caractéristiques des produits chimiques utilisés

Produit chimique	Formule	CAS	Pureté (%)	M (g/mol)	Fournisseur
Acétonitrile	CH ₃ CN	75-05-8	99,9	41,05	PAI-ACS
Acide acétique	C ₂ H ₄ O ₂	64-19-7	≥ 99,7	60,05	Sigma-Aldrich
Acide ascorbique	C ₆ H ₈ O ₆	50-81-7	99	176,12	Sigma-Aldrich
Acide carnosique	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	3650-09-7	≥ 97	332,43	Sigma-Aldrich
Acide chlorhydrique	HCl	7647-01-0	37	36,46	Sigma-Aldrich
Acide formique	CH ₂ O ₂	64-18-6	99,99	46,03	VWR
Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅	149-91-7	97,5	170,12	Sigma-Aldrich
Acide rosmarinique	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	20283-92-5	96	360,31	Sigma-Aldrich
Acétate de sodium trihydraté	C ₂ H ₃ NaO ₂ ·3H ₂ O	6131-90-4	≥ 90	136,08	Sigma-Aldrich
BHT	C ₁₅ H ₂₄ O	128-37-0	99	220,35	Sigma-Aldrich
Carbonate de sodium	Na ₂ CO ₃	497-19-8	99,5	105,99	Sigma-Aldrich
Carnosol	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	5957-80-2	95	330,42	Sigma-Aldrich
Chlorure ferrique hexahydraté	FeCl ₃ ·6H ₂ O	10025-77-1	97	270,29	Sigma-Aldrich
DPPH	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	1898-66-4	-----	394,32	Sigma-Aldrich
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	64-17-5	≥ 98	46,07	VWR
Folin-Ciocalteu	-----	-----	-----	-----	Sigma-Aldrich
Méthanol	CH ₃ OH	67-56-1	≥ 99,8	32,04	VWR
TPTZ	C ₁₈ H ₁₂ N ₆	3682-35-7	≥ 99	312,33	Fluka

BHT : Buthylhydroxytoluène.

DPPH : Diphényl picryl hydrazyl.

TPTZ : 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine

IV.2. Matière végétale

Les feuilles de Romarin (*Rosmarinus officinalis*) sont le matériel végétal étudié dans ce travail. Des quantités suffisantes (en moyenne 10 kg) nécessaires pour effectuer plusieurs extractions de Romarin ont été recueillies dans seize régions d'Algérie au mois de Mai 2010, (Figure IV.1). Les feuilles de Romarin récoltées dans la même période, ont été séchées dans un même endroit à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure IV.1 : Carte géographique d'Algérie montrant les sites de récolte

Tableau IV.2 : Présentation du Romarin étudié

Plante étudiée	
Famille	Lamiaceae
Nom vernaculaire	Rosmarin
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
Origine	Méditerranéenne
Culture	Spontanée
Taille	60 à 100 cm
Partie utilisée	Feuilles

Le taux d'humidité du Romarin récolté dans les seize régions a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constat.

La teneur en eau est donnée par la formule ci dessous :

$$Hu\% = \frac{m_f - m_s}{m_f} \times 100$$

m_f : masse de Romarin frais

m_s : masse de Romarin sec

$Hu\%$: Taux d'humidité exprimé en pourcentage

IV.3. Echantillonnage

Le prélèvement de Romarin a été effectué à l'aide d'un sécateur, en laissant assez de tige, ce qui permettra à la plante de reprendre une bonne croissance. Le Romarin a été cueilli dans son stade de floraison dans seize sites d'échantillonnages (Figure IV.1), ayant des situations géographiques et des conditions climatiques différentes. Le climat joue un rôle important sur la répartition des plantes. Emberger [1, 2] a particulièrement souligné ce rôle en ce qui concerne la végétation méditerranéenne. Ses recherches l'on conduit à une méthode originale de caractérisation de bioclimat [3]. Désirant étudier la gamme de types de climat de la région méditerranéenne, Emberger [1] a proposé un coefficient faisant intervenir trois éléments fondamentaux, la pluie, la température et l'évaporation. La pluie a été représentée par P , total en mm des précipitations annuelles moyennes. Pour la température, il est important de tenir compte du fait que la vie de la végétation doit se dérouler entre deux extrêmes thermiques que l'on peut caractériser par la moyenne (m) des minima du mois le plus froid et par la moyenne (M) des maxima du mois le plus chaud. Ainsi le facteur température est convenablement représenté par la valeur $\frac{m+M}{2}$. Quant à l'évaporation, comme elle n'est qu'exceptionnellement mesurée et qu'il faut alors l'évaluer, il est plus commode de se servir de l'amplitude extrême ($M-m$), formule approchée, simple, qui varie assez souvent comme elle [4].

[1] Emberger L. (1930).

[2] Emberger L. (1971).

[3] Djellouli Y., Daget Ph. (1988).

[4] Sauvage Ch. (1963)

D'où le quotient pluviothermique proposé par Emberger [5] :

$$Q_2 = \frac{1000P}{(M-m)\frac{M+m}{2}} = \frac{2000P}{M^2 - m^2}$$

p : Pluviométrie moyenne annuelle (mm)

M : Moyenne des températures maximales du mois le plus chaud (en °C).

m : Moyenne des températures minimales du mois le plus froid (en °C).

Emberger a proposé une synthèse graphique qui consiste à porter sur un plan à coordonnées rectangulaires (Climagramme pluviothermique d'EMBERGER, Figure IV.2) les valeurs de m en degré Celsius en abscisse et les valeurs du quotient Q en ordonnée. A chaque localité correspond alors un point de ce plan, qui définit, dans la région où il se trouve, le climat correspondant [4]. Les étages bioclimatiques de végétation retenus [6] sont les suivants:

- étage saharien (ou per-aride)
- étage aride
- étage semi-aride (ou sub-aride)
- étage sub-humide
- étage humide (ou humide inférieur)
- étage per-humide (ou humide supérieur).

[5] Emberger L. (1955).

[6] Daget Ph. (1977).

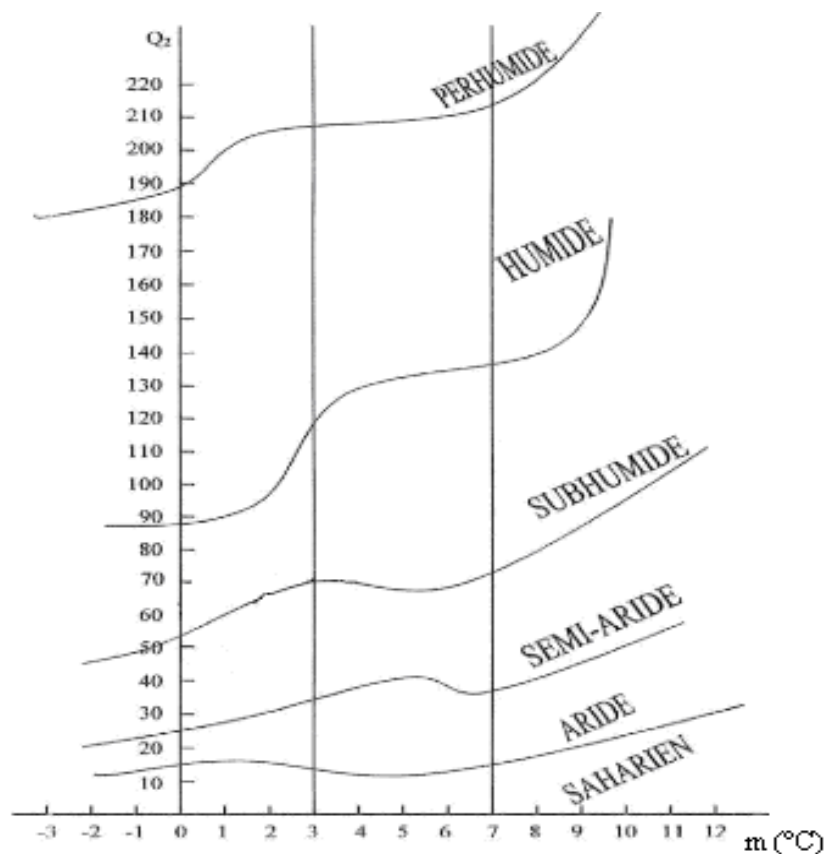


Figure IV.2 : Climagramme pluviothermique d'Emberger

IV.4. Etude des huiles essentielles

IV4.1. Extraction des huiles essentielles de Romarin de différentes régions

250 g de matière végétale (feuilles fraîches de Romarin de chaque région) dans 2,5 L d'eau distillée sont soumis à une extraction conventionnelle par hydrodistillation (HD) à pression atmosphérique en utilisant l'appareil de Clevenger [7] modifié (Figure IV.3). Après 3 heures d'extraction, l'huile essentielle (HE) est récupérée et ensuite stockée à 4°C.

Après plusieurs extractions reproductives, les rendements d'extraction des HE obtenues sont calculés comme décrit ci-dessous :

$$\text{Huile essentielle extraite (\%)} = \frac{m_{HE}}{m_{plante}} \cdot 100$$

m_{HE} : Masse d'huile essentielle obtenue après extraction (g).

m_{plante} : Masse de la plante pesée (g).

[7] Clevenger J.F. (1928).

Le suivi du rendement d'extraction au cours du temps a été mené pour des durées successives de 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, et 210 min après l'obtention de la première goutte d'huile.

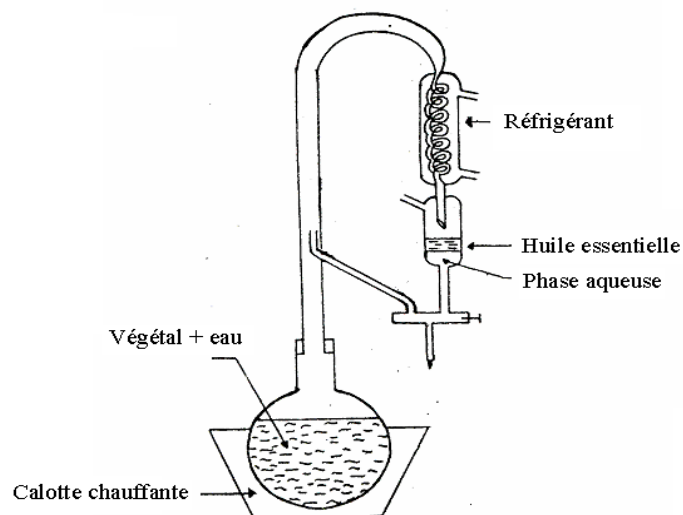


Figure IV.3 : Schéma du montage d'hydrodistillation sur un appareil de Clevenger modifié.

IV.4.2. Analyse par CPG et CPG/SM

Les huiles essentielles de Romarin récupérées ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) seule et par couplage de celle-ci à la spectrométrie de masse (CG/SM). L'analyse par CG/SM a été réalisée en mode impact électronique IE (bombardement d'électrons à 70 eV), dans le mode Full Scan, le Courant Ionique Total (TIC, Total Ion Current), étant utilisé pour identifier les composés présents dans les échantillons d'essences étudiées. Chaque pic chromatographique peut donner généralement lieu à un spectre de masse caractéristique de la structure du composé.

L'identification des composés des huiles essentielles analysées a été effectuée par :

1/- Comparaison de leurs indices de rétention (mesurés en programmation de température) déterminés en référence à la série homologue des n-alcanes C₅-C₂₈ (origine: Aldrich et Fluka Chemicals) injectée en CPG sous les mêmes conditions opératoires que celles des huiles.

Les indices de rétention ont été calculés par la formule [8] suivante :

$$I_R = 100 \frac{(tr)_i - (tr)_n}{(tr)_{n+1} - (tr)_n} + 100n$$

[8] Van Den Dool H., Kratz P.D. (1963).

Où :

I_R : Indice de rétention du soluté considéré.

$(tr)_i$: Temps de rétention du soluté considéré.

$(tr)_n$: Temps de rétention de l'alcane contenant "n" atomes de carbone et dont le pic précède celui du soluté.

$(tr)_{n+1}$: Temps de rétention de l'alcane contenant "n+1" atomes de carbone et dont le pic sort après celui du soluté.

n et n+1: Nombre de carbones des n-alcane.

2/- Comparaison de leurs spectres de masse caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux cités dans la littérature [9] et/ ou inventoriés dans les banques de bibliothèques spectrales (Wiley7, Nist 2002).

Les conditions analytiques utilisées en CPG et en CG/SM sont présentées dans les Tableaux IV.3 et IV.4 ci-dessous.

Tableau IV.3 : Conditions opératoires de l'analyse par CPG

Appareil	Chromatographe en phase gazeuse, Hewlett Packard 6890 plus, Agilent Technologies, USA, 2000
Détecteur	Ionisation de flamme
Injecteur	Auto injecteur HP7683 B
Mode d'injection	Split (1/20)
Colonne capillaire en silice fondue	HP5MS TM (30m x 0,32 mm x 0,32 μ m)
	Stabilwax ^R (60m x 0,25 mm x 0,25 μ m)
Gaz vecteur	Azote
Température de l'injecteur	250°C
Température du détecteur	280°C
Température de la colonne	50 °C (3min) _____ / 2°C/min _____ 250 °C (15 min)
Quantité injectée	1 μ L
Débit du gaz vecteur	1,2 mL/min

[9] Adams R.P. (1995).

Tableau IV.4 : Conditions opératoires de l'analyse par CG/SM.

Appareil	Chromatographe en phase gazeuse, CG (Hewlett Packard 6890 plus) couplé au spectromètre de masse SM (5973A), (CG/SM, Agilent, CA, USA, 2000)
Spectromètre de masse	Mode impact électronique (Mass Selective Detector) MSD : 5973A- EI
Injecteur	Auto injecteur ALS HP7863 B
Mode d'injection	Split (1/20)
Colonne capillaire en silice fondue	HP5MS TM (30m x 0,32 mm x 0,32 µm) Stabilwax ^R (60m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Gaz vecteur	Hélium
Potentiel d'ionisation	70 eV
Température de la source	230 °C
Température du quadripôle	150 °C
Température de l'auxiliaire	280 °C
Température de l'injecteur	250°C
Température de la colonne	50 °C (3min) _____ / 2°C/min _____ 250 °C (15 min)
Quantité injectée	1µL
Débit du gaz vecteur	1,2 mL/min

IV.4.3. Analyse par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Afin d'observer l'état des cellules sécrétrices de la plante, avant et après l'extraction, les feuilles de Romarin en provenance de l'INA ont été analysées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). Ce type d'analyse a été réalisé à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage de marque Philips XL30.

Les feuilles de Romarin, recueillies avant et après l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation ont été fixées sur un dispositif métallique, traitées à l'azote liquide et coupées au scalpel. Elles ont été ensuite enrobées avec de l'or dans un appareil de pulvérisation de type Balzers SCD 004 pour obtenir une couche de l'ordre de 10 nm. L'observation des échantillons a été effectuée sous vide avec une accélération du voltage de 10kV et en manoeuvrant à une distance de l'ordre de 15 mm.

IV.5. Etude des antioxydants

IV.5.1. Extraction des antioxydants de Romarin de différentes régions

Les feuilles de Romarin de chaque région ont été séchées à température ambiante dans un endroit sec et aéré à l'ombre pour mieux conserver les molécules sensibles à la chaleur et à la lumière. Le taux d'humidité final est de l'ordre de 8 %. Les feuilles séchées ont été broyées dans un moulin électrique de type blender. Le broyat va constituer la matière sèche qui va servir à l'extraction des antioxydants. Pour une meilleure fiabilité des résultats, les extractions ont été reprises trois fois.

Cinq grammes de poudre de feuilles de Romarin séchées ont été soumis à l'extraction avec 50 mL d'un mélange méthanol / eau (80:20, v/v) pendant 2 minutes sous agitation à l'Ultra Turrax. L'extrait est filtré à travers un filtre Wathman de porosité 0,45µm et le résidu obtenu a été repris pour une deuxième fois avec 50 ml de mélange méthanol / eau (80:20, v/v) durant le même temps. L'extrait global est évaporé à sec sous évaporateur rotatif (Rotavac Labo), sous vide et à la température de 40°C. L'extrait eau/alcool est alors pesé, puis dissous dans 5 mL de solution méthanolique (80:20, v/v) afin d'être conservé jusqu'à l'utilisation à -10°C, à l'abri de la lumière.

IV.5.2. Analyse par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (CLHP)

Les extraits d'antioxydants de Romarin des seize régions d'Algérie, ont été analysés par CLHP en utilisant le chromatographe liquide de marque Waters (Milford, MA, USA), équipé d'une pompe Waters 600, d'un auto injecteur Waters 717 et d'un détecteur à barrette de diodes Waters 996. Le contrôle de la pompe, de l'auto injecteur, de la température de la colonne et du système à barrette de diodes est effectué par le logiciel Waters Empower. Les longueurs d'ondes utilisées pour l'identification et la quantification des polyphénols du Romarin sont 284 et 330 nm.

La séparation chromatographique a été réalisée sur deux colonnes placées en série, de type Chromolit Merck performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm d.i). La phase mobile dont le débit est de 4 mL/min, est constituée de deux solvants A et B, dont la programmation utilisée est présentée dans le Tableau IV.5. Le volume de l'extrait injecté est de 20 µL.

- solvant A : solution aqueuse (pour CLHP) contenant 0,5 % d'acide formique,
- solvant B : 100 % Acétonitrile.

Tableau IV.5: Programmation (1) des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse CLHP

Temps (min)	Solvant A %	Solvant B %
0	90	10
13	0	100
14	0	100
18	90	10
19	90	10

Les antioxydants retrouvés dans les extraits analysés ont été quantifiés par étalonnage externe, en utilisant trois étalons (le Carnosol, l'acide Rosmarinique et l'acide Carnosique) préparés pour chaque étalon, par dilution de la solution mère. Les analyses sont tri-répliquées et la moyenne seule est reportée.

IV.6. Application d'un nouveau procédé d'extraction d'antioxydants

Parmi les échantillons des seize régions d'étude, le Romarin le plus riche en antioxydants a été sélectionné pour être extrait par deux méthodes comparatives : l'une traditionnelle (Soxhlet) et l'autre innovante (Soxhlet assisté par micro-ondes), que nous décrivons ci-dessous :

IV.6.1. Extraction conventionnelle

La méthode du Soxhlet, utilisée depuis longtemps, est une technique standard qui sert principalement de référence pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. L'extraction par Soxhlet est une technique générale et bien établie, qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction [10], exception faite de l'extraction des composés thermolabiles [11]. Dans notre cas, cette méthode a servi de référence pour la détermination de la teneur en antioxydants. Elle a été réalisée comme suit : 15 g de poudre de feuilles de Romarin séchées, de la région d'Alger (L1 : INA) ont été mis dans une cartouche en cellulose (33mm x 100mm) placée dans l'extracteur Soxhlet (Figure IV.4). Ce dernier est muni d'un réfrigérant puis positionné sur un ballon de distillation (500 mL de capacité) contenant 300 mL de mélange éthanol / eau (80:20, v / v). La cartouche contenant la matrice végétale a été recouverte de coton de manière à éviter le transfert de particules de l'échantillon solide vers le ballon de distillation.

^[10] Wang L and Weller C L (2006).

^[11] Luque de Castro M.D., Garcia-Ayuso L.E. (1998).

L'échantillon solide est alors extrait sous reflux pendant 10 h. Après l'extraction, le solvant riche en substances extraites a été récupéré dans le ballon de l'évaporateur rotatif pour être évaporé à sec, sous vide, à 40 °C. L'extrait ainsi récupéré a été pesé et conservé dans l'obscurité à -10°C jusqu'à l'analyse.

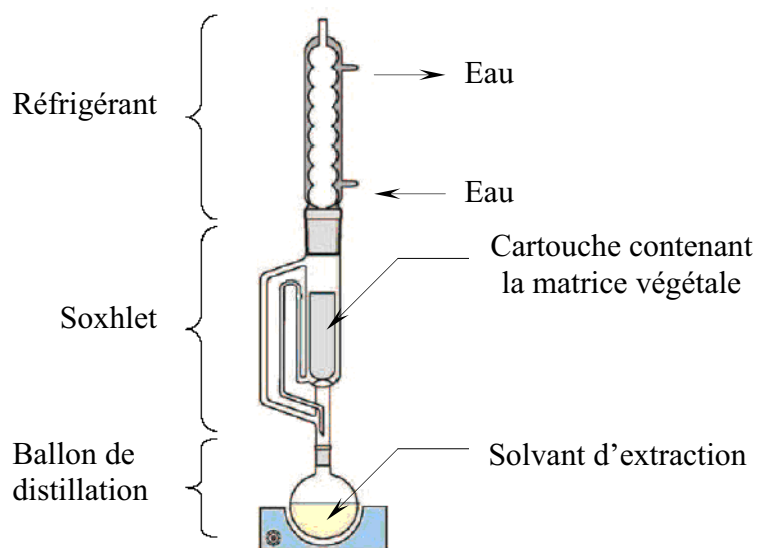


Figure IV.4 : Extracteur Soxhlet [12]

IV.6.2. Extraction innovante : Extraction par Soxhlet Assistée par Micro-ondes (SAM)

L'extraction par Soxhlet Assistée par Micro-ondes (SAM) a été réalisée pour la première fois en 2007 par Virot et coll [13] pour l'extraction des matières grasses alimentaires. Dans cette étude, cette nouvelle méthode a été appliquée et optimisée pour l'isolation des antioxydants naturels. Le schéma du dispositif expérimental utilisé pour ce type d'extraction est présenté dans la Figure IV.5. Il est composé de quatre éléments principaux :

1/ Un four à micro-ondes DRY-DIST (Milestone, Bergame, Italie), dont la puissance maximale délivrée est de 1000 W (variable par incrément de 10 W) par l'intermédiaire de deux magnétrons de 800 W fonctionnant à une fréquence de 2,45 GHz. Au cours de l'extraction, le temps et la température peuvent être contrôlés par le logiciel « Easy-Wave ».

[12] Virot M. (2009).

[13] Virot M, Tomao V, Colnagui G, Visinoni F, Chemat F (2007).

2/ Un réacteur en verre de type pyrex (1) adapté aux micro-ondes et permettant la mise en solution de la matrice étudiée (2) dans le solvant d'extraction (4a). Ce réacteur est muni d'un support en Téflon poreux (3) transparent aux micro-ondes, placé à une distance bien définie du fond du réacteur et sur lequel est mis le matériel à extraire. La partie située en dessous de ce support permet l'addition d'un agitateur magnétique (13) en Téflon ou en Weflon™, qui tourne dans le fond du réacteur sans contact avec le support en Téflon.

3/ Une colonne d'extraction (5) en verre, placée au dessus du réacteur et qui sort du four micro-ondes (12) grâce à l'ouverture (11). Elle comprend un bras latéral (6) muni d'une ouverture (10) pour exercer un vide poussé dans le dispositif, d'une ouverture (9) pour collecter le solvant en dehors du système et d'un robinet à trois voies (8) pour ajuster le niveau du solvant.

4/ Un réfrigérant bouché (7) placé au dessus de la colonne d'extraction afin de permettre aux vapeurs de solvant d'être condensées.

Les extractions ont été réalisées comme suit :

15 g de poudre des feuilles de Romarin de la région d'Alger (INA) ont été mis sur le support (3) en Téflon poreux (inerte aux micro-ondes). Le tout a été placé à l'intérieur du réacteur (1) puis immergé dans 300 mL de mélange éthanol/eau (80:20, v / v) (4a). Le réacteur a été mis à l'intérieur du four à micro-ondes (12). La colonne d'extraction (5) et le condenseur (7), ont alors été placés en série au dessus du réacteur.

L'extraction lancée se déroule en trois étapes telles que décrites ci-dessous [13]:

1/ Le solvant est chauffé par l'intermédiaire des micro-ondes jusqu'à atteindre son point d'ébullition tout en étant agité à l'aide d'un barreau magnétique (13). Les vapeurs de solvant passent à travers la colonne d'extraction (5) et sont condensées à l'aide du réfrigérant (7). Les vapeurs ainsi condensées sont alors redirigées vers le réacteur par l'intermédiaire du bras latéral (6) réglé convenablement par le robinet (8). Ceci crée la première étape de la procédure, appelée « étape d'extraction », dans laquelle la matrice végétale est sans cesse immergée dans le solvant en ébullition.

2/ Le niveau de solvant contenu dans le réacteur (4a) est diminué jusqu'à passer sous le niveau du support en Téflon (4b). Ceci est réalisé par ajustement du robinet (8). Cette étape est appelée « étape de concentration ».

3/ Le robinet (8) est alors ajusté de manière à permettre au solvant de retourner dans le réacteur. Ceci crée un cycle dans lequel le solvant est sans cesse renouvelé à l'intérieur du réacteur, permettant ainsi de rincer continuellement la matrice avec un solvant propre et fraîchement condensé. C'est « l'étape de lessivage ».

- Enfin, le niveau de solvant pourra être diminué par l'ouverture (9) grâce au robinet (8), pour concentrer l'extrait.

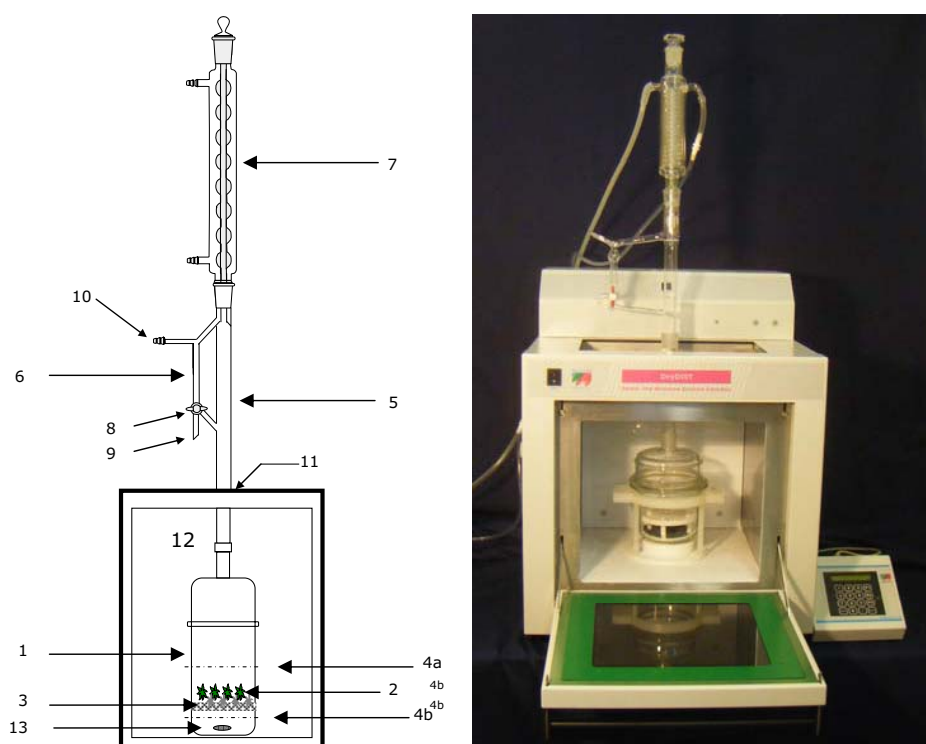


Figure IV.5: Soxhlet Assisté par Micro-ondes

IV.6.3. Analyse des extraits obtenus par Soxhlet et par SAM

L'analyse des extraits d'antioxydants provenant du Romarin récolté dans la région d'Alger (INA), a été effectuée sur le chromatographe liquide cité dans la Partie IV.5.2., en utilisant la colonne analytique, Purospher Star C18e (250 mm x 4,6 mm d.i, 5 μ m taille des particules) d'origine VWR. La phase mobile, dont le débit est de 1,5 mL/min, est constituée de deux solvants A et B, dont la programmation est présentée dans le Tableau IV.6.

- solvant A : solution aqueuse (pour CLHP) contenant 0,5 % d'acide formique,
- solvant B : 100 % Acetonitrile.

Tableau IV.6 : Programmation (2) des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse CLHP

Temps (min)	Solvant A %	Solvant B %
0	90	10
35	0	100
38	0	100
45	90	10

Le volume d'échantillon injecté est de 20 μ L. Les analyses sont tri-répliquées et la moyenne seule est reportée. La quantification des antioxydants est effectuée en injectant des standards externes.

IV.6.4. Analyse statistique

L'optimisation et l'évaluation de la performance du Soxhlet assisté par micro-ondes ont été exécutées par l'analyse statistique réalisée par application de la procédure expérimentale de type Box-Wilson [14, 15] plus communément appelée Plan Composite Centré (PCC). Cette analyse va permettre d'utiliser la méthodologie des surfaces de réponses (MSR) qui repose sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux ayant pour but d'étudier l'impact des paramètres opératoires impliqués dans l'optimisation du procédé d'extraction par SAM. Cette étude multivariée permet non seulement l'identification des conditions optimales de l'extraction, mais également la détermination des facteurs qui influencent le processus d'extraction, en minimisant le nombre d'expériences requis et en maximisant le rendement en métabolites ciblés, tout en offrant une complète exploitation du domaine expérimental étudié. Ce dernier pourra être représenté sous la forme d'un carré lorsque deux facteurs sont sollicités, ou encore sous la forme d'un cube lorsque trois facteurs seront testés.

Le choix des variables les plus influentes dans le processus SAM, ainsi que les domaines concernant ces paramètres ont été confortés par des travaux antérieurs, [13, 16].

Trois variables ont été retenues comme pertinentes et sont définies ci-après :

- *E* : Temps requis pour effectuer l'étape d'extraction,
- *L* : Temps nécessaire pour effectuer l'étape de lessivage,
- *P* : Puissance du four à micro-ondes.

[13] Virot M, Tomao V, Colnagui G, Visinoni F, Chemat F (2007).

[14] Box G.E.P., Wilson K.B. (1951).

[15] Yoon J. (2007).

[16] Fabiano-Tixier A.S, Elomri A, Blanckaert A, Seguin E, Petitcolas E, Chemat F. (2011).

Le plan composite centré a été réalisé à raison de 3 variables (E, L, P) et de 5 niveaux ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$). Il se compose de trois parties principales [12, 17]:

- Un plan factoriel complet N_F à deux niveaux (codés ± 1) avec $N_F = 2^k$. Ce plan permet de retrouver toutes les combinaisons possibles de deux niveaux choisis à partir des k facteurs. Le 2 représente les deux niveaux (haut et bas). Dans le cas de cette étude pour les 3 facteurs E, L, P , ($k=3$), nous avons $N_F = 2^3$ expériences réalisées aux coins du cube du domaine expérimental.

- Deux points axiaux à deux niveaux (codés $\pm \alpha$) :

$N_a = 2k$ expériences axiales réalisées sur les axes des facteurs du cube à une distance α du centre du domaine. Ces points représentent deux essais par paramètre et sont situés sur les axes de chaque variable à une distance α du centre. La valeur $\alpha = \pm \sqrt[4]{N_F}$ est fixée par la méthode statistique selon le nombre de paramètres expérimentaux k [12, 17].

- Des répétitions au centre du domaine expérimental (codées 0) :

$N_c =$ nombre d'expériences qui peut être fonction de l'expérimentateur. Ces expériences permettent d'évaluer la reproductibilité des essais.

Au niveau du plan expérimental, le nombre d'expériences $N_{\text{exp}} = N_F + N_c + N_a$.

Dans le cas de cette étude :

$$1/ \alpha = \pm \sqrt[4]{N_F} = \pm (2^3)^{1/4} = \pm 1,6818.$$

2/ $N_{\text{exp}} = 8 + 6 + 6 = 20$ expériences réalisées et représentées dans le Tableau IV.7 avec $k = 3$ facteurs (E, L, P) et le nombre de répétition $N_c = 6$.

[12] Virot M. (2009).

[17] Ben Amor B. (2008).

Tableau IV.7 : Description des 20 expériences (exprimées en variables codées) intervenant dans le Plan Composite Centré (PCC)

Expérience n°	Variables opératoires en valeurs codées			PCC
	<i>E</i>	<i>L</i>	<i>P</i>	
1	-1	-1	-1	N _F
2	1	-1	-1	
3	-1	1	-1	
4	1	1	-1	
5	-1	-1	1	
6	1	-1	1	
7	-1	1	1	
8	1	1	1	
9	$-\alpha$	0	0	N _a
10	α	0	0	
11	0	$-\alpha$	0	
12	0	α	0	
13	0	0	$-\alpha$	
14	0	0	α	
15	0	0	0	N _c
16	0	0	0	
17	0	0	0	
18	0	0	0	
19	0	0	0	
20	0	0	0	

E : Temps d'extraction. *L* : Temps de lessivage. *P* : Puissance d'irradiation, $\alpha = 1,6818$.

N_F = 8 expériences représentant un plan factoriel complet à trois facteurs (*E*, *L*, *P*) et deux niveaux (-1, +1).

N_a = 6 expériences réalisées à l'extérieur du domaine expérimental.

N_c = 6 points expérimentaux réalisés au centre du domaine expérimental.

Ainsi, 20 expériences ont été réalisées de manière à pouvoir estimer le modèle mathématique de la réponse testée.

Les variables codées appliquées aux valeurs naturelles des trois variables du Plan Composite Centré sont représentées dans le Tableau IV.8. Ces paramètres ont été étudiés de manière à optimiser la réponse à laquelle on s'intéresse, qui est le rendement maximum d'extraction exprimé en pourcentage de masse d'antioxydants extraits par rapport à la matrice sèche utilisée.

Tableau IV.8 : Variables naturelles et codées appliquées aux facteurs testés

Facteurs	Niveaux				
	$-\alpha$ (-1,6818)	-1	0	+1	$+\alpha$ (1,6818)
Temps d'extraction (min)	5	8	12	16	19
Temps de lessivage (min)	5	8	12	16	19
Puissance appliquée (W)	430	500	600	700	770

Les diverses réponses, analyses de données et interprétations ont été réalisées en utilisant le logiciel informatique de plans d'expériences statistiques : Statgraphics Plus (Statgraphics, Manugistics, Rockville, Etats-Unis USA, 2000). La méthodologie des plans d'expérience consiste à fixer tous les paramètres et à n'en faire varier qu'un, tout en observant la réponse testée (critère d'optimisation qui est le rendement dans le cas étudié).

Cette étude va permettre de modéliser la réponse étudiée sous la forme d'une équation polynomiale du second degré [18].

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j$$

où,

- y est la réponse ou critère d'optimisation étudié (rendement d'extraction en antioxydants).
- $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ et β_{ij} sont des coefficients constants du modèle mathématique adopté et sont déterminés expérimentalement,
- x_i et x_j sont les variables opératoires exprimées en valeurs codées et impliquées pour chaque facteur dans le modèle mathématique.

[18] Goupy J. (2005).

Les différents calculs statistiques réalisés par le logiciel utilisé, sont fondés sur l'analyse de la variance qui permet d'évaluer les valeurs obtenues. Cette analyse conduit à la détermination des divers coefficients de régression du modèle mathématique et permet de tester si les effets des facteurs existent. En termes statistiques, c'est de rechercher si l'effet est significatif ou non, avec un risque d'erreur donné, généralement fixé à 5%. L'analyse de la variance consiste à tester une hypothèse nulle (les moyennes sont égales entre elles) contre l'hypothèse alternative (au moins une moyenne diffère). Le principe est alors de comparer la variance de diverses répétitions d'un échantillon à la variance des moyennes entre tous les échantillons [12, 17, 19]. Le rapport entre ces deux variances est appelé ratio- F . Cette valeur est comparée à une table statistique permettant l'acceptation ou le rejet de l'hypothèse nulle de départ. Pour chacun des paramètres, la signification des effets linéaires, quadratiques et des interactions intervenant entre les variables est ainsi testée puis représentée sur un diagramme dit « Pareto ». L'adéquation du modèle par rapport aux mesures expérimentales est vérifiée par le calcul du coefficient de corrélation R^2 (le modèle sera d'autant plus adapté que la valeur de R^2 sera proche de 1). Enfin, le modèle mathématique pourra être représenté graphiquement à l'aide des surfaces de réponses permettant de visualiser l'évolution de la variable « réponse étudiée », ainsi que les zones où elle est maximale, en fonction des effets des facteurs [12, 17].

[12] Virot M. (2009).

[17] Ben Amor, B. (2008).

[19] Lazic Z.R. (2004).

IV.7. Antioxydants

IV.7.1. Récupération des déchets

Les déchets étudiés sont ceux du Romarin de la région d'Alger (INA) issus de l'extraction de l'huile essentielle par deux techniques, l'une conventionnelle, hydrodistillation (HD) et l'autre innovante, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes (ESSAM). Les déchets générés par HD sont ceux obtenus par l'extraction décrite en partie IV.4.1, tandis que les déchets ESSAM sont récupérés par l'extraction développée et brevetée en 2004, par Chemat et coll [20]. Cette technique a été appliquée à différentes puissances 300, 600 et 1000 W comme suit :

250 g de feuilles de Romarin fraîches sont introduites, sans ajout d'eau ni de solvant organique, dans un réacteur de type ballon d'une contenance de 2L placé dans la cavité multimode d'un four micro-ondes ménager (validé avec le four micro-ondes de laboratoire Dry Dist commercialisé par la société Milestone, Italie), ces deux fours ayant les mêmes caractéristiques :

- Cavité multimode.
- Fréquence de 2450 MHz.
- Magnétrons délivrant une puissance maximale de 1000 W.

Le montage utilisé est présenté dans la Figure IV.6.

Il est constitué :

- d'un four micro-ondes,
- d'un réacteur contenant la matière végétale à traiter, placé dans l'enceinte du four micro-ondes,
- d'une colonne liée au réacteur pour assurer la liaison avec la partie du montage située à l'extérieur de la cavité du four,
- d'un réfrigérant à boules, relativement long, orienté verticalement afin de respecter l'orientation initiale du flux de vapeur provenant du réacteur, d'assurer une condensation maximale des vapeurs saturées en molécules aromatiques et d'obtenir un condensât le moins chaud possible pour éviter une dégradation thermique éventuelle des molécules aromatiques [21],
- et d'un essencier où est recueillie l'huile essentielle.

[20] Chemat F., Smadja J., Lucchesi M.E. (2004).

[21] Ferhat M.A. (2007).

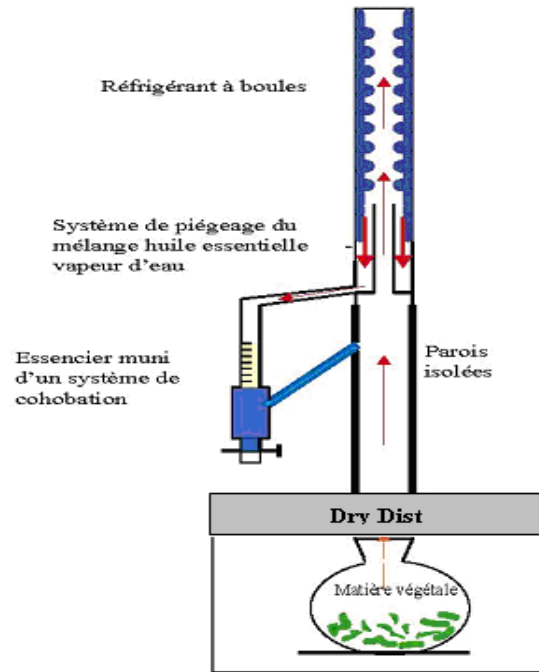


Figure IV.6 : Schéma du montage expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes [21].

IV.7.2. Valorisation des déchets végétaux après extraction de l'huile essentielle

Au-delà de l'extraction de l'huile essentielle, les déchets générés sont utilisés comme matière première d'autres produits à haute valeur ajoutée. La procédure suivie pour la valorisation de ces déchets est représentée dans l'organigramme de la Figure IV.7.

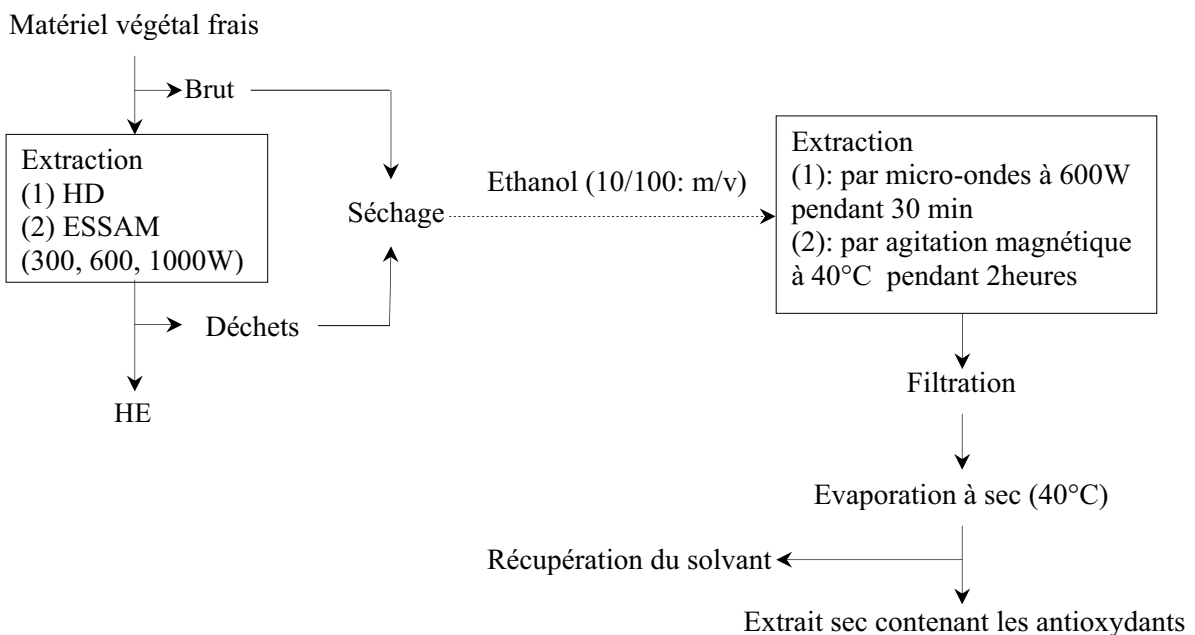


Figure IV.7: Protocole d'extraction des antioxydants

IV.7.3. Teneur en phénols totaux

Le contenu phénolique total (TPC) des extraits obtenus et tel que présenté dans le protocole opératoire de la Figure IV.7, a été déterminé en utilisant la méthode colorimétrique développée en 1927 par Folin-Ciocalteu (FC), et décrite par Lapornik et coll. [22], avec des modifications mineures. Le principe de cette méthode est basé sur l'oxydation en milieu basique des composés phénoliques du Romarin par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdo-tungsténique de couleur bleue qui absorbe à 765 nm. La coloration produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques présents dans les extraits étudiés.

2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu préparé dans l'eau (10% v/v) ont été ajoutés à 5 ml de chaque extrait dilué. Après 5 min d'agitation, 2 ml de Na_2CO_3 à 20% (m/v) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Helios Omega UV / VIS Thermo Scientific Merk & Co. spectrophotomètre). Pour une meilleure détermination du taux de phénols totaux de chaque extrait, trois répétitions ont été appliquées, et l'écart type fut calculé. La quantification des phénols totaux dans les extraits a été réalisée par le tracé d'une courbe d'étalonnage d'un phénol étalon (standard), à l'exemple de l'acide gallique (AG).

IV.7.4. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des différents extraits a été évaluée par deux méthodes : la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

IV.7.4.1. Test au Diphényl Picryl Hydrazyl (DPPH•)

La méthode du DPPH introduite par Blois [23] est un moyen pratique permettant la mesure de l'activité antioxydante des extraits étudiés. Son principe repose sur la mesure de la capacité d'un composé à piéger des radicaux libres de DPPH• (diphényl picryl hydrazyl) qui sont de couleur violet foncé. L'addition d'un antioxydant dans une solution de DPPH conduit à un changement de couleur, du violet au jaune. Ce dernier est directement proportionnel à la capacité antioxydante du produit ajouté [24]. Il peut être suivi par spectrophotométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm.

[22] Lapornik B., Prosek M., Wondra A.G. (2005).

[23] Blois M.S. (1958).

[24] Nisha P., Abdul Nazar P., Jayamurthy P. (2009).

Ces absorbances mesurées servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• suivant l'équation [24, 25]:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{A_{Blanc} - A_{Echantillon}}{A_{Blanc}} \right]_{t=30 \text{ min}} \times 100$$

- A_{Blanc} correspond à l'absorbance du blanc (solution de DPPH•) après 30 min

- $A_{Echantillon}$ correspond à l'absorbance de l'échantillon (solution d'extrait) après 30 min.

Solution de DPPH•

Le DPPH est solubilisé dans du méthanol pour obtenir une solution à raison de 240 µg/ml et qui doit être préparée à l'avance car la solubilisation est difficile. Elle se conserve à l'obscurité et pour une durée n'excédant pas 24 heures.

Solution d'extrait

Pour chaque extrait, une gamme de concentrations a été préparée dans le méthanol (de 50 à 2000 µg/ml), puis 3 ml de la solution de DPPH• est ajoutée.

Les solutions préparées sont agitées dans un Vortex, incubées ensuite à l'obscurité à température ambiante durant 30 min pour être enfin analysées par spectrophotométrie UV-Visible à 517 nm en utilisant le spectrophotomètre cité dans la partie IV.7.3. L'inhibition du radical libre DPPH• par l'antioxydant synthétique BHT, a été également mesurée pour comparaison aux mêmes concentrations. Tous les tests ont été réalisés avec 3 répétitions pour chaque concentration. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures \pm écart type.

L'IC₅₀ ou Concentration Inhibitrice de 50 % (appelée également EC₅₀ pour Efficient Concentration 50), est la concentration de l'extrait testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH•. Elle est calculée graphiquement à partir du graphique représentant les taux d'inhibition en fonction des différentes concentrations en extraits testés. Elle est inversement liée à la capacité antioxydante [25].

[24] Nisha P., Abdul Nazar P., Jayamurthy P. (2009).

[25] Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M., Khoshnoodi M. (2007).

IV.7.4.2. Pouvoir antioxydant réducteur du fer (Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP))

Le principe de la méthode FRAP développée par Benzie et Strain [26] est basé sur la réduction d'un complexe tripyridyltriazine ferrique [(Fe(III)-TPTZ)₂] en un complexe tripyridyltriazine ferreux [(Fe(II)-TPTZ)₂] par un antioxydant (AH), à un pH de 3,6 pour maintenir la solubilité du fer. Lors de cette réduction, une coloration bleue intense apparaît très rapidement avec un maximum d'absorption à 593 nm [26].

Le pouvoir réducteur des extraits étudiés a été déterminé selon la formule [27] :

$$FRAP = \frac{A_{(\text{échantillon})t=4 \text{ min}} - A_{(\text{échantillon})t=0 \text{ min}}}{A_{(s \text{ tan dard})t=4 \text{ min}} - A_{(s \text{ tan dard})t=0 \text{ min}}} \times [s \text{ tan dard}] (\mu M)$$

- $A_{\text{échantillon}}$ correspond à l'absorbance de l'échantillon à $t = 0$ ou $t = 4$ min
- $A_{s \text{ tan dard}}$ correspond à l'absorbance de la solution de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ à $t = 0$ ou $t = 4$ min
- [standard] correspond à la concentration en $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Solution du réactif FRAP

Le réactif FRAP est le mélange de trois solutions préparées à température ambiante, en proportions 10:1:1 (V:V:V) respectivement: de tampon acétate (300 mM dans H_2O , pH = 3.6), du 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ : 10 mM préparé dans HCl à 40 mM) et du chlorure ferrique ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM dans H_2O). Le mélange a ensuite été laissé au repos dans l'obscurité pendant 30 min à 37 °C.

Solution d'extrait

1,5 ml de réactif FRAP ont été ajoutés à 4,5 ml d'extrait.

Solution étalon

1,5 ml de réactif FRAP ont été ajoutés à 4,5 ml d'étalon.

[26] Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996).

[27] Michel T. (2011).

Références bibliographiques

- [1] Emberger L. (1930). « La végétation de la région méditerranéenne. Essai d'une classification des groupements végétaux ». *Rev. Gen. Bot.* 42, 641-662 et 705-721.
- [2] Emberger L. (1971). « Travaux de botanique et d'écologie ». Ed. Masson. Paris, France. 520.
- [3] Djellouli Y., Daget Ph. (1988). « Climat et flore dans les steppes du Sud Ouest Oranais ». *Biocénoses. Bull. Ecologie terrestre.* Tome 3. n°12, 94-107.
- [4] Sauvage Ch. (1963). « Le quotient pluviothermique d'Emberger, son utilisation et la représentation géographique de ses variations au Maroc ». Tome XX et dernier. *Service de Physique du Globe et de Météorologie.* 11-23.
- [5] Emberger L. (1955). « Une classification biogéographique des climats ». *Recueil des travaux des Laboratoires de Botanique, de Géologie et de Zoologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Montpellier, France.* 7, 3-43.
- [6] Daget, Ph. (1977). « Le bioclimat méditerranéen : Analyse des formes climatiques par le système d'Emberger ». *Vegetatio.* Vol. 34. 2, 87-103.
- [7] Clevenger J.F. (1928). *Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type.* *Amer. Perf. Essent. Oil Rev.* 467-503.
- [8] Van Den Dool H., Kratz P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A.* 11, 463-471.
- [9] Adams R.P. (1995). *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy,* Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- [10] Wang L., Weller C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Tech.* 17, 300-312.
- [11] Luque de Castro M.D., Garcia-Ayuso L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials : An outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta.* 369, 1-10.
- [12] Virot M. (2009). « Soxhlet assisté par micro-ondes. Conception et application à l'extraction des matières grasses ». *Thèse de Doctorat.* Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, France.
- [13] Virot M, Tomao V, Colnagui G, Visinoni F, Chemat F (2007). New microwave-integrated Soxhlet extraction. An advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *J. Chromatogr. A.* 1174, 138-144.
- [14] Box G.E.P., Wilson K.B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *J Roy Stat Soc B Met.* 13, 1-45.

- [15] Yoon, J. (2007). Application of experimental design and optimization to PFC model calibration in uniaxial compression simulation, *Int. J. Rock Mech. Min. Sci.* 44, 871-889.
- [16] Fabiano-Tixier A.S, Elomri A, Blanckaert A, Seguin E, Petitcolas E, Chemat F. (2011). Rapid and Green Analytical Method for the Determination of Quinoline Alkaloids from *Cinchona succirubra* Based on Microwave-Integrated Extraction and Leaching (MIEL) Prior to High Performance Liquid Chromatography. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 7846- 6860.
- [17] Ben Amor B. (2008). « Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC ». Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle, France.
- [18] Goupy J. (2005). « Pratiquer les plans d'expériences ». Technique et Ingénierie. Série Conception. Edition Dunod, Paris. France.
- [19] Lazic Z.R. (2004). « Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide ». Wiley Weinheim.
- [20] Chemat F., Smadja J., Lucchesi M.E. (2004). «Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances ». Brevet Américain, US 2004/0187340 A1.
- [21] Ferhat M.A. (2007). « Extraction sans solvant assistée par micro-ondes des huiles essentielles des citrus d'Algérie : compréhension, application et valorisation ». Thèse de Doctorat. USTHB.
- [22] Lapornik B., Prosek M., Wondra A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* 71, 214–222.
- [23] Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181,1199-1200.
- [24] Nisha P., Abdul Nazar P., Jayamurthy P. (2009). A comparative study on antioxidant activities of different varieties of *Solanum melongena*. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2640–2644.
- [25] Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M., Khoshnoodi M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 18, 800–805
- [26] Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70-76.
- [27] Michel T. (2011). « Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*) ». Thèse de Doctorat. Université d'Orléans. France.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre V :
Substances actives du Romarin

V.1. Huiles essentielles

V.1.1. Etages bioclimatiques de végétation

Le climat d'une région est un facteur déterminant, en raison de son influence prépondérante sur la présence et la composition de la végétation. Le botaniste phytogéographe français, Emberger a particulièrement souligné ce rôle en ce qui concerne la végétation méditerranéenne [1,2]. Par sa position géographique et les traits majeurs de sa topographie, l'Algérie se trouve exposée au climat méditerranéen, défini par un régime de précipitations, caractérisé par un minimum estival en période d'été.

La localisation et les caractéristiques des seize sites d'échantillonnage choisis dans cette étude, sont présentées dans le Tableau V.1. Les données climatiques ont été recueillies auprès de l'Office National de Météorologie (ONM - Algérie), pour la période allant de janvier à décembre 2010.

Les étages bioclimatiques du Romarin récolté dans les différentes régions ont été déterminés selon le climagramme pluviothermique d'Emberger voir Figure IV.2 du chapitre « Matériel et méthodes », où sont repris deux paramètres de nature climatique : en abscisse les valeurs des minima de température «m» du mois le plus froid (en degré Celsius) et en ordonnée les valeurs du quotient pluviothermique «Q₂» d'Emberger. Ces dernières, ont été déterminées mathématiquement et reportées dans le Tableau V.2. Compte tenu des valeurs de m et de Q₂ relatives aux seize sites d'échantillonnage du Romarin, portées sur le climagramme pluviothermique d'Emberger, nous avons déduit que les seize sites d'étude appartenaient à cinq étages bioclimatiques de végétation (Tableau V.2):

1/ **Per-humide (P-h)** : Cet étage comprend le site de Bejaia (L13).

2/ **Humide (H)** : Cet étage regroupe six sites d'échantillonnage : INA (L1), Tablat (L2), Bouira (L10), Tessala El Merdja (L11) et Jijel (L16).

3/ **Sub-humide (S-h)** : Il représente l'étage bioclimatique du Romarin récolté dans sept régions : Oran (L6), Médéa (L7), Constantine (L8), Relizane (L9), Sétif (L12), ElKala (L14), Bousmail (L15).

4/ **Semi-aride (S-a)** : pour le site de Bejaia campagne (L3).

5/ **Saharien (Sah)** : couvre deux régions : Touggourt (L4) et Hassi Messaoud (L5).

^[1] Emberger L. (1930).

^[2] Emberger L. (1971).

Tableau V.1 : Lieu et climat des sites d'échantillonnage [3]

Code	Région	Latitude N	Longitude	Altitude (m)	P (mm/an)	M (°C)	m (°C)
L1	INA - (Alger)	36°43'	3°08'E	43	640	25,5	12,2
L2	Tablat	36°24'	3°18'E	491	710	23,9	8,1
L3	Bejaia campagne	36°24'	4°40'E	317	600	37	2
L4	Touggourt	33°05'	6°04'E	66	60	42	4
L5	Hassi Messaoud	31°42'	6°03'E	173	50	43	5
L6	Oran	35°47'	0°25'O	150	370	25,1	10,2
L7	Médéa	36°14'	2°47'E	673	500	24,6	6,4
L8	Constantine	36°19'	6°37'E	713	520	25,1	6,9
L9	Relizane	35°44'	0°33'E	75	330	28,7	9,9
L10	Bouira	36°22'	3°56'E	517	640	25,9	7,2
L11	Tessala El Merdja	36°37'	2°56'E	33	600	27,3	10,7
L12	Sétif	36°19'	5°44'E	926	400	24,6	4,7
L13	Bejaia	36°43'	5°02'E	138	790	25,4	11,3
L14	El Kala	36°53'	8°26'E	30	660	31	9
L15	Bousmail	36°38'	2°43'E	160	680	33	5
L16	Jijel	36°24'	5°56'E	573	600	26	11,6

Li: Localité i, avec i allant de 1 à 16 régions.

INA: Institut National d'Agronomie (El Harrach - Alger).

P : Précipitation moyenne annuelle (mm/an).

M : Moyenne des températures maximales du mois le plus chaud (°C).

m : Moyenne des températures minimales du mois le plus froid (°C).

^[3] Meziane Assami D., Tomao V., Ruiz K., Meklati B.Y., Chemat F. (2013).

Tableau V.2 : Etages bioclimatiques de végétation

Code	Région	Q ₂	Etage bioclimatique
L1	INA - (Alger)	164,80	H
L2	Tablat	155,41	H
L3	Bejaia campagne	58,58	S-a
L4	Touggourt	5,33	Sah
L5	Hassi Messaoud	4,43	Sah
L6	Oran	85,39	S-h
L7	Médéa	95,18	S-h
L8	Constantine	98,81	S-h
L9	Relizane	60,02	S-h
L10	Bouira	118,14	H
L11	Tessala Elmerdja	123,72	H
L12	Sétif	69,84	S- h
L13	Bejaia	192,21	P-h
L14	El Kala	102,34	S- h
L15	Bousmail	83,13	S- h
L16	Jijel	142,72	H

Etage bioclimatique : déterminé selon le climagramme pluviothermique d'Emberger.

Q₂: Quotient pluviothermique [4] avec $Q_2 = \frac{2000P}{M^2 - m^2}$.

P-h: Per-humide.

H: Humide.

S-h : Sub-humide.

S-a : Semi-aride.

Sah : Saharien.

^[4] Emberger L. (1955).

V.1.2. Taux d'humidité (Hu %)

Le rendement en huile essentielle est exprimé par la quantité d'huile (en grammes) obtenue pour 100 grammes de matière végétale sèche. Pour cela, et pour une bonne comparaison des résultats nous avons procédé, parallèlement à chaque hydrodistillation, à la détermination de la teneur en eau du Romarin de chaque région, après séchage à l'air libre. Plusieurs mesures ont été effectuées jusqu'à ce que les résultats de tous les échantillons révèlent une teneur en humidité quasiment équivalente. L'humidité moyenne est de $8,66 \pm 0,29$ %.

V.1.3. Influence du lieu de récolte de la plante sur la teneur et la qualité des huiles essentielles

Les résultats des rendements en fractions volatiles récupérées à partir d'une même variété botanique de Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), récoltée durant la même période (mai 2010), avec un taux d'humidité équivalent, extraite selon la même procédure (hydrodistillation classique à pression atmosphérique), mais originaires de seize régions d'Algérie, sont illustrés par l'histogramme de la Figure V.1. Le Romarin de la région de l'INA (El Harrach-Alger) offre le plus grand rendement (1,47%) alors que ceux des régions de Bousmail et Jijel conduisent au rendement le plus faible (respectivement 0,34 et 0,33%).

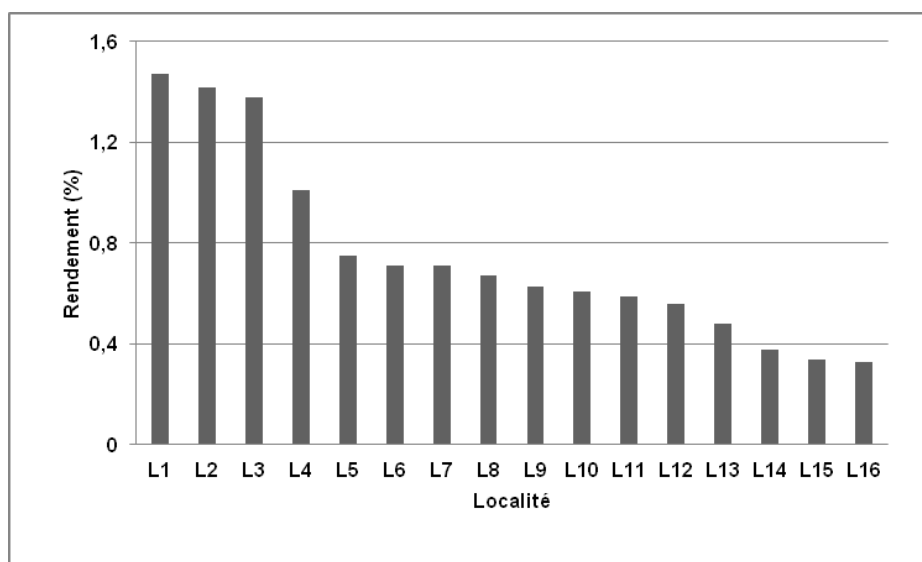


Figure V.1 : Rendements des huiles essentielles obtenues par HD, à partir de *Rosmarinus officinalis* L. récolté dans seize régions d'Algérie.

Le Tableau V.3 regroupe les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse utilisée seule ou après couplage à la spectrométrie de masse de ces 16 essences. Les composés de ces huiles, ont été identifiés par ordre d'élution, classés selon leur famille chimique propre en adjoignant leurs indices de rétention calculés à partir de deux types de colonnes capillaires : l'une polaire (Stabilwax^R) et l'autre apolaire (HP5MSTM).

D'après les résultats observés conjointement dans la Figure V.1 et dans le Tableau V.3, il apparaît clairement, une influence de l'origine géographique du Romarin non seulement sur le rendement en HE mais également sur la composition chimique de celle-ci. Les analyses qualitative et quantitative des huiles essentielles des différentes régions étudiées, ont permis de recenser 25 composés aromatiques, représentant 88,11 à 99,80 % de la composition chimique totale de l'huile essentielle analysée. Il est à noter que la fraction monoterpénique est majoritaire dans tous les échantillons. Parmi ces monoterpènes, il est à remarquer que les non oxygénés sont prédominants (de 50,34 à 79,16%) dans douze régions de récolte (L1, L2, L3, L4, L5, L8, L9, L11, L13, L14, L15, L16), tandis que les monoterpènes oxygénés, sont nettement plus importants pour le reste des régions (L6, L7, L10, L12) où ils représentent 48,03 à 52 % de la teneur en essence. Il est à constater également pour toutes les régions étudiées, la présence de la fraction sesquiterpénique en faible proportion (moins de 3,03 % de la composition totale de l'HE).

Tableau V.3: Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de Romarin obtenues par HD

N°	Composés	IR ^b	IR ^c	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16
Monoterpènes				56,16	67,27	61,9	57,6	58,39	38,24	39,82	66,16	52,1	42,13	59,27	43,36	79,16	61,16	50,34	57,88
1	Tricyclène	917	1010	0,11	0,09	0,09	0,06	0,13	0,01	0,15	*	0,08	0,08	*	0,02	*	*	0,08	*
2	α -Pinène	938	1026	29,33	43,42	25,07	28,02	23,62	29,95	20,13	59,45	24,87	25,56	51,02	35,14	72,58	53,98	26,87	41,90
3	Camphène	947	1063	8,39	8,60	21,90	24,44	31,39	3,92	3,57	2,78	4,98	6,28	2,67	2,83	2,20	1,76	5,84	3,06
4	Verbénène	950	1122	2,41	0,41	*	*	0,00	0,29	1,25	*	0,58	0,60	0,24	0,32	0,41	0,39	1,37	0,38
5	β - Pinène	971	1106	2,35	3,68	9,01	0,39	0,08	0,97	0,84	0,19	1,76	1,36	0,35	0,96	0,15	0,22	0,87	0,19
6	β -Myrcène	990	1160	1,15	0,98	0,11	0,06	0,01	0,65	1,27	0,29	1,37	0,81	0,37	0,54	0,29	0,33	0,84	0,50
7	1-Phellandrène	1001	1163	0,15	0,14	0,17	0,08	0,00	0,11	0,39	0,06	0,43	0,21	0,11	0,13	0,07	0,11	0,23	0,06
8	Δ^3 -Carène	1005	1168	0,02	0,10	*	*	0,00	1,13	2,03	0,52	2,62	1,46	0,91	1,24	0,94	1,06	2,70	0,75
9	α -Terpinène	1012	1177	0,57	0,45	0,11	0,08	0,00	0,08	0,37	0,05	0,25	0,14	0,06	0,09	0,06	0,10	0,11	0,07
10	p-Cymène	1021	1268	3,23	0,49	0,09	0,23	0,47	0,08	0,20	0,18	0,29	0,21	0,15	0,22	0,14	*	1,45	0,67
11	Limonène	1026	1200	6,19	6,22	5,05	4,17	2,69	0,23	7,84	2,41	12,82	4,57	4,34	1,14	2,12	2,78	9,35	10,02
12	γ -Terpinène	1054	1243	1,67	2,03	0,25	0,05	*	0,21	0,62	0,09	0,44	0,25	0,13	0,21	0,07	0,18	0,16	0,10
13	Terpinolène	1082	1279	0,59	0,66	0,05	0,02	*	0,59	1,16	0,14	1,61	0,60	0,91	0,52	0,13	0,25	0,47	0,18
Monoterpènes Oxygénés				32,42	28,84	37,69	41,87	41,36	48,03	50,31	25,40	36,02	52,00	36,16	51,46	19,75	35,29	45,77	37,67
14	1.8-Cinéole	1027	1214	0,05	0,78	4,70	6,10	4,45	24,02	9,62	11,00	7,70	18,66	17,42	29,28	7,74	13,67	14,52	17,65
15	Linalool	1105	1537	2,48	1,56	0,01	*	*	1,06	2,61	0,95	3,00	1,98	0,96	1,46	0,76	2,49	2,23	1,44
16	Camphre	1141	1516	15,07	15,23	32,69	35,56	36,44	15,45	14,69	7,27	16,33	21,17	12,01	15,01	6,64	11,55	19,05	14,43
17	Pinocarvone	1156	1541	1,16	0,87	*	0,01	*	0,04	0,19	*	0,10	0,09	0,05	0,08	*	*	0,12	*
18	Bornéol	1160	1702	2,14	0,08	*	*	0,20	*	8,27	0,44	0,12	0,20	*	*	0,86	3,58	0,16	0,81
19	4-Terpinéol	1173	1601	1,47	0,49	0,17	0,10	0,09	0,13	0,88	0,18	0,37	0,43	0,12	0,26	0,12	*	0,42	0,19
20	α -Terpinéol	1194	1698	0,90	0,42	0,12	0,10	0,18	0,30	1,32	0,06	0,75	0,82	0,29	0,09	0,23	*	0,60	0,32
21	Verbénone	1205	1718	9,15	9,42	*	*	*	7,03	12,71	5,49	7,65	8,64	6,51	5,28	3,41	4,00	8,67	2,83

Suite du Tableau V.3

N° Composés	IR ^b	IR ^c	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16
Sesquiterpènes			1,00	2,20	0,06	0,06	0,02	0,41	2,39	0,34	3,03	1,31	0,30	0,99	0,25	0,39	0,58	0,51
22 Trans-caryophyllène	1406	1604	0,72	1,71	0,06	0,05	0,01	0,38	1,91	0,30	2,73	1,10	0,28	0,90	0,25	0,39	0,46	0,47
23 α -Humulène	1439	1678	0,22	0,43	*	0,01	*	0,03	0,28	0,04	0,22	0,12	0,03	0,07	*	*	0,07	0,04
24 Caryophyllène oxide	1568	1990	0,06	0,06	*	*	0,01	*	0,20	*	0,08	0,09	*	0,02	*	*	0,05	*
Autres composés oxygénés			0,64	1,15	0,02	0,04	0,03	1,43	1,29	0,30	5,24	2,01	1,08	1,29	0,06	1,19	0,84	0,40
25 Bornyl acétate	1280	1580	0,64	1,15	0,02	0,04	0,03	1,43	1,29	0,30	5,24	2,01	1,08	1,29	0,06	1,19	0,84	0,40
Composés oxygénés totaux (%)			33,06	29,99	37,71	41,91	41,39	49,46	51,60	25,70	41,26	54,01	37,20	52,75	19,81	36,48	46,61	38,07
Composés non oxygénés totaux (%)			57,16	69,47	61,96	57,66	58,41	38,65	42,21	66,50	55,13	43,44	59,57	44,35	79,41	61,55	50,92	58,39
Composés identifiés (%)			90,22	99,46	99,67	99,57	99,80	88,11	93,81	92,20	96,39	97,45	96,77	97,10	99,22	98,03	97,53	96,46

Temps d'extraction: 180 min

IR^b: Indices de rétention déterminés sur la colonne capillaire apolaire HP5MSTM en référence à la série homologue des n-alcanes allant de C₅ à C₂₈

IR^c: Indices de rétention déterminés sur la colonne capillaire polaire StabilwaxTM en référence à la série homologue des n-alcanes allant de C₅ à C₂₈

Il ressort des résultats des compositions chimiques présentés dans le Tableau V.3 et illustrés par l'histogramme de la Figure V.2, que les fractions volatiles de Romarin des régions L1, L2, L3, L4, L5, L8, L9, L11, L13, L14, L15 et L16 sont constituées principalement de composés non oxygénés, contrairement à celles des régions L6, L7, L10 et L12, qui ont révélé la prédominance des composés oxygénés. Nous constatons ainsi que ces derniers sont majoritaires dans les huiles essentielles de Romarin récoltées dans les régions des Hauts Plateaux, à savoir Bouira (L10), Médéa (L7) et Sétif (L12).

Quant aux composés non oxygénés, nous remarquons:

- qu'ils sont plus abondants jusqu'à quatre fois la teneur en composés oxygénés tel que dans la région L13 (Béjaia), qui appartient à l'étage bioclimatique per-humide.
- qu'ils sont présents dans les mêmes proportions dans le Romarin provenant des régions L4 et L5 (Touggourt et Hassi Messaoud) correspondant au même étage bioclimatique saharien.
- que leur présence dans les huiles issues du Romarin des régions L2 et L8 est au minimum 2 fois supérieure à celle des composés oxygénés.

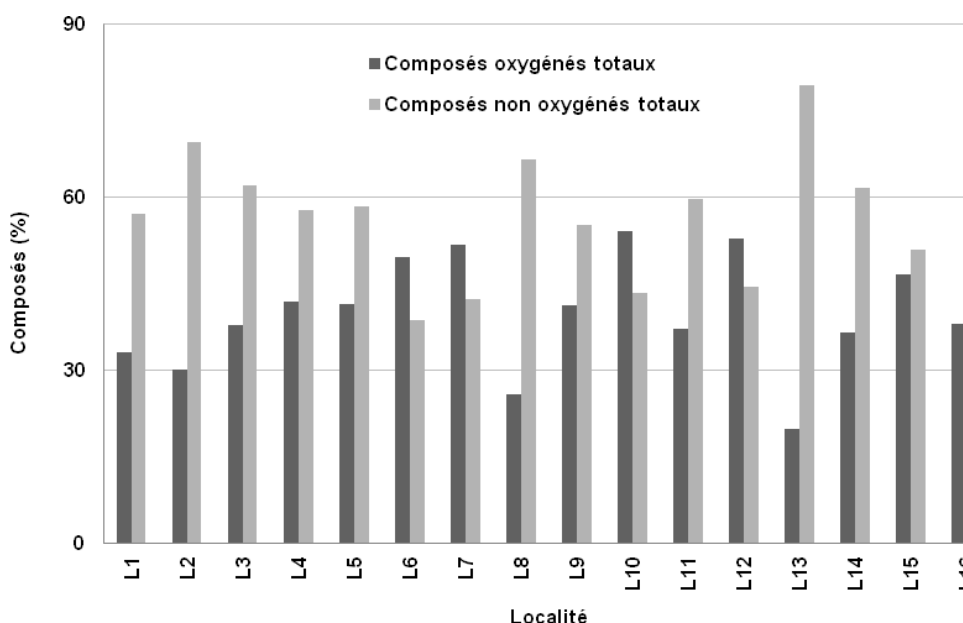


Figure V.2 : Teneurs en composés oxygénés et non oxygénés des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de seize régions d'Algérie

A partir des résultats ci-dessus, la diversité des teneurs en molécules majoritaires contenues dans ces huiles d'origine différente, permet de conclure que ces dernières sont réparties en deux chémotypes distincts : *Rosmarinus officinalis* L. de type α -Pinène (20,13-72,58%) et *Rosmarinus officinalis* L. de type Camphre (32,69-36,44%).

- **Le *Rosmarinus officinalis* L. de type α -Pinène** est représenté dans le Tableau V.4 par le groupe A subdivisé en deux sous groupes :

(A₁) : α -Pinène > 1.8-Cinéole

(A₂) : α -Pinène > Camphre

Ce groupe A est le plus important car il englobe 13 échantillons dont les compositions sont caractérisées par la prédominance de l' α -Pinène à 72,58 %, 59,45 %, 53,98 %, 51,02 %, 43,42 %, 41,90 %, 35,14 %, 29,95 %, 29,33 %, 28,02 %, 26,87 %, 25,56 %, 24,87 % et 20,13 % respectivement pour L13, L8, L14, L11, L2, L16, L12, L6, L1, L4, L15, L10, L9 et L7.

- **Le *Rosmarinus officinalis* L. de type Camphre** est également présenté dans le Tableau V.4 par le groupe B éclaté en deux sous groupes :

(B₁) : Camphre > α -Pinène

(B₂) : Camphre > Camphène

Ce groupe B couvre 3 échantillons dont les huiles sont toutes dominées par le Camphre à 36,44 %, 35,56 % et 32,69 % respectivement pour L5, L4 et L3.

Les résultats de cette étude montreraient que la présence des deux chémotypes pourraient être influencés par les conditions climatiques. Nous pouvons conclure, à partir des résultats du Tableau V.4 que le Romarin de type α -Pinène est adapté aux zones classées dans les trois étages bioclimatiques : per-humide (zone L13), humide (zones L1, L2, L10, L11 et L16) et sub-humide (Zones L6, L7, L8, L9, L12, L14 et L15). Quant au Romarin de type Camphre, il est détecté dans les sites (L3, L4 et L5) appartenant aux deux étages bioclimatiques : Semi aride et Saharien. Dans le Romarin de ces trois sites, nous remarquons que le Camphène (21,9 – 31,39 %) est le troisième composé prédominant après le Camphre et l' α -Pinène, alors que pour le Romarin de type α -Pinène, sa présence est minoritaire, car il représente 1,76 à 8,60 % de la composition totale de l'huile essentielle.

Des différences ont été également notées pour la Verbénone qui est détectée de 2,83 à 12,71% dans le Romarin à type α -Pinène. Par contre, ce composé est totalement absent dans le Romarin à type Camphre.

Tableau V.4: Composés majoritaires des huiles essentielles de Romarin classés par étage bioclimatique

Groupe		A		B	
Composés majoritaires		α -Pinène 20,13-72,58%		Camphre 32,69-36,44%	
		1.8-Cinéole 11,00-29,28%	Camphre 14,69-21,17%	α -Pinène 25,07-28,02%	Camphène 31,39%
Sous-groupe		A ₁	A ₂	B ₁	B ₂
Zone Bioclimatique	Per-humide	L13	-	-	-
	Humide	L11	L1	-	-
		L16	L2 L10		
	Sub-humide	L8	L15	-	-
		L14			
		L6			
L12					
Semi-aride	-	-	L3	-	
Saharien	-	-	L4	L5	

Ces résultats relatifs aux différences de composition des huiles essentielles de Romarin algérien et à leurs deux chémotypes, corroborent parfaitement les résultats rapportés antérieurement pour les échantillons méditerranéens de Romarin comme celui de la Tunisie (Napoli et coll. [5], Zaouali et coll. [6]) et celui du Maroc (Elamrani et coll. [7]).

En Algérie, Boutekedjiret et coll [8], sont arrivés à identifier trois chémotypes suivant la région de récolte du Romarin : le type à Camphre caractérisant l'huile essentielle de la plante récoltée à Alger (Ecole Nationale polytechnique), à Djelfa et à Laghouat, le type à 1,8-Cinéole dans le site de Bordj Bou Arreridj et celui à α -Pinène caractérisant l'huile essentielle de la plante provenant de l'Institut National d'Agronomie (INA) d'Alger. Concernant ce dernier chémotype, nous sommes arrivés dans notre cas à une conclusion similaire pour le Romarin (L1), récolté dans la même région (Alger : INA). Ce résultat est en adéquation avec celui des travaux de Tigrine et coll. [9].

L'identification des chémotypes existant au sein des huiles essentielles extraites à partir d'une même variété botanique mais avec une composition biochimique différente permettrait de mieux entrevoir les propriétés thérapeutiques de celles-ci car comme dans l'exemple du Romarin, ils se caractérisent par les mêmes formes de feuilles, de tiges, de fleurs, de couleur et d'odeur. Leur identification permettrait ainsi de sélectionner les HE pour une utilisation sélective plus précise et plus efficace.

[5] Napoli E.M., Curcuruto G., Ruberto G. (2010).

[6] Zaouali Y., Bouzaine T., Boussaid M. (2010).

[7] Elamrani A., Zsira S., Benjlali B., Berrada M.A. (2000).

[8] Boutekedjiret C., Buatois B., Bessiere J.M. (2005).

[9] Tigrine-Kordjani N., Meklati B.Y., Chemat F. (2006).

V.1.4. Cinétique de l'extraction

Par suite de son rendement d'extraction optimal, le Romarin de la région d'Alger (INA) a été sélectionné pour l'étude cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de feuilles fraîches de Romarin. Le suivi de l'évolution du rendement d'extraction au cours du temps (Figure V.3), montre l'existence de quatre étapes lors du processus HD. La première étape dure 30 minutes et correspond au temps nécessaire pour chauffer la matrice végétale immergée dans l'eau (c'est également le temps nécessaire pour l'apparition de la première goutte d'huile essentielle). L'étape 2 représente la première phase de récupération d'HE. Cette étape est la plus rapide. Pour une HD environ 77% du rendement total, sont obtenus dans cette phase, pour une durée de 30 minutes, après l'obtention de la première goutte d'huile essentielle. La troisième étape est la plus longue, elle dure 120 minutes pour n'obtenir que 22% du rendement maximum possible à être atteint. L'étape 4 est la dernière phase du processus et correspond à la fin de l'extraction.

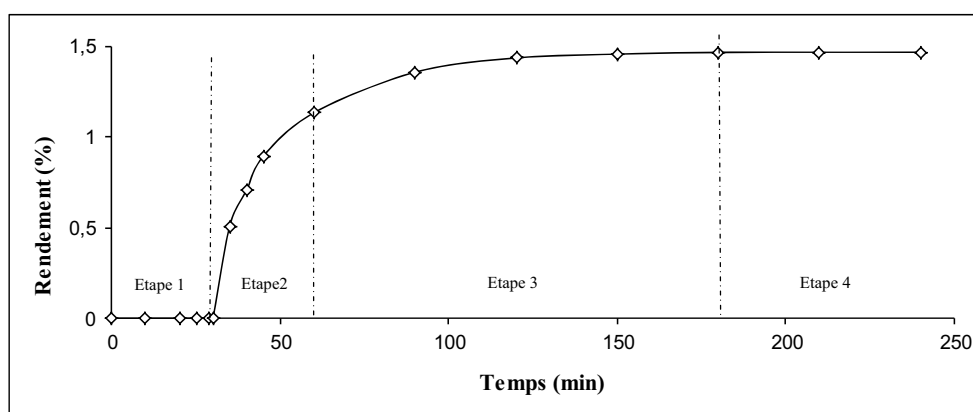


Figure V.3 : Cinétique de l'extraction par HD de l'huile essentielle de Romarin séché.

V.1.5. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)

Cette analyse a permis de visualiser la localisation des sites producteurs d'huiles essentielles dans les feuilles de Romarin et également d'observer l'état des cellules sécrétrices, avant extraction (Figure V.4) et après extraction par HD (Figure V.5).

Au milieu de la micrographie illustrée par la Figure V.4 et à l'échelle de grossissement choisi (50 μ m, 10kV, 600x), nous observons une glande d'huile essentielle qui apparaît sous forme sphérique, entourée de poils tecteurs (les trichomes tecteurs) considérés comme protecteurs des poils sécréteurs (trichomes glandulaires). La comparaison de la micrographie portée dans cette figure à celle de la Figure V.5 relative à la feuille de Romarin après extraction par hydrodistillation obtenue à un grossissement plus important (20 μ m, 10kV, 1200x), permet de constater clairement qu'à la suite de l'extraction par HD, un changement est observable sur la micrographie, indiquant que la glande s'est détruite pour libérer son contenu.

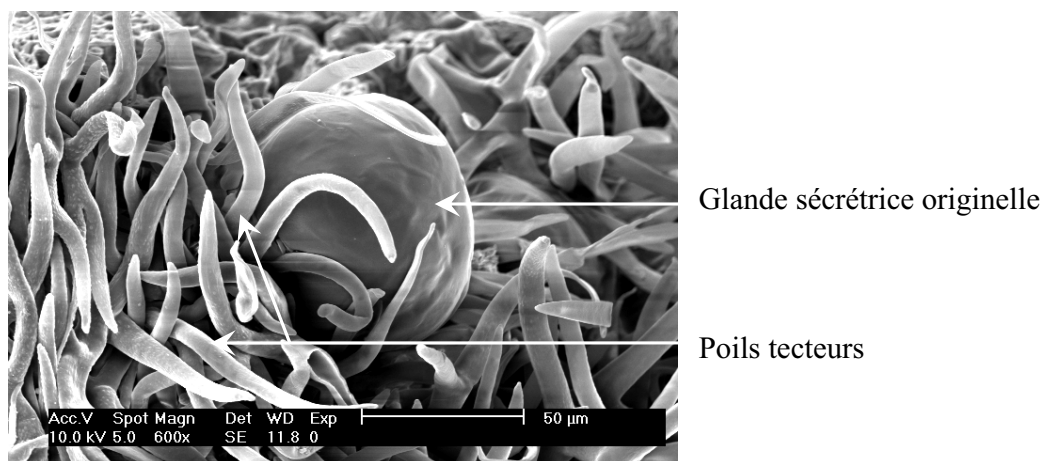


Figure V.4: Structure de la feuille de la plante de Romarin observée au MEB

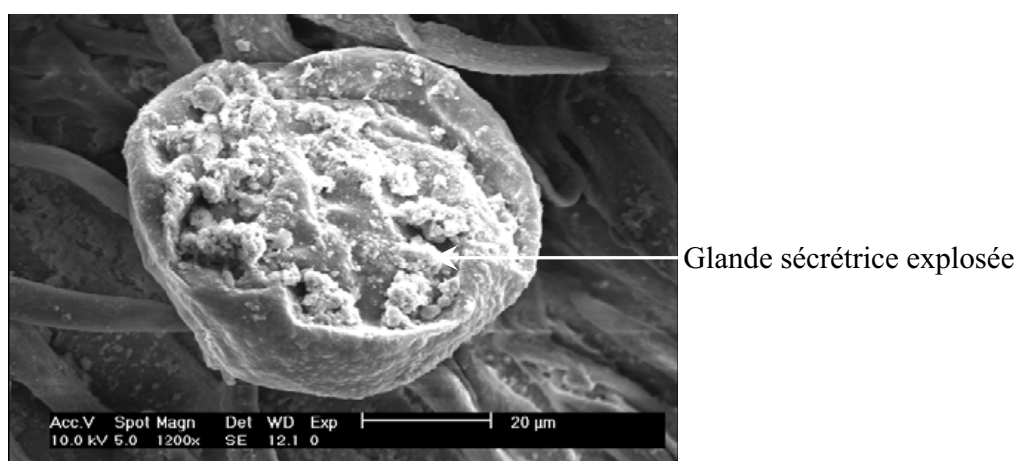


Figure V.5 : Structure de la feuille de Romarin observée au MEB après extraction par HD

V.2. Antioxydants

V.2.1. Extraction

Les rendements en antioxydants des extraits des divers échantillons de feuilles de Romarin, récoltées dans seize régions d'Algérie, sont reportés dans le Tableau V.5. Bien qu'il s'agisse de la même espèce de Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), récoltée durant la même période et extraite selon le même mode opératoire, une variabilité des taux d'extraction (5,22 à 16,38 %) est observée en fonction des sites de récolte étudiés. La différence trouvée dans les teneurs en antioxydants dans les feuilles de Romarin des diverses régions, peut être liée à l'origine géographique et aux paramètres agronomiques de chaque matrice végétale étudiée. Les meilleurs rendements d'extraction ont été obtenus dans les régions de Relizane et d'Alger (16,38-16,37%).

Il est à noter que le Romarin d'Alger, avec le rendement le plus élevé en huile essentielle, avait conduit également au meilleur taux en antioxydants (16,37 %), alors que celui de Jijel, avec le plus faible taux en HE conduisait également au plus faible taux en antioxydants (5,22%). En ce qui concerne les échantillons des autres régions, ces derniers n'ont pas gardé le même ordre de classement en antioxydants que celui observé avec les huiles essentielles.

Tableau V.5 : Rendements d'extraction en antioxydants de divers échantillons de feuilles de Romarin en fonction de leur aire de cueillette

Code	Région	Rendement d'extraction (%)
L9	Relizane	16,38
L1	Alger (INA)	16,37
L15	Bousmail	16,03
L5	Hassi Messaoud	15,88
L3	Bejaia campagne	13,87
L2	Tablat	12,62
L6	Oran	12,46
L13	Bejaia	11,83
L11	Tessala El Merdja	10,94
L10	Bouira	10,38
L14	El Kala	9,45
L4	Touggourt	9,33
L12	Sétif	8,42
L8	Constantine	7,14
L7	Médéa	7,11
L16	Jijel	5,22

V.2.2. Analyse qualitative et quantitative des antioxydants de feuilles de Romarin de diverses régions

L'analyse qualitative des extraits de feuilles de Romarin par chromatographie liquide à haute performance, utilisant le détecteur à barrette de diodes (CLHP/DAD), a permis l'identification de trois composés phénoliques considérés comme majoritaires de cette plante [10]: l'acide Rosmarinique (Ar), le Carnosol (Ca) et l'acide Carnosique (Ac) (Tableau V.6).

Tableau V.6 : Identification des antioxydants majoritaires du Romarin par CLHP/DAD

Composé identifié	Temps de rétention (min)	Longueur d'onde (nm)
Acide Rosmarinique	13,126	330
Carnosol	26,176	280
Acide Carnosique	29,467	284

En raison de la disponibilité des trois produits (Ar, Ca, Ac) en étalons purs (obtenus commercialement), l'analyse quantitative des extraits de Romarin a pu être réalisée par étalonnage externe.

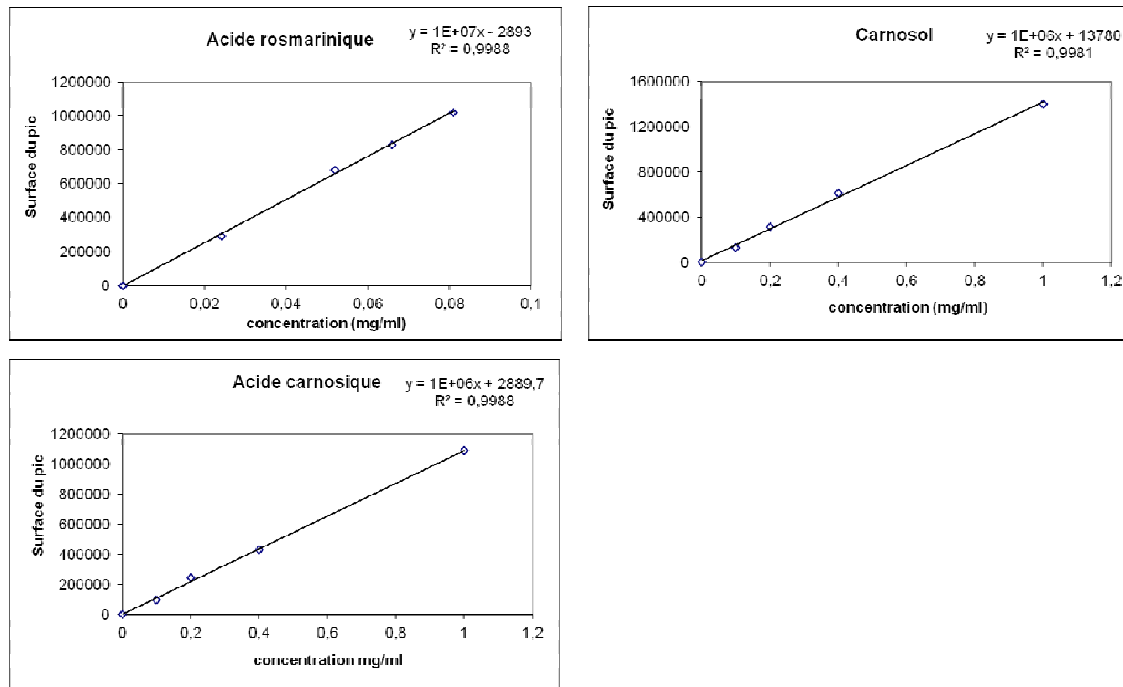


Figure V.6: Courbes d'étalonnages de l'acide Rosmarinique, du Carnosol et de l'acide Carnosique.

[10] Herrero M., Plaza M., Cifuentes A., Ibáñez E. (2010).

Les droites d'étalonnage (Figures V.6) de chaque étalon pur ont été obtenues à partir des surfaces des pics correspondant à chacun d'eux après dilution dans du méthanol à différentes concentrations (Tableau V.7) et injectés sous les mêmes conditions que celles des extraits à analyser.

Tableau V.7 : Données relatives aux courbes d'étalonnage des acides Rosmarinique et Carnosique et du Carnosol

Etalon	Gamme de concentrations (mg/mL)	Equation d'étalonnage	R ²
Acide Rosmarinique	0,024-0,081	1E+07x - 2893	0,9988
Carnosol	0,1-1	1E+06x + 13780	0,9981
Acide Carnosique	0,1-1	1E+06x + 2889	0,9988

Tableau V.8 : Quantification de trois antioxydants majoritaires dans le Romarin originaire de seize régions d'Algérie

Code	Région	Composés phénoliques (g / 100g de Romarin séché)		
		Acide Rosmarinique	Carnosol	Acide Carnosique
L1	Alger (INRA)	1,27	0,48	1,77
L2	Tablat	1,06	0,94	0,31
L3	Bejaia campagne	1,23	0,28	0,39
L4	Touggourt	0,5	0,17	0,30
L6	Oran	0,87	0,24	0,76
L7	Médéa	0,28	0,27	0,86
L8	Constantine	0,46	0,44	0,20
L9	Relizane	0,8	0,44	0,39
L10	Bouira	1,1	0,54	0,01
L11	Tessala El Merdja	1,03	0,49	0,10
L12	Sétif	1	0,26	0,41
L13	Bejaia	0,42	0,59	0,33
L14	El Kala	0,79	0,57	0,21
L15	Bousmail	2,49	0,57	0,07
L16	Jijel	0,34	0,40	0,13

Les résultats obtenus à partir de l'analyse quantitative des extraits de Romarin issus des seize sites étudiés (Tableau V.8), font apparaître des teneurs en composés phénoliques (Ar, Ca, Ac) variables d'un échantillon à un autre, ce qui traduit l'influence de l'aire géographique sur la composition de Romarin d'une même espèce.

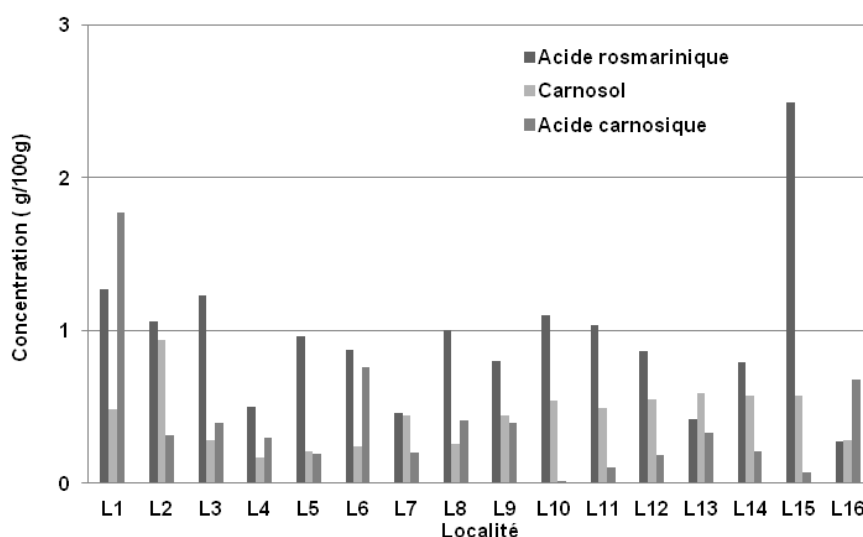


Figure V.7 : Répartition de trois composés phénoliques après leur extraction de l'espèce cueillie de *Rosmarinus officinalis* L. dans seize régions d'Algérie

L'histogramme de la Figure V.7, permet de mettre en évidence la composition contrastée des 3 antioxydants quantifiés dans les feuilles de Romarin. Nous pouvons noter que les plus faibles variations sont observées pour le Carnosol (de 0,21 à 0,94 g/100g de feuilles sèches de Romarin). La concentration maximale de ce constituant correspond au Romarin de la région de Tablat (L2). Par contre, pour tous les échantillons, la teneur en acide Rosmarinique varie de manière plus remarquable en passant de 0,27 à 2,49 g/100g de feuilles sèches). Ce composé est prédominant dans le Romarin de la majorité des sites de récolte (12 des 16 régions étudiées), avec une valeur maximale de 2,49 % dans l'échantillon L15 de Bousmail. Quant à l'acide Carnosique, sa concentration varie de 0,01 à 1,77%, avec une présence plus marquée dans l'extrait L1 issu de l'INA (1,77%). La prise en compte de cette variabilité des teneurs en composés phénoliques trouvés dans les 16 extraits de Romarin, nous a permis de classer les échantillons étudiés en trois groupes (Tableau V.9).

Le groupe A est le groupe le plus important et où l'acide Rosmarinique se trouve être le composé majoritaire dans douze régions de récolte (L2, L3, L4, L5, L6 L8, L9, L10, L11, L12, L14 et L15). Il englobe quatre étages bioclimatiques (humide, sub-humide, semi-aride, et saharien) et se subdivise en deux sous-groupes :

(A₁) [Acide Rosmarinique > Carnosol > Acide Carnosique]

(A₂) [Acide Rosmarinique > Acide Carnosique > Carnosol].

Le groupe B couvre le Romarin de deux régions (L13 et L16) adaptées au climat humide et per-humide. Le Carnosol est le marqueur de ce groupe, suivi de l'acide Rosmarinique et enfin de l'acide Carnosique.

Le groupe C est subdivisé en deux sous-groupes :

(C₁) [Acide carnosique > Acide rosmarinique > Carnosol]

(C₂) [Acide carnosique > Carnosol > Acide rosmarinique].

Il regroupe le Romarin des deux régions (L1 et L7) affiliées aux étage bioclimatiques humide et sub-humide.

Tableau V.9: Composés phénoliques majoritaires dans les 16 extraits de Romarin classés par étage bioclimatique

Groupe		A		B	C	
Composé majoritaire		Acide Rosmarinique 0,5 - 2,49%		Carnosol 0,4 - 0,59%	Acide Carnosique 0,68 – 1,77%	
2 ^{ème} composé		Ca 0,21 - 0,94%	Ac 0,3 - 0,76%	Ar 0,34 - 0,42%	Ar 1,27%	Ca 0,28%
Sous-groupe		A ₁	A ₂	B	C ₁	C ₂
Zone Bioclimatique	Per-humide	-	-	L13	-	-
	Humide	L2, L10, L11	-	L16	L1	-
	Sub-humide	L8, L9, L14, L15	L6, L12	-	-	L7
	Semi-aride	-	L3	-	-	-
	Saharienne	L5	L4	-	-	-

Ar : Acide Rosmarinique, Ca : Carnosol, Ac : Acide Carnosique

Conclusion

Bien que de nombreux travaux aient été réalisés dans le domaine de l'extraction des huiles essentielles [11-13] et des antioxydants [14, 15] à partir de plantes aromatiques, et plus particulièrement du Romarin, la poursuite de l'étude de ces substances actives reste toujours nécessaire, en raison de la diversité des molécules rencontrées et qui possèdent des propriétés thérapeutiques ou toxiques différentes, pour une même variété botanique. Ainsi, la détermination des paramètres induisant cette variabilité dans la composition chimique conduit à l'utilisation à bon escient de telles substances actives.

La partie du travail relatée dans ce chapitre a permis d'identifier les étages bioclimatiques de la matrice végétale étudiée et de souligner l'influence du lieu de récolte de la plante sur la teneur et la qualité des huiles essentielles. Ces dernières ont été classées individuellement à partir de la détermination de leurs chémotypes, selon leur répartition géographique, et par la mise en évidence de l'influence de l'étage bioclimatique sur leur composition chimique, et particulièrement sur le composé majoritaire. En effet, les essences des régions caractérisées par un quotient pluviothermique Q_2 supérieur ou égal à 60 sont de type α -Pinène, alors que celles à Q_2 inférieur à 60, sont de type Camphre.

Pour diverses régions d'Algérie, nous avons également, tenté de classer l'espèce de Romarin étudiée (*Rosmarinus officinalis* L.), en fonction de la variation en antioxydants majoritaires identifiés et quantifiés. Nous avons conclu que cette variation ne pouvait être expliquée seulement par la différence de climat.

Références bibliographiques

- [¹] Emberger L. (1930). « La végétation de la région méditerranéenne. Essai d'une classification des groupements végétaux ». Rev. Gen. Bot. 42, 641-662 et 705-721.
- [²] Emberger L. (1971). « Travaux de botanique et d'écologie ». Ed. Masson. Paris, France. 520.
- [³] Meziane-Assami D., Tomao V., Ruiz K., Meklati B.Y., Chemat F. (2013). Geographical differentiation of Rosemary based on GC/MS and fast HPLC analyses. Food. Anal. Method. 6, 282-288.
- [⁴] Emberger L. (1955). « Une classification biogéographique des climats ». Recueil des travaux des Laboratoires de Botanique, de Géologie et de Zoologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Montpellier. France. 7, 3–43.
- [⁵] Napoli E.M., Curcuruto G., Ruberto G. (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. Biochem. Syst. Ecol. 38, 659-670.
- [⁶] Zaouali Y., Bouzaine T., Boussaid M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food. Chem. Toxicol. 48, 3144-3152.
- [⁷] Elamrani A., Zsira S., Benjilali B., Berrada M.A. (2000). A study of Moroccan rosemary oils. J. Essent. Oil. Res. 12, 487-495.
- [⁸] Boutekdjiret C., Buatois B., Bessiere J.M. (2005). Characterisation of Rosemary Essential Oil of Different Areas of Algeria. J. Essent. Oil. Bear. Pl. 8, 65 – 70.
- [⁹] Tigrine-Kordjani N., Meklati B.Y., Chemat F. (2006). Microwave 'dry' distillation as an useful tool for extraction of edible essential oils. Int. J. Aromather. 16, 141–147.
- [¹⁰] Herrero M., Plaza M., Cifuentes A., Ibáñez E. (2010). Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. J. Chromatogr. A. 1217, 2512-2520.
- [¹¹] Tucker A.O., Maciarello M. J. (1986). The essential oils of rosemary cultivars. Flavour. Frag. J. 1, 137–142.
- [¹²] Benhabiles N.E.H., Ait Ammar H. (2001). Comparative study of Algeria's *Rosmarinus eriocalyx* and *Rosmarinus officinalis*. Perfumer & Flavorist. 26, 40 – 48.
- [¹³] Diab Y., Auezova L., Chebib H., Chalchat J.C., Figueredo G. (2002). Chemical composition of Lebanese rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil as a function of the geographical region and the harvest time. J. Ess. Oil Res. 14, 449 - 452.
- [¹⁴] Aruoma O.I., Halliwell B., Aeschbach R., Loligers J. (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. Xenobiotica. 22, 257–268
- [¹⁵] Shylaja M.R., Peter K.V. (2004). «The functional role of herbal spices». In: Peter, K.V. ed. Handbook of Herbs and Spices. Vol. 2. Woodhead Publishing Limited. England.

Chapitre VI :
Extraction par Soxhlet Assisté par Micro-ondes
(SAM) : Application et Optimisation

VI.1. Description de l'étude

Cette partie traite de la mise en place d'un nouveau procédé d'extraction des antioxydants par micro-ondes (SAM). L'idée de ce procédé a été développée à la suite de l'étude réalisée par Virot et coll. [1] sur l'extraction des matières grasses dans les matrices alimentaires solides. L'étude s'est concentrée dans un premier temps sur l'adaptation du montage relatif à l'extraction des antioxydants décrit précédemment (Partie IV.6.2.) et dans un second temps, sur l'optimisation des conditions opératoires, pouvant améliorer le rendement de l'extraction. Une étude comparative entre le procédé Soxhlet Assisté par Micro-ondes (SAM) et le procédé du Soxhlet classique, a été réalisée en terme de rendement, de cinétique d'extraction et de composition chimique en antioxydants obtenus.

VI.1.1. Méthodologie des plans d'expériences

Dans le cadre du plan expérimental, le logiciel Statgraphics utilisé, a permis de développer un plan d'expériences de type « Composite Centré », réalisé en 20 expériences, dans lesquelles trois paramètres ont été testés pour déterminer leurs influences sur le rendement d'extraction.

VI.1.1.1. Objectif de l'étude

La présente étude a pour objectif :

- d'identifier, en utilisant le nouveau procédé d'extraction (SAM), les facteurs qui influent le plus sur le rendement d'isolation des antioxydants de la matrice végétale.
- de trouver les conditions opératoires optimales qui permettent l'obtention de l'extrait le plus riche en antioxydants naturels.

VI.1.1.2. Facteurs et domaine d'étude

Les facteurs d'étude, (c'est-à-dire les facteurs dont les niveaux sont contrôlés au cours de ce plan d'expériences) sont au nombre de trois tels que cités ci-dessous :

- Le premier facteur **E**, représente le temps requis pour effectuer l'étape d'extraction.
- Le second facteur **L**, indique le temps nécessaire à l'étape de lessivage.
- Le troisième facteur **P**, reflète la puissance fournie par le four à chauffage par micro-ondes.

Le domaine d'étude, défini par les niveaux bas, haut et centre de chaque facteur examiné, est présenté dans le Tableau IV.8 de la Partie Expérimentale.

[1] Virot M., Tomao V., Colnagui G., Visinoni F., Chemat F. (2007).

VI.1.1.3. Réponse

Dans ce travail, la grandeur d'intérêt est le rendement d'extraction des antioxydants par la méthode SAM. Les réponses sont exprimées en pourcentage d'antioxydants extraits par rapport à la masse de matrice sèche utilisée.

VI.1.1.4. Réalisation des essais et résultats obtenus

Les essais ont été réalisés conformément à la matrice du plan d'expériences (Tableau VI.1) et selon l'ordre aléatoire donné par le logiciel. Les résultats sont reportés dans le Tableau VI.1 qui récapitule les variables opératoires (réelles et codées) des trois facteurs impliqués dans l'extraction et les rendements obtenus pour chaque expérience.

Une partie des travaux relatés dans ce chapitre a fait l'objet du chapitre de livre intitulé :

« Microwave Extraction of Antioxidants from Rosemary Leaves: A Green Approach ». Chapter 14, pp. 327-342. In: «Plant Extracts: Role in Agriculture, Health Effects and Medical Applications». 1st edition, Ed., Giordano A & Costs A. Nova Science Publishers.
Meziane Assami D., Tomao V., Ruiz K., Meklati B.Y., Chemat F. (2013).

Tableau VI.1: Expériences réalisées dans le plan expérimental et rendements obtenus.

Essai	Ordre	Plan codé			Plan décodé			Réponse
		E	L	P	Temps (min)		Puissance (W)	Rendement (%)
					Extraction	Lessivage		
1	3	-1	-1	-1	8	8	500	12,46
2	17	1	-1	-1	16	8	500	11,05
3	15	-1	1	-1	8	16	500	12,50
4	9	1	1	-1	16	16	500	12,26
5	18	-1	-1	1	8	8	700	8,90
6	10	1	-1	1	16	8	700	9,05
7	6	-1	1	1	8	16	700	9,26
8	19	1	1	1	16	16	700	9,21
9	11	$-\alpha$	0	0	5	12	600	11,53
10	13	α	0	0	19	12	600	13,81
11	12	0	$-\alpha$	0	12	5	600	9,00
12	4	0	α	0	12	19	600	13,82
13	2	0	0	$-\alpha$	12	12	430	12,86
14	7	0	0	α	12	12	770	9,06
15	20	0	0	0	12	12	600	14,01
16	5	0	0	0	12	12	600	13,92
17	1	0	0	0	12	12	600	14,21
18	8	0	0	0	12	12	600	14,17
19	16	0	0	0	12	12	600	13,84
20	14	0	0	0	12	12	600	13,90

L'analyse des résultats du Tableau VI.1, révèle que les réponses obtenues (de 8,90 à 14,21%) varient en fonction des niveaux des facteurs impliqués dans l'expérience. Pour déterminer quels sont les paramètres influençant de façon significative le rendement d'extraction, un test de significativité des effets linéaires, quadratiques de chaque paramètre ainsi que des interactions est réalisé et représenté par le diagramme de Pareto (Figure VI.1).

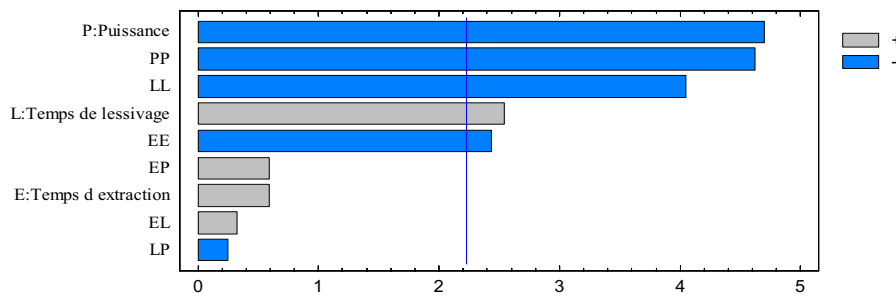


Figure VI.1 : Diagramme de Pareto pour le rendement en antioxydants du Romarin

PP : Effets quadratique de la puissance. LL : Effets quadratique de l'étape de lessivage.
 EE : Effets quadratique de l'étape d'extraction. EP : interaction entre facteur temps d'extraction et puissance
 EL : interaction entre facteur temps d'extraction et temps de lessivage. LP : interaction entre facteur temps de lessivage et puissance

Comme le montre ce diagramme, pour chaque variable, les effets (linéaires, quadratiques, interactions entre facteurs) contribuant à la réponse sont classés selon leur ordre décroissant d'importance. La longueur des barres sur ce graphique est proportionnelle à la valeur absolue de l'amplitude des effets estimés des facteurs. La barre transversale représente l'amplitude minimale à partir de laquelle les effets seront considérés comme étant statistiquement significatifs sur la réponse étudiée [2]. Nous observons sur ce diagramme que le paramètre le plus influant est la puissance d'irradiation (P). Les effets quadratiques de la puissance micro-ondes appliquée (PP) et de l'étape de lessivage (LL) présentent également une influence d'un même ordre. Le temps de lessivage (L) et l'effet quadratique de l'étape d'extraction (EE) suivent avec une importance moins significative mais cependant remarquable. D'autre part, il est constaté le manque de significativité des effets de l'étape d'extraction tel que le temps (E) et des produits croisés (ou interactions entre variables : EP, EL, LP). Ce manque de significativité entre les produits croisés, laisserait à penser à une absence totale d'interactions entre les variables dans le domaine expérimental étudié [2].

[2] Virot M. (2009).

Le logiciel de calculs statistiques Statgraphics permet d'effectuer différentes opérations fondées sur l'analyse de la variance. Cette analyse est couramment rapportée sous sigle abrégé Anglais ANOVA pour « ANALYSIS OF VARIANCE ». Elle permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le modèle étudié et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la réponse étudiée, en l'occurrence, ici le rendement en antioxydants extraits. Le principe de cette analyse consiste à comparer entre-elles, les variances des expériences réalisées de manière à évaluer si elles diffèrent ou non de la moyenne [2]. Ainsi, la pertinence statistique de chaque facteur est déterminée tel que représenté dans le Tableau VI.2.

Tableau VI.2: Données obtenues à partir de l'analyse de la variance du modèle statistique

Source	Somme des carrés	Ddl	Carrés moyens	Rapport F	Valeur p
E: Temps d'extraction	0,382157	1	0,382157	0,35	0,5693
L: Temps de lessivage	7,1423	1	7,1423	6,47	0,0292
P: Puissance micro-ondes	24,3634	1	24,3634	22,07	0,0008
EE	6,55006	1	6,55006	5,93	0,0351
EL	0,117612	1	0,117612	0,11	0,7508
EP	0,382813	1	0,382813	0,35	0,5690
LL	18,0662	1	18,0662	16,37	0,0023
LP	0,0666125	1	0,0666125	0,06	0,8109
PP	23,5655	1	23,5655	21,35	0,0010
Erreur totale	11,0394	10	1,10394		
Total	84,474	19			

$$R^2 = 86,93 \%$$

Ddl : Degré de liberté

Les coefficients discutés dans le Tableau VI.2 sont, pour chaque paramètre et ses effets, la valeur p (ou p -value) et le quotient F (ou $ratio F$). Le premier permet de valider l'hypothèse selon laquelle le facteur a un effet (si la valeur p ne dépasse pas 0,05) et le second, qui représente le rapport de la variance de diverses répétitions d'un échantillon à celle des moyennes entre tous les échantillons [3], évalue la robustesse du modèle.

^[3] Ben Amor B. (2008).

L'effet d'une variable est significatif quand la valeur du quotient F est importante et celle de p faible ($p < 0.05$) [4]. D'après les résultats de l'analyse de la variance (Tableau VI.2), nous constatons que la plus faible valeur p (0,0008) et le plus important quotient F (22,07) correspondent à la variable indépendante : puissance d'irradiation (P). L'effet linéaire de cette variable est jugé significatif, ce qui conduit à conclure que le facteur de puissance d'irradiation est le paramètre le plus influant sur le rendement d'extraction d'antioxydants. L'adéquation du modèle par rapport aux mesures expérimentales est exprimée par le coefficient de régression R^2 . Plus cette variable statistique est proche de 1, plus le modèle est adapté [3]. Joglekar et May [5] suggèrent que, pour un bon ajustement d'un modèle, R^2 doit être d'au moins 0,8. Dans le cas étudié, le coefficient R^2 est de 86,93 %, ceci implique que le modèle choisi rapporte une forte proportion de la variabilité de l'extraction des antioxydants en fonctions des effets des paramètres étudiés, ce qui corrobore le bon ajustement du dit modèle.

Modélisation mathématique

Le modèle mathématique obtenu prend la forme de l'équation polynômiale du second ordre (1) suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = -39,4117 + 0,634014 E + 1,9062 L + 0,136269 P - 0,0421357 E^2 + 0,00757812 EL + 0,000546875 EP - 0,0699779 L^2 - 0,000228125 LP - 0,000127876 P^2 \quad \text{Eq(1)}$$

où E représente le facteur temps d'extraction (min), L la durée de lessivage (min), P la puissance d'irradiation micro-ondes (W), E^2 , L^2 , P^2 les effets quadratiques des variables et EL , EP , LP les interactions entre les variables.

Le modèle mathématique de la réponse est utilisé par le logiciel pour calculer les réponses dans tout le domaine d'étude. La validité de ce modèle est vérifiée par calcul de la valeur réelle de la réponse au centre du domaine d'étude. Pour cela, il suffit d'attribuer la valeur décodée du niveau 0 aux trois facteurs (E , L , P) [6]. Dans le cas étudié, la réponse calculée au centre du domaine est de 14,038. Elle est très proche des valeurs (14,01 ; 13,92 ; 14,21 ; 14,17 ; 13,84 ; 13,90) calculées avec ce modèle. On peut donc admettre que le modèle de rendement en antioxydants est valide.

[3] Ben Amor B. (2008).

[4] Atkinson A.C., Donev A.N. (1992).

[5] Joglekar A.M., May A.T. (1987).

[6] Goupy J. (2005).

L'équation (1) permet de représenter graphiquement l'extraction des antioxydants du Romarin par Soxhlet assisté par micro-ondes sous la forme de surfaces de réponses en trois dimensions et de surfaces d'iso réponses (ou surfaces de contours) en deux dimensions (Figures VI.2 (a, b, c)).

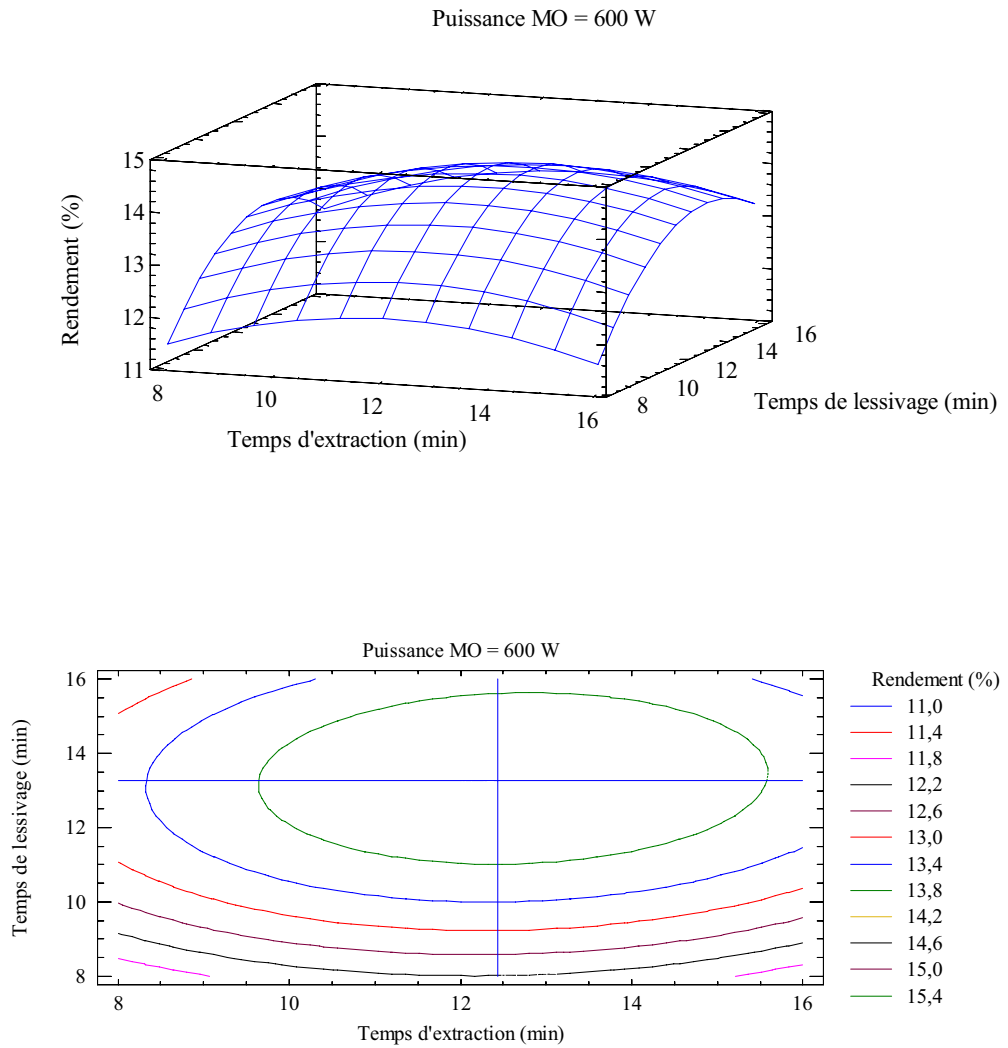


Figure VI.2a : Surfaces de réponses et d'iso réponses traduisant les effets combinés de temps de lessivage et du temps d'extraction sur le rendement en antioxydants.

Ces surfaces permettent de visualiser l'évolution de la variable réponse étudiée en fonction des paramètres de deux facteurs, lorsque le troisième est fixé à son niveau central. Il nous est alors permis de mettre en évidence la (ou les) relation(s) existante entre rendement et variables expérimentales impliquées dans le modèle ainsi que d'identifier et de déduire les conditions optimales d'extraction.

En fixant la puissance d'irradiation micro ondes à son niveau central, les surfaces de réponses et d'iso réponses traduisant les effets combinés du temps d'extraction et du temps de lessivage sur la réponse étudiée, sont représentés dans la Figure VI.2a. Sur cette figure nous constatons, que le temps d'extraction présente une très faible influence sur le rendement. Lorsque ce facteur est combiné au niveau « bas » du temps de lessivage, la réponse ne varie pas même si le temps d'extraction évolue vers son niveau supérieur. Néanmoins, la combinaison de ces deux facteurs suggère une influence sur le rendement lorsque la variable du temps de lessivage évolue vers le niveau « haut ». Cette analyse révèle un rendement maximal de 14,17% lorsque les deux variables, temps de lessivage et temps d'extraction sont combinées respectivement pour des valeurs de 13 et 12 minutes.

La Figure VI.2b illustre les surfaces bi- et tri-dimensionnelles des effets combinés de la puissance micro-ondes et du temps d'extraction sur le rendement en antioxydants, tout en gardant le temps de lessivage fixé au centre du domaine expérimental.

L'évolution de la variable réponse est visualisée par une légère courbure observable, pour atteindre un maximum de 14,38%, lorsque les deux variables (puissance micro-ondes et temps d'extraction) sont combinés respectivement aux valeurs de 550 W et 12 min.

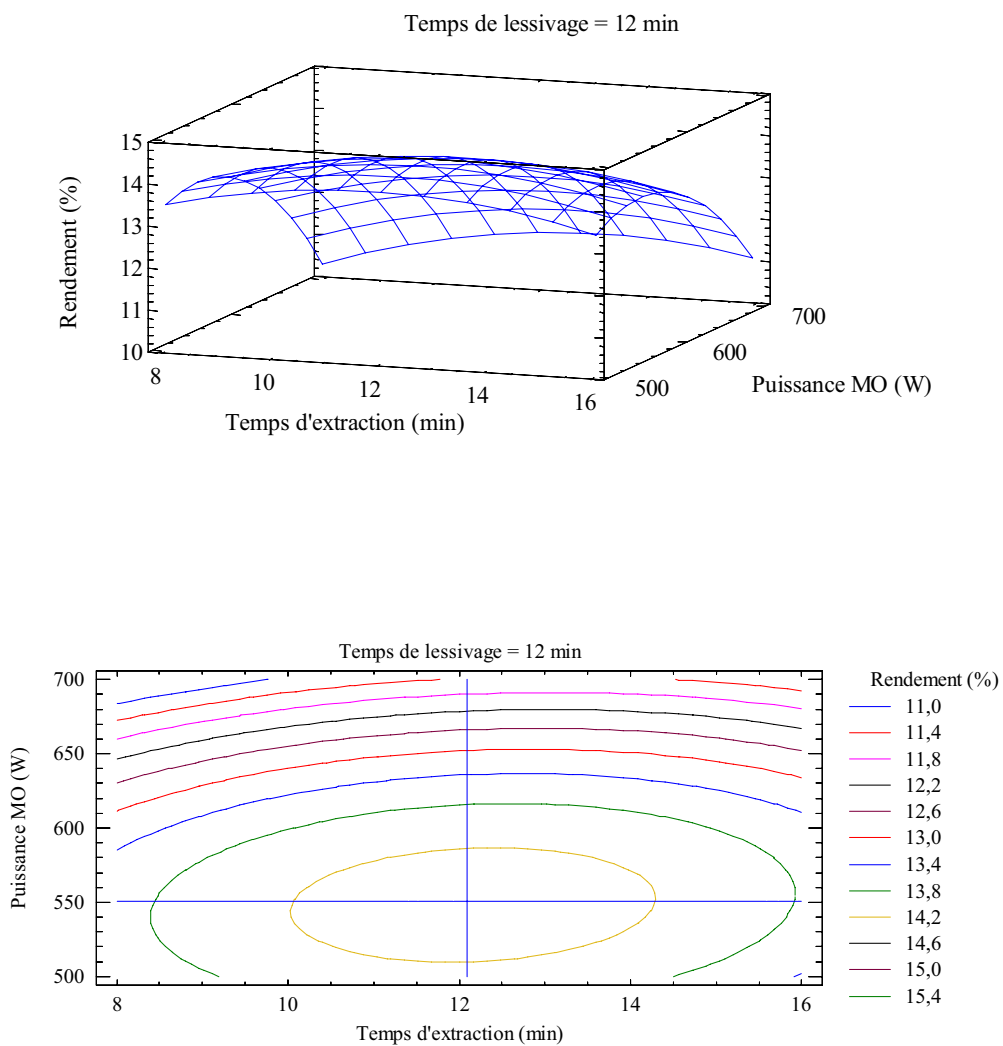


Figure VI.2b : Surfaces de réponses et d'iso réponses traduisant les effets combinés de la puissance micro-ondes et de temps d'extraction sur le rendement en antioxydants.

La surface de réponse et la projection en deux dimensions des effets combinés de la puissance micro-ondes et du temps de lessivage obtenues pour le rendement avec un temps d'extraction fixé au niveau central sont présentées dans la Figure VI.2c. Une légère courbure est également observée sur cette figure, suggérant une réponse maximale avec les niveaux moyens des deux variables combinées (E et P) et qui s'amortit lorsque les niveaux « hauts » des deux variables sont combinés. Le rendement maximum atteint est de 14,51% avec une puissance de 550 W et un temps de lessivage de 13 min.

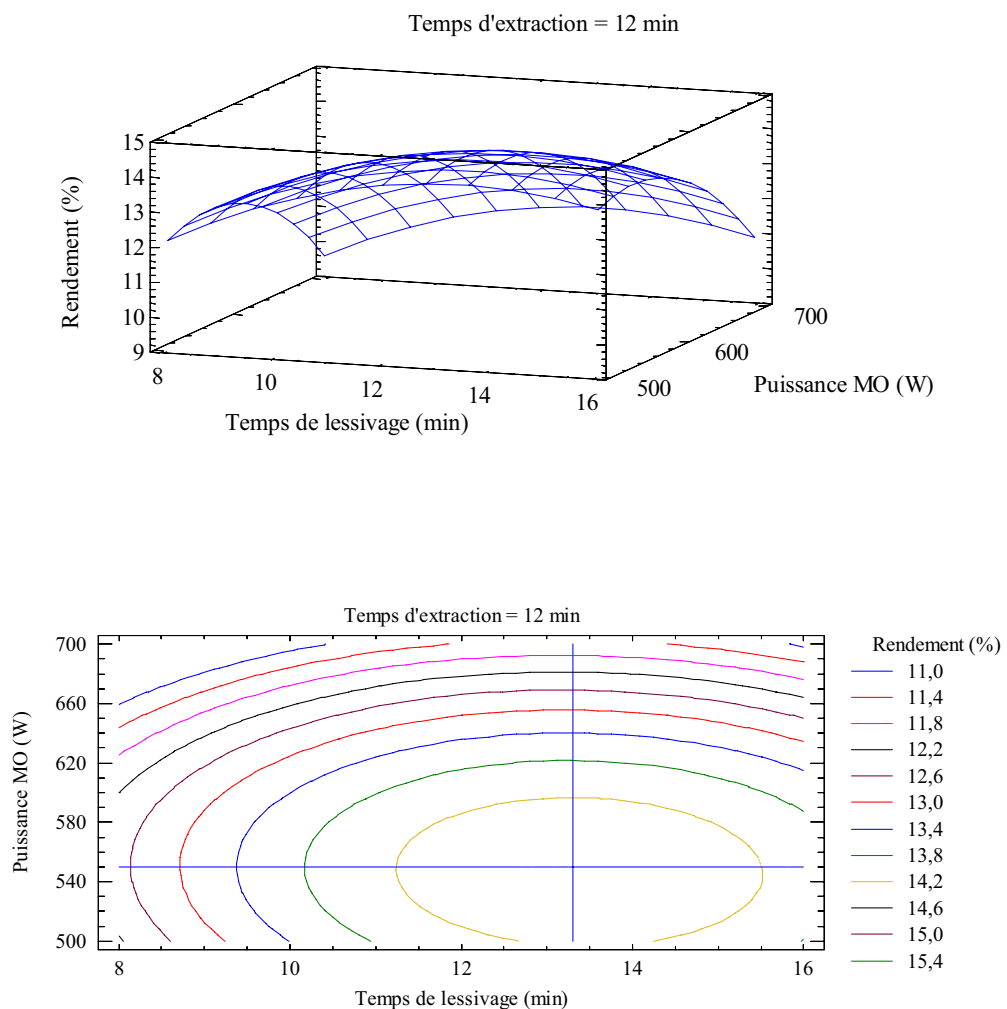


Figure VI.2c : Surfaces de réponses et d'iso réponses traduisant les effets combinés de la puissance micro-ondes et du temps de lessivage sur le rendement en antioxydants.

L'étude de ces six différentes surfaces confirme dans un premier temps les conclusions tirées à partir des analyses de la variance et du diagramme de Pareto. Les effets linéaires de la puissance d'irradiation et du temps de lessivage sont les variables les plus déterminantes. Les différentes surfaces laissent supposer que les rendements d'antioxydants présentent un maximum vers les niveaux « moyens » des variables.

A partir du modèle mathématique représenté par l'équation (1), le logiciel Statgraphics détermine les paramètres permettant une extraction optimisée. Dans la présente étude, les conditions optimales définies par le logiciel sont regroupées dans le Tableau VI.3. Elles sont conformes aux observations constatées lors de l'étude des surfaces de réponse. En utilisant les conditions optimisées, le modèle prédit une réponse maximale de 14,52%

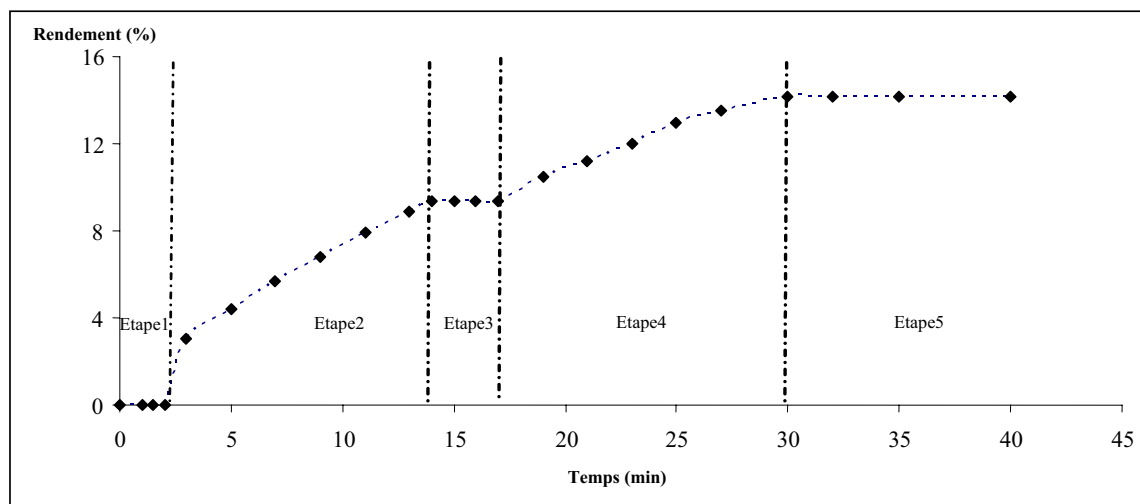
Tableau VI.3. Résultats obtenus lors de l'optimisation de l'extraction des antioxydants par SAM

Paramètres optimisés			Réponse optimale (%)
Temps d'extraction (min)	Temps de lessivage (min)	puissance micro-ondes (w)	
12	13	550	14,52

VI.1.2. Application

Ces conditions optimales d'extraction ont été utilisées dans l'extraction par la méthode SAM des antioxydants du Romarin de la région de l'INA. Un suivi cinétique de cette extraction a été réalisé et comparé à l'extraction des mêmes métabolites par la technique conventionnelle du Soxhlet. L'évolution du rendement en antioxydants lors de l'extraction par ces deux méthodes (SAM et Soxhlet), est représentée dans la Figure VI.3. Sur celle-ci, nous constatons clairement que l'extraction par la méthode SAM (Figure VI.3a) est plus rapide que celle réalisée par la méthode conventionnelle du Soxhlet (Figure VI.3b). Pour une durée totale d'extraction de 30 minutes, la SAM fournit un rendement de 14,16%, comparable à celui (14,13%) obtenu après 10 heures avec le Soxhlet.

(a)



(b)

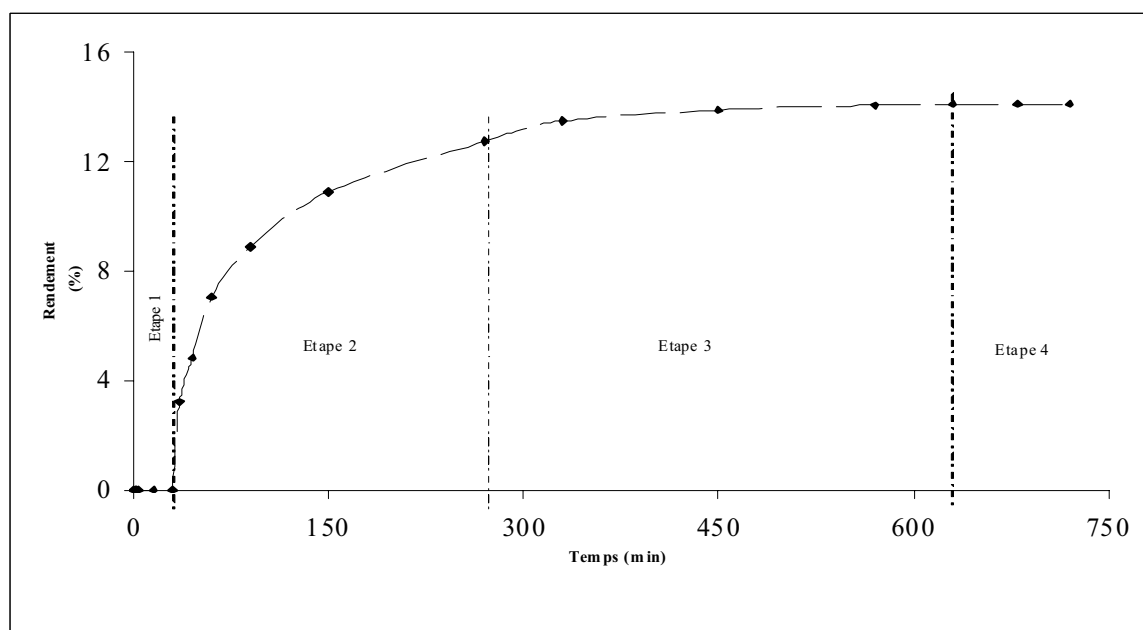


Figure VI.3. Cinétiques d'extractions des antioxydants de Romarin par SAM (a) et par Soxhlet (b)

L'étude cinétique en Figure VI.3a, montre l'existence de cinq étapes, en relation avec le montage d'extraction présenté dans la partie expérimentale (Figure IV.5) du Chapitre IV:

- La première phase réalisée en 2 minutes, est relative au chauffage du solvant par l'intermédiaire des micro-ondes jusqu'à ce qu'il atteigne son point d'ébullition tout en étant agité à l'aide d'un barreau magnétique.
- La seconde étape, correspond à l'extraction des composés ciblés. Les vapeurs de solvant traversent le tube d'extraction (voir le montage SAM de la Figure IV.5) et sont condensées à l'aide du réfrigérant. Elles sont alors redirigées vers le réacteur par l'intermédiaire du tube d'extraction. Ce processus constitue l'étape d'extraction, réalisée en 12 minutes et dans laquelle la matrice est sans cesse immergée dans le solvant en ébullition.
- La troisième étape d'une durée 3 de minutes, est liée au niveau du solvant contenu dans le réacteur (4a), qui est abaissé jusqu'à passer sous le niveau du support en Téflon (4b), par ajustement du robinet (8) placé sur le tube d'extraction (5).
- La quatrième étape d'une durée de 13 minutes, représente l'étape de lessivage, dans laquelle le robinet (8) est alors ajusté de manière à permettre au solvant de retourner dans le réacteur. Ceci crée un cycle dans lequel le solvant est sans cesse renouvelé à l'intérieur du réacteur, permettant ainsi de rincer continuellement la matrice avec un solvant propre et fraîchement recondensé.
- Enfin, au cours de la cinquième étape, la courbe tend vers un palier constant, qui correspond au rendement maximal possible pouvant être atteint sous ces conditions expérimentales optimisées.

La comparaison des deux techniques d'extraction présentées dans la Figure VI.3 (a et b), montrent que la première phase qui correspond au chauffage, est beaucoup plus rapide (2 minutes) pour l'extraction par SAM que par Soxhlet (30 minutes). La durée totale de l'extraction par SAM est relativement courte, puisqu'au bout de 30 minutes, le rendement n'évolue plus, alors qu'avec le chauffage classique, c'est à partir de cette durée que l'extraction commence.

Le rendement augmente rapidement durant les premières minutes : Au bout de 14 minutes d'extraction par SAM, le rendement atteint 8,86 %, ce qui correspond à une teneur de 62,57 % en antioxydants extraits. Par contre, pour atteindre ce même rendement par la méthode Soxhlet, il faut 60 minutes, son évolution devenant plus lente par la suite. Pour atteindre le même rendement optimal en antioxydants [14,16% (SAM) et 14,13% (Soxhlet)], il est nécessaire de réaliser l'extraction par Soxhlet avec une durée 20 fois supérieure à celle réalisée par SAM.

Nous pouvant conclure aisément que de cette façon lors d'une SAM, les effets négatifs du chauffage sur le matériel végétal seront minimisés.

VI.1.2.1. Analyse qualitative et quantitative des antioxydants

Après leur extraction, une comparaison des résultats d'analyse qualitative et quantitative par chromatographie liquide à haute performance des extraits en fonction de la méthode appliquée a été conduite. L'analyse qualitative montre la présence de 3 principaux composés qui sont l'acide Carnosique, le Carnosol et l'acide Rosmarinique [7], responsables de l'activité antioxydante du Romarin dans les fractions non-volatiles. Ces trois polyphénols ont été retrouvés dans les extraits obtenus par les deux méthodes, SAM et Soxhlet. Ils ont d'importantes activités biologiques *in-vitro*, en tant qu'agents anti-tumoraux, de chimioprévention et anti-inflammatoires [8, 9, 10]. La quantification de ces polyphénols, a été effectuée par la méthode de l'étalonnage externe en injectant les produits étalons externes présentés dans le Tableau VI.4. Les gammes de concentrations utilisées ont été choisies en fonction des teneurs relatives à chaque composé présent dans les extraits.

Tableau VI.4: Etalons utilisés pour la quantification

Composé	Acide Rosmarinique	Carnosol	Acide Carnosique
Temps de rétention (min)	12,115	24,959	28,052
Gamme de concentrations (µg/mL)	17,7 – 60	100 – 1000	136 – 1360
Equation d'étalonnage	$y = 3E+07x$	$y = 4E+06x + 55331$	$y = 3E+06x - 106223$
R ²	0,9953	0,9985	0,9964

[7] Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1996).

[8] Cheung S., Tai J. (2007).

[9] Ho C-T., Ferraro T., Chen Q., Rosen R.T., Huang M-T. (1994).

[10] Kuhlmann A., Röhl C. (2006).

Tableau VI.5: Quantification de trois polyphénols retrouvés dans le Romarin étudié

Méthode d'extraction	Composés phénoliques majoritaires du Romarin			Rendement d'extraction (%)	Temps d'extraction (min)
	Acide rosmarinique (g/100g)	Carnosol (g/100g)	Acide carnosique (g/100g)		
Soxhlet	1,83	0,49	1,08	14,13	600
SAM	1,44	0,53	1,11	14,16	30

Les résultats de l'analyse quantitative sont regroupés dans le Tableau VI.5. Il découle de ces résultats que la composition en antioxydants majoritaires du Romarin extrait par SAM (12 min, 13 min, 550 W) est proche de celle de l'extrait obtenu par Soxhlet (10 h). Comparativement au soxhlet, celle assistée par micro-ondes a permis une extraction plus rapide (30 minutes par SAM contre 600 min par Soxhlet), sans impact sur la composition et sur le rendement des molécules d'intérêt issus du Romarin. Ces résultats qualitatifs et quantitatifs équivalents entre les deux méthodes employées, ainsi que la réduction significative (20 fois moindre) du temps d'extraction par SAM, comparativement à la méthode classique, sont explicables par la particularité des micro-ondes à réaliser un chauffage efficace et rapide du milieu étudié [11].

^[11] Paré J.R.J., Bélanger J.M.R. (1997).

VI.2. Conclusion

De manière générale, le soxhlet surpasse en performance les méthodes conventionnelles d'extractions (hydrodistillation, entraînement à la vapeur ...) exception faite de champs d'application limités tel que l'extraction de composé thermolabiles. En plus de la faible extraction des lipides, la méthode classique du soxhlet présente quelques inconvénients tels que la durée du temps d'extraction, la consommation élevée en solvant et le fait que l'opération est effectuée à la température d'ébullition du solvant.

L'étude relatée dans ce chapitre, nous a permis l'optimisation et l'application d'un nouveau système d'extraction des antioxydants « Soxhlet Assisté par Micro-ondes (SAM) ». Cette nouvelle méthode a été comparée à la technique conventionnelle (Soxhlet).

L'optimisation de l'extraction par Soxhlet Assisté par Micro-ondes a été réalisée par application de la méthodologie des plans d'expériences en utilisant le logiciel Statgraphics, qui nous a permis d'étudier les effets des facteurs imbriqués sur la variabilité du rendement et de définir les paramètres optima d'extraction. Les conditions optimales ainsi trouvées ont été appliquées pour extraire les antioxydants du romarin par le nouveau procédé SAM.

A partir des résultats obtenus dans cette application, il apparait clairement que cette nouvelle technique employée, offre des extraits qualitativement et quantitativement similaires à ceux obtenus par Soxhlet classique dans un temps 20 fois plus court. Cette technique rapide semble être compatible avec l'environnement (rapidité, économie énergétique) et adaptée à l'extraction des antioxydants du Romarin.

Références bibliographiques

- [1] Virot M., Tomao V., Colnagui G., Visinoni F., Chemat F. (2007). New microwave-integrated Soxhlet extraction. An advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *J Chromatogr A*. 1174, 138-144
- [2] Virot M. (2009). « Soxhlet assisté par micro-ondes. Conception et application à l'extraction des matières grasses ». Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, France.
- [3] Ben Amor, B. (2008). « Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée (DIC) ». Université de La Rochelle, France.
- [4] Atkinson A.C., Donev A.N. (1992). « Optimum experimental designs ». Oxford: Oxford University Clarendon Press. 132-189.
- [5] Joglekar A.M., May A.T. (1987). Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World*. 32, 857–868.
- [6] Goupy J. (2005). « Pratiquer les plans d'expériences. Technique et Ingénierie ». Série Conception. Edition Dunod, Paris, France. ISBN 2 10 004217 3
- [7] Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and Rosemary. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 73, 645 - 652.
- [8] Cheung S., Tai J. (2007). Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol. Rep.* 17, 1525–1531.
- [9] Ho C-T., Ferraro T., Chen Q., Rosen R.T., Huang M-T. (1994). « Phytochemicals in Teas and Rosemary and Their Cancer-Preventive Properties ». Chapter 1, In: Ho C-T, Toshihiko O, Huang M-T, Rosen R.T, eds., *Food Phytochemicals for Cancer Prevention II*. Washington, DC, American Chemical Society, pp. 2-19.
- [10] Kuhlmann A., Röhl C. (2006). Phenolic Antioxidant Compounds Produced by *in Vitro*. Cultures of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Their Anti-inflammatory Effect on Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *Pharm. Biol.* 44, 401-410.
- [11] Paré J.R.J., Bélanger J.M.R. (1997). Chapter 10: Microwave assisted Process (MAP™): Principles and applications. In: « Instrumental Methods in Food Analysis », Edited by Paré J.R.J. et Bélanger J.M.R., Elsevier, Amsterdam, pp. 395-420.

Chapitre VII :

*Valorisation des déchets générés lors de l'extraction
des huiles essentielles de Romarin*

VII.1. Valorisation des coproduits

L'extraction des composés phénoliques à partir de déchets de Romarin, a été effectuée dans le but de valoriser économiquement les résidus issus de l'extraction de son huile essentielle et d'étudier l'impact de la technique d'extraction de l'essence utilisée sur la qualité et la rentabilité du déchet récupéré. Dans de nombreuses études, sur des matrices végétales dont le Romarin, l'activité antioxydante a été fortement corrélée à la présence de composés phénoliques [1, 2]. Il nous a donc paru pertinent de caractériser la qualité de chaque extrait, non pas par le rendement d'extraction, mais par une évaluation de son activité antioxydante liée directement à la teneur en composés phénoliques présents. La capacité antioxydante de chaque extrait a été obtenue par deux tests chimiques : la méthode utilisant le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•) et la méthode FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power). De plus, l'estimation du contenu en composés phénoliques totaux (TPC, Total Phenolic Content) via le test colorimétrique Folin-Ciocalteu (FC) a également été réalisée. Chaque extrait sera ainsi caractérisé par trois réponses différentes [3].

VII.1.1. Teneur en composés phénoliques totaux (TCP)

Le contenu en phénols totaux des extraits issus soit des déchets de Romarin, soit du Romarin brut a été déterminé par la méthode de Folin-Ciocalteu. Pour cela, avant l'analyse une courbe de calibration est préalablement réalisée, avec de l'acide gallique sous les mêmes conditions que celles des échantillons à analyser. Les teneurs en phénols totaux sont obtenues à partir des données d'absorbance et de la droite d'étalonnage de l'acide gallique réalisée entre 0 et 200 µg/ml, (Figure VII.1). Elles sont exprimées en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg eq.ag/g ES).

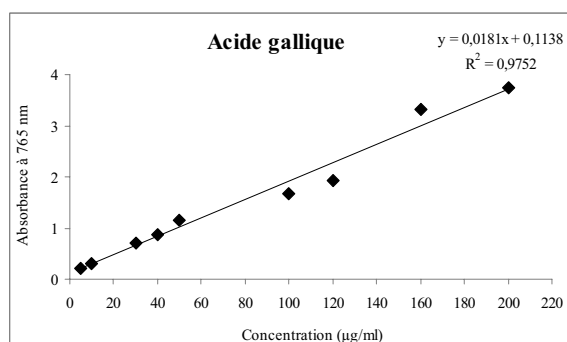


Figure VII.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

[1] Gao X., Ohlander M., Jeppsson N., Bjork L., Trajkovski V. (2000).

[2] Ruberto G., Renda A., Daquino C., Amico V., Spatafora C., Tringali C., Tommasi N.D. (2007).

[3] Michel T. (2011).

Tableau VII.1. Teneur en composés phénoliques totaux des extraits étudiés

Méthode d'extraction		Teneur en phénols totaux (mg eq.ag/g)*		
		Agitation magnétique	Micro-ondes	
Extrait de Romarin	Brut		602,8 ± 19,7	768,5 ± 8,6
	Déchet	ESSAM 300	564,0 ± 2,8	588,9 ± 5,3
		ESSAM 600	591,7 ± 7,5	600,0 ± 4,4
		ESSAM 1000	304,4 ± 7,4	457,8 ± 11,4
		HD	54,2 ± 2,7	112,7 ± 4,3
Temps d'extraction (min)		120	30	

* mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait sec.

ESSAM : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes. HD : Hydrodistillation.

300, 600, 1000 : Puissances d'irradiation micro-ondes (W).

Les résultats obtenus via le test FC (Tableau VII-1) mettent en évidence le fait que tous les extraits étudiés contiennent des composés phénoliques, et que, quelle que soit la technique utilisée (agitation magnétique ou micro-ondes), les résidus de Romarin générés après extraction de l'H.E par ESSAM à 300, 600 ou 1000 W, sont plus riches en composés phénoliques (304,4 à 591,7 mg eq.ag/g par agitation magnétique et 457,8 à 600 mg eq.ag/g par micro-ondes) que ceux obtenus après isolation de l'H.E par HD (54,2 – 112,7 mg eq.ag/g). L'extrait brut de feuilles de Romarin a présenté la teneur la plus élevée (602,8 – 768,5 mg eq.ag/g). Pour les déchets récupérés après l'ESSAM, nous constatons, que la teneur globale en composés phénoliques des résidus issus d'une puissance d'irradiation de 600W est la plus proche de celle du Romarin brut. Elle est significativement supérieure à celles des déchets relatifs à des puissances d'irradiation de 300 et 1000 W. Cette variation en composés phénoliques totaux, met en évidence l'influence de la puissance d'irradiation micro-ondes lors de l'extraction des huiles essentielles, sur la qualité des déchets récupérés. Les extraits les plus riches en composés phénoliques peuvent être considérés comme les plus antioxydants.

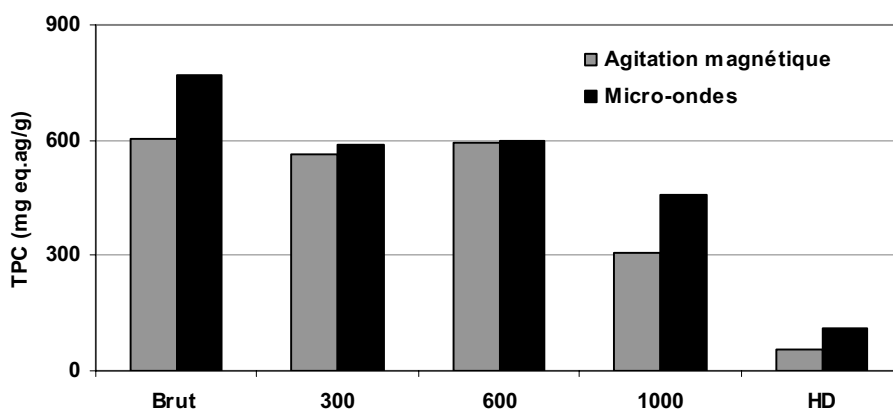


Figure VII.2 : Contenu en composés phénoliques totaux des extraits étudiés

Quant à la réalisation des extractions des composés phénoliques par les deux techniques « agitation magnétique » et « micro-ondes » (Figure VII.2), une différence significative a pu être relevée entre la TCP des extraits obtenus par micro-ondes (112,7 à 768,5 mg eq.ag/g) et celle des extraits obtenus par agitation magnétique (54,2 à 602,8 mg eq.ag/g). Cette différence montre la capacité des micro-ondes à donner, quelle que soit la matrice (déchet ou brut), des teneurs toujours plus importantes que celles obtenues par agitation magnétique. Il est intéressant de noter, le fait que les taux en composés phénoliques totaux des extraits issus des déchets ESSAM, sont très proches de ceux du brut, contrairement à ceux des déchets issus de l'HD qui restent très faibles. Ces derniers peuvent être attribués à la dégradation du végétal, du fait que l'hydrodistillation nécessite des durées d'extraction très longues avec un chauffage prolongé et puissant [4].

Tous ces résultats permettent de montrer que l'utilisation des micro-ondes :

- conduit à des co-produits de bonne qualité (après extraction des huiles essentielles par micro-ondes, la plante conserve mieux sa richesse en composé phénoliques)
- permet une meilleure extraction des composés phénoliques en un minimum de temps (30 minutes au lieu de 120 minutes par agitation magnétique).

^[4] Bruneton J. (1999).

VII.1.2. Activité antioxydante

Deux tests chimiques *in vitro* : l'un, évaluant le piégeage des radicaux libres, avec action du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire (DPPH•), et l'autre, déterminant le pouvoir réducteur antioxydant (FRAP, Ferric Reducing Antioxydant Power) ont permis d'évaluer l'activité antioxydante des extraits phénoliques du Romarin (brut et déchet). Pour chaque extrait, tous les tests ont été répétés trois fois pour chaque concentration.

VII.1.2.1. Mesure du pouvoir anti-radicalaire par le test DPPH•

La réduction du radical DPPH• par les antioxydants présents dans les extraits étudiés, a été suivie par spectrophotométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de ces antioxydants. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, est alors calculé et les courbes tracées (Figures VII.3 - VII.5). Le pouvoir antioxydant des extraits naturels testés a été estimé par comparaison avec le 2,6 tert Butyl, 4 méthyl phénol plus connu sous le nom de Butylhydroxytoluène (BHT), antioxydant de synthèse.

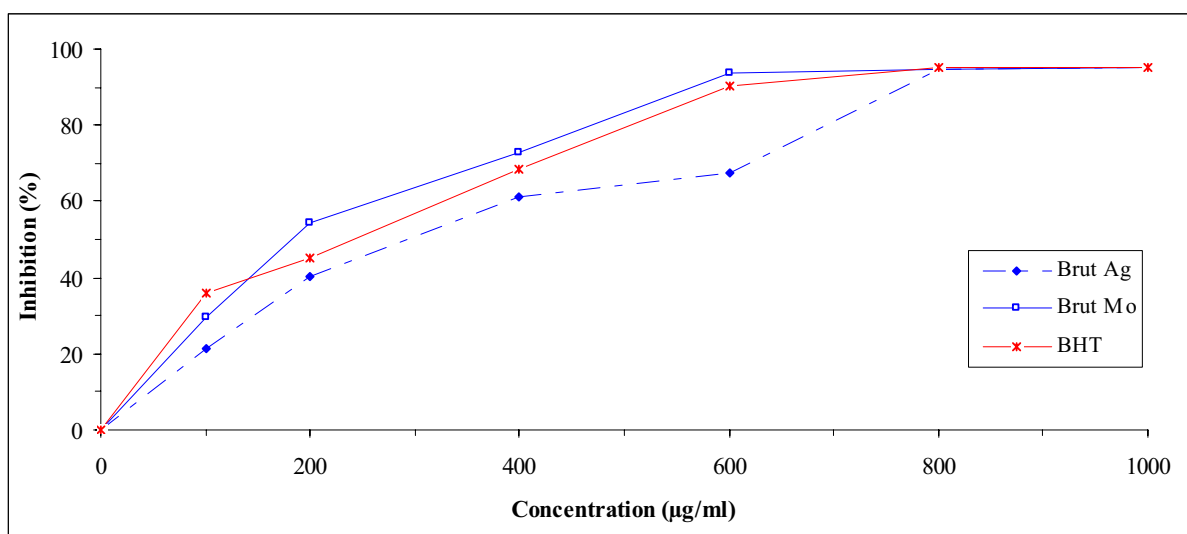


Figure VII.3: Taux d'inhibition des extraits de Romarin brut obtenus soit par agitation magnétique (Brut Ag), soit par micro-ondes (Brut Mo) et comparaisons à celui du BHT.

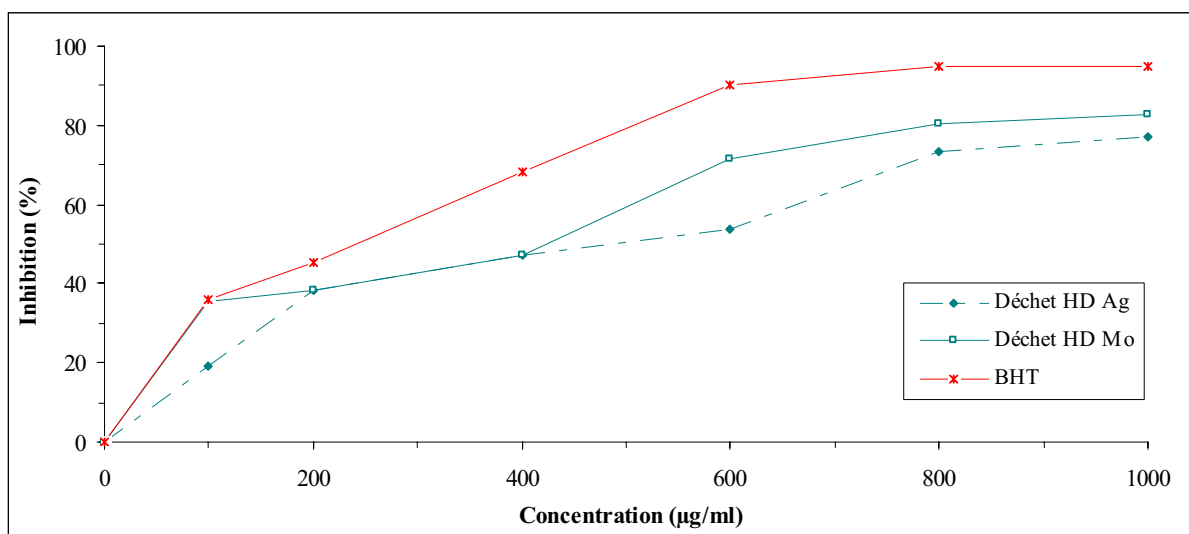


Figure VII.4: Taux d'inhibition des extraits obtenus à partir des déchets de Romarin (HD) soit par agitation magnétique, soit par micro-ondes.

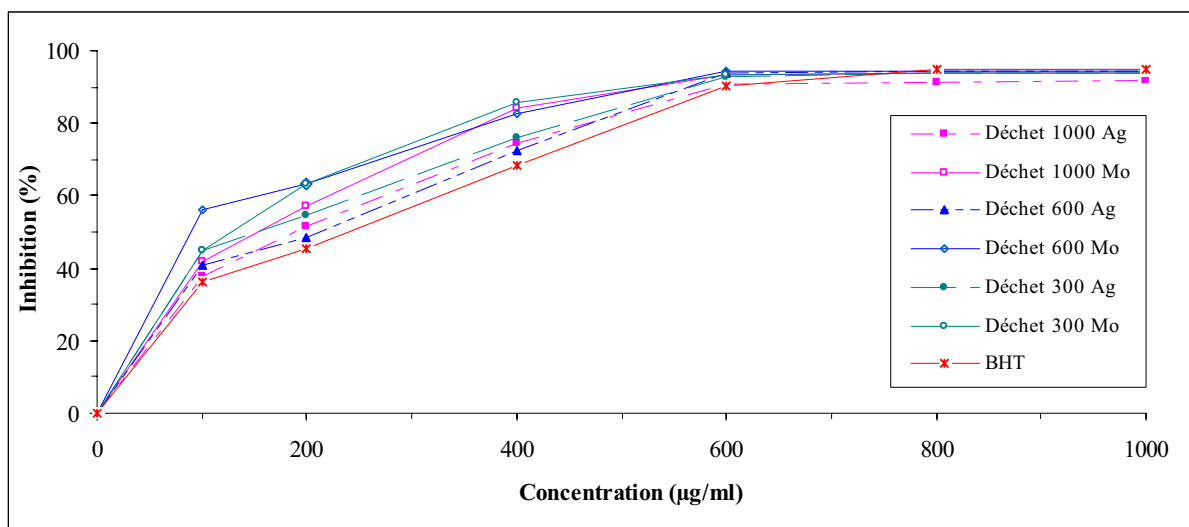


Figure VII.5: Taux d'inhibition des extraits obtenus à partir des déchets de Romarin (ESSAM à 300, 600 et 1000 W) soit par agitation magnétique, soit par micro-ondes.

A partir du tracé de ces courbes, nous voyons que l'extrait de Romarin brut, obtenu par micro-ondes ainsi que tous les extraits des déchets ESSAM (300, 600 et 1000) ont manifesté un important potentiel antioxydant, supérieur à celui du BHT, composé antiradicalaire de référence, dans cette partie de travail.

Ce résultat est particulièrement intéressant, par le fait que les déchets ESSAM ont permis d'avoir des composés phénoliques naturels avec un potentiel antioxydant plus puissant que celui de synthèse (BHT). Ceci prouve que les coproduits du Romarin issus de l'ESSAM ont conservé la richesse antioxydante de la plante. Parallèlement à notre étude, Blažeković et coll. [5], sur des extraits de feuilles, de tiges et de fleurs de lavande, où le potentiel antioxydant avait été corrélé à la présence des composés phénoliques de la plante, ont démontré que l'acide rosmarinique de la lavande, possédait une forte intensité de piégeage du radical DPPH•, quatre fois plus efficace que le BHT (témoin, référence de comparaison).

Concernant l'extrait brut et les extraits HD obtenus par agitation magnétique, l'activité de piégeage du radical DPPH• par le BHT est nettement plus importante que celles de ces extraits quelle que soient les concentrations considérées.

Les résultats des extraits obtenus par la méthode micro-ondes ont été comparés à ceux des extraits issus de l'agitation magnétique. Les profils obtenus présentent une phase stationnaire qui correspond à la réduction presque totale du DPPH• en sa forme non radicalaire, ce qui révèle une activité anti-radicalaire fortement dépendante des concentrations des extraits utilisés. Plus l'extrait antioxydant est concentré, plus le pourcentage d'inhibition du radical libre est important. Pour les différentes concentrations ($[c]$) considérées ($0 < [c] \leq 1000 \mu\text{g/ml}$), l'activité de piégeage du radical DPPH• par les extraits obtenus par micro-ondes est nettement plus importante que celle des extraits obtenus par agitation magnétique. La comparaison des moyennes du pouvoir de piégeage montre que l'extrait obtenu par micro-ondes du déchet ESSAM 600 W présente une activité significativement supérieure à celle de tous les extraits testés. Le pouvoir le plus élevé ($94,319 \pm 5,8 \%$) est observé pour une concentration de $0,6 \text{ mg/ml}$. Ce pouvoir est équivalent pour une même concentration, à ceux qu'exercent, les extraits ayant subi le même procédé d'extraction (micro-ondes), l'extrait brut ($93,548 \pm 3,5 \%$), l'ESSAM 300 ($93,569 \pm 1,9 \%$), l'ESSAM 1000 ($93,253 \pm 5,6 \%$) et l'HD ($71,498 \pm 6,9 \%$). À partir de la concentration $0,6 \text{ mg/ml}$ et à l'exception du déchet HD, la réduction du DPPH• est presque complète.

[5] Blažeković B. (2010).

Quant aux extraits obtenus par agitation magnétique et testés pour une même concentration (0,6 mg/ml), le déchet ESSAM 600 a aussi révélé le plus grand pourcentage d'inhibition du réactif DPPH• ($93,820 \pm 1,6 \%$) et suivi par ordre décroissant du déchet ESSAM 300 ($93,076 \pm 3,4 \%$), de l'ESSAM 1000 ($90,735 \pm 4,3 \%$), de l'extrait brut ($67,492 \pm 6,9 \%$) et enfin du déchet HD ($53,562 \pm 5,8 \%$).

VII.1.2.1.1. Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC₅₀)

L'IC₅₀ est le paramètre inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé. Il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 % [6]. Plus la valeur de l'IC₅₀ est faible, plus l'activité antioxydante d'un composé est forte. Les IC₅₀ sont déterminées graphiquement à partir des graphes tracés (pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés).

Tableau VII.2 : Concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC₅₀)

Echantillon			IC ₅₀ ^a	
			Agitation	Micro-ondes
Extrait de Romarin	Brut		$0,284 \pm 0,0014$	$0,174 \pm 0,0003$
	Déchet	300	$0,154 \pm 0,0009$	$0,126 \pm 0,0002$
		ESSAM 600	$0,207 \pm 0,0006$	$0,079 \pm 0,0001$
		1000	$0,186 \pm 0,0001$	$0,152 \pm 0,0002$
		HD	$0,488 \pm 0,0014$	$0,428 \pm 0,0004$
Antioxydant de synthèse	BHT	$0,242 \text{ mg/ml}$		

Les résultats de l'évaluation de la capacité de piégeage du radical DPPH• à partir de la détermination de l'IC₅₀, pour les différents extraits comparés à celle du BHT (antioxydant de synthèse) sont reportés dans la Figure VII.6. Ces résultats montrent que tous les extraits utilisés ont pu atteindre le seuil d'inhibition de 50 % des radicaux. L'extrait du déchet ESSAM 600 obtenu par micro-ondes, offre la meilleure activité antiradicalaire avec une valeur d'IC₅₀ de $0,079 \pm 0,0001 \text{ mg/ml}$.

^[6] Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001).

En comparant les valeurs des IC_{50} des différents extraits testés (déchets et brut) rapportées à celle du BHT, une activité antioxydante élevée est constatée pour les déchets issus de l'ESSAM (IC_{50} de 0,079 - 0,126 - 0,152 mg/ml respectivement pour l'ESSAM 600, 300 et 1000 W), meilleure que la capacité de piégeage du radical DPPH. par le BHT ($IC_{50} = 0,242$ mg/ml). Il en est de même pour l'extrait brut qui présente une activité antioxydante intéressante (IC_{50} de 0,174 mg/ml) par rapport au BHT. Par contre, celle des déchets HD ($IC_{50} = 0,488$ mg/ml), s'est révélée être moins efficace que celle du témoin (BHT). Les valeurs IC_{50} des déchets ESSAM sont les plus faibles, en remarquant que pour l'ESSAM 600, sa valeur est approximativement six fois plus faible que celle de l'HD, montrant par là que l'activité antiradicalaire du déchet ESSAM 600 est six fois plus importante que celle du déchet HD. Ce résultat pourrait être expliqué par le transfert des antioxydants de Romarin vers l'eau résiduelle issue de l'extraction par HD.

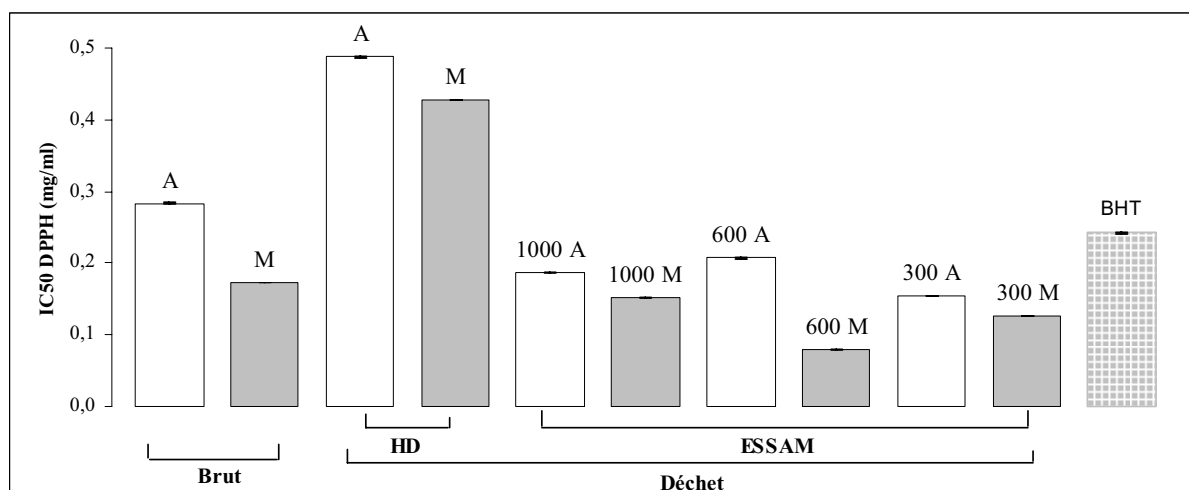


Figure VII.6 : Activité de piégeage du radical DPPH des différents extraits de Romarin comparée à celle du BHT

A : Agitation magnétique
M : Micro-ondes

VII.1.2.2. Mesure du Pouvoir Réducteur (FRAP, «Ferric Reducing Antioxydant Power»)

La capacité réductrice d'un composé peut servir d'indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [7]. La réduction de l'ion Fe^{+3} du complexe tripyridyltriazine ferrique $[(Fe(III)-TPTZ)_2]$ en ion ferreux Fe^{+2} du complexe tripyridyltriazine ferreux $[(Fe(II)-TPTZ)_2]$ par les extraits d'antioxydants du Romarin a été étudiée dans cette partie. Pour ce faire, une gamme étalon allant de 10 à 1000 $\mu g/mL$ est d'abord réalisée avec une solution aqueuse de chlorure ferreux ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$). A partir des valeurs des absorbances lues à 593 nm et mesurées à $t = 0$ min puis à $t = 4$ min, les résultats du test FRAP pour les divers extraits de Romarin sont exprimés en valeur FRAP selon la formule suivante, déjà citée en Partie IV.7.4.2. du Chapitre IV.

$$FRAP = \frac{A_{(échantillon)t=4\text{ min}} - A_{(échantillon)t=0\text{ min}}}{A_{(s\text{ tan dard})t=4\text{ min}} - A_{(s\text{ tan dard})t=0\text{ min}}} \times [s\text{ tan dard}] (\mu M)$$

L'activité réductrice des extraits étudiés a été suivie pour différentes concentrations (de 100 à 800 $\mu g/mL$). Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure VII.7. Nous avons constaté que pour la méthode FRAP, tous les extraits étudiés de la plante ont la capacité de réduire le fer, proportionnellement à l'augmentation de la concentration. Nous avons remarqué que les extraits du brut obtenus par micro-ondes et ceux issus de l'ESSAM (puissance micro-ondes 600 et 1000 Watts) présentent une capacité intéressante pour réduire le fer par rapport aux autres extraits, mais qui reste faible par rapport à celle de l'acide Ascorbique ou vitamine C, antioxydant hydrosoluble majeur [8], connu pour ses propriétés antioxydantes et utilisé comme standard.

[7] Yang J., Guo J., Yuan J. (2008).

[8] Curtay J.P., Robin J.M. (2000).

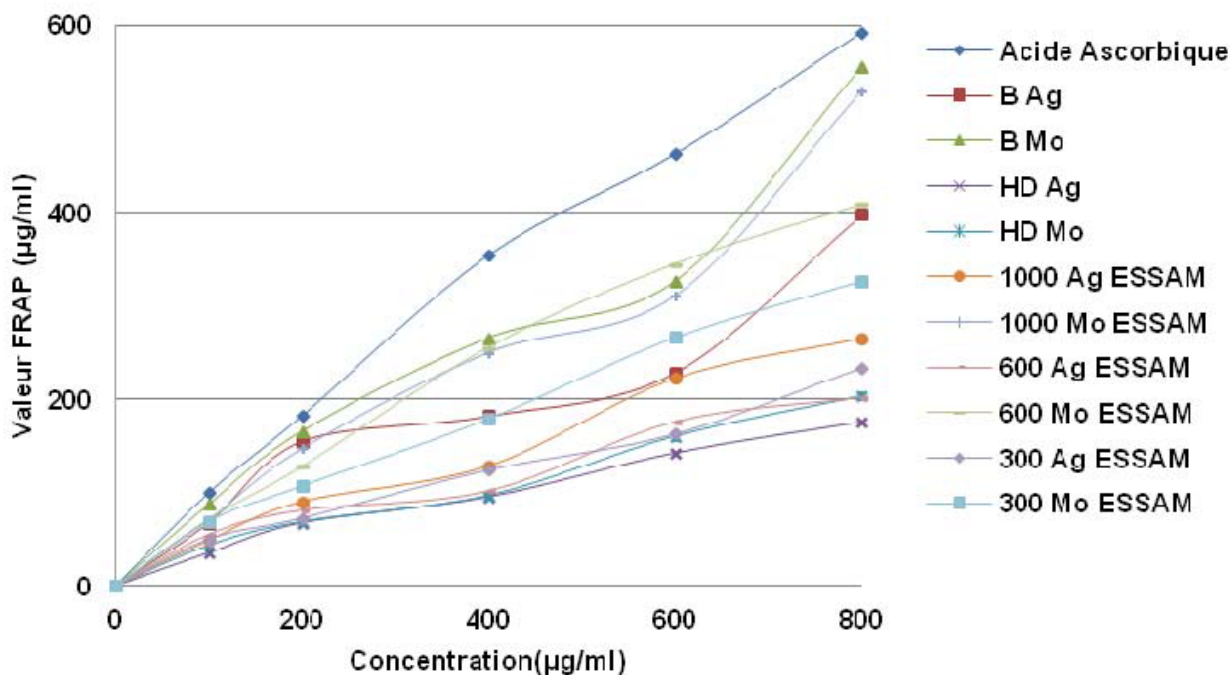


Figure VII.7 : Pouvoir réducteur des extraits étudiés et de l'acide Ascorbique par la méthode FRAP. Ag : Agitation. Mo : Micro-ondes. B : Brut. HD : Hydrodistillation.

Les pouvoirs réducteurs de l'extrait de Romarin brut obtenu soit par agitation magnétique (B Ag), soit par chauffage micro-ondes (B Mo) s'élèvent respectivement à 67,5 et 85,7 à la concentration de 100 µg/ml et à 397,7 et 556,1 à la concentration de 800 µg/ml. Cette capacité à réduire le fer est intéressante car elle avoisine celle de l'acide Ascorbique.

Les extraits issus des déchets de l'ESSAM présentent un pouvoir réducteur très net par rapport à ceux des déchets de l'HD, ces derniers présentant la plus faible activité, comme l'illustre la Figure VII.7.

A titre d'illustration, les résultats du test FRAP pour les extraits de Romarin à la concentration 100 µg/ml sont présentés dans la Figure VII.8.

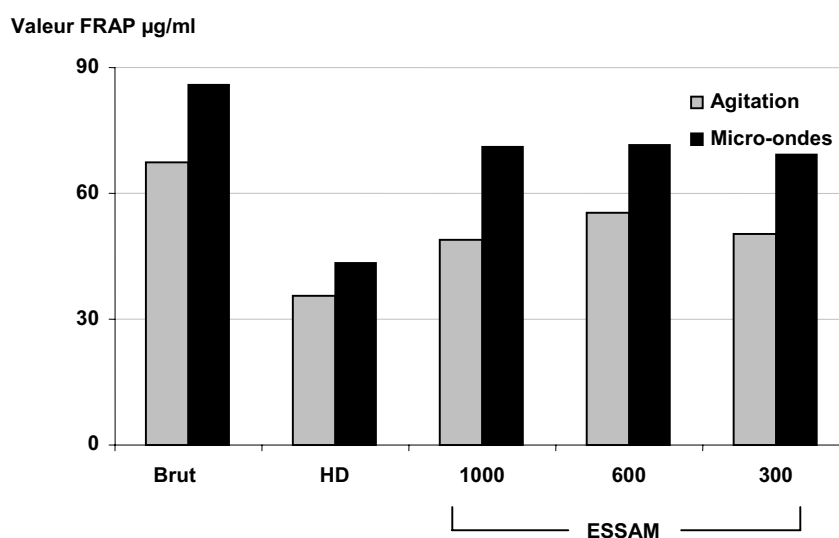


Figure VII.8 : Valeurs du pouvoir réducteur FRAP des extraits de Romarin (100 µg/ml) issus des échantillons du brut et des déchets traités par HD et ESSAM (300, 600, 1000)

Il ressort de l'histogramme comparatif de la Figure VII.8, construit à partir des deux techniques d'extraction (micro-ondes et agitation) que pour le test FRAP, les extraits les plus actifs sont ceux issus du brut et des déchets de l'ESSAM. Ils possèdent d'ailleurs, une activité antioxydante plus importante que celle de l'extrait issu du déchet de l'HD. D'autre part, les extraits obtenus par micro ondes sont toujours plus actifs que ceux obtenus par agitation.

Conclusion

L'étude réalisée dans ce chapitre, s'est intéressée à l'évaluation des activités antioxydantes d'extraits de Romarin (brut et déchets) en vue de leur valorisation en tant qu'antioxydants.

En se basant sur les résultats de détermination des teneurs en composés phénoliques totaux et sur ceux des deux tests chimiques (DPPH et FRAP), les déchets générés par ESSAM peuvent être déclarés comme étant les plus intéressants en termes de capacité antioxydante.

Les résultats trouvés dans ce chapitre, tendent à indiquer que la méthode d'extraction par micro ondes est plus efficace que celle par agitation, car elle permet l'obtention d'extraits plus actifs en un temps d'extraction plus court et ce pour une durée de 30 minutes au lieu de 2 heures par agitation.

Références bibliographiques

- [1] Gao X., Ohlander M., Jeppsson N., Bjork L., Trajkovski V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1485-1490.
- [2] Ruberto G., Renda A., Daquino C., Amico V., Spatafora C., Tringali C., Tommasi N.D. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chem.* 100, 203-210.
- [3] Michel T. (2011). « Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*) ». Thèse de doctorat. Université d'Orléans. France.
- [4] Bruneton J. (1999). « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». Editions Tec & Doc, Paris, France.
- [5] Blažeković B. (2010). Evaluation of Antioxidant Potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka': A Comparative Study with *L. angustifolia* Mill.
- [6] Pokorný J., Yanishlieva N., Gordon M. (2001). « Antioxidants in food, practical applications» CRC Press. Cambridge, England
- [7] Yang J., Guo J., Yuan J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT.* 41, 1060-1066.
- [8] Curtay J.P., Robin J.M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. Centre d'étude et développement de la nutrithérapie.

CONCLUSION GENERALE

Les plantes aromatiques et médicinales offrent une source inépuisable de métabolites secondaires et de substances naturelles bioactives. De meilleures connaissances et exploitation de ces plantes par l'étude de la composition chimique de leurs substances actives restent parmi les préoccupations majeures des chercheurs. De plus, le développement planétaire du secteur industriel avec son impact négatif sur l'environnement (élévation considérable de la consommation en énergie électrique et augmentation substantielle des quantités de rejets industriels (gaz, liquide et solide)), a amené les scientifiques à faire des recherches sur de nouvelles méthodes d'extractions alternatives, moins énergivores, et à trouver un moyen de valorisation des déchets issus de l'industrie.

Dans cette optique, les objectifs visés dans ce travail ont été :

- en première lieu, de faire une étude approfondie sur la composition chimique des fractions volatile et lourde du Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) issu de différentes aires géographiques nationales.
- en second lieu, d'appliquer une nouvelle technique nommée Soxhlet Assisté par Micro-ondes (SAM) à l'extraction des antioxydants.
- en dernier lieu, une quête dans la valorisation des déchets solides générés lors de l'extraction de l'huile essentielle de Romarin.

La première Partie des travaux de cette thèse, a permis de déterminer les rendements et les compositions des métabolites secondaires du Romarin issu de seize régions d'Algérie. Ainsi, nous avons pu constater que la qualité des huiles essentielles était fortement influencée par les étages bioclimatiques. La connaissance des compositions chimiques des huiles essentielles étudiées, nous a permis de les classer individuellement par chémotypes, selon leur répartition géographique. Les essences des régions caractérisées par un quotient pluviothermique $Q_2 \geq 60$ sont de type α -Pinène, alors que celles à $Q_2 < 60$, sont de type Camphre.

Pour un certain nombre de régions, nous avons également, tenté de classer l'espèce de Romarin étudiée, en fonction de la variation en antioxydants majoritaires, identifiés et quantifiés (Acide Carnosique, Carnosol et Acide Rosmarinique). Nous avons conclu que cette variation ne pouvait être expliquée à elle seule par la différence de climat.

Dans la deuxième Partie, la réalisation, l'optimisation et l'application d'un nouveau dispositif d'extraction des antioxydants -le « Soxhlet Assisté par Micro-ondes (SAM) » - ont été développées. Plusieurs étapes ont permis de parvenir à l'élaboration et à la validation de ce nouveau système d'extraction dont les performances ont été comparées à celle de la technique du Soxhlet traditionnel. Ce procédé innovant a été étudié, selon la méthodologie des plans d'expériences dans le but d'évaluer l'impact des variables sur l'extraction et de définir les paramètres optima.

Les conditions optimisées par micro-ondes ont permis de réaliser l'extraction des composés phénoliques du Romarin en seulement 30 minutes, alors que, la méthode conventionnelle d'extraction requerrait une durée 20 fois plus grande (10 heures), des résultats sensiblement équivalents à ceux de la méthode conventionnelle, en termes de rendement et de qualité d'extrait étant conservés. Ainsi, nous avons constaté que l'un des avantages majeurs de l'extraction des antioxydants par SAM restait incontestablement le gain de temps et donc par conséquent l'économie d'énergie.

Dans la troisième Partie, une série d'extractions de composés phénoliques ont été effectuées par deux techniques (micro-ondes et agitation magnétique) sur les déchets solides de Romarin, générés lors de l'extraction de son huile essentielle par les méthodes d'Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes (ESSAM) et par hydrodistillation (HD).

Nous avons conclu que la valorisation des coproduits était possible et qu'elle dépendait de la méthode utilisée pour extraire l'huile essentielle avant la récupération du déchet à valoriser.

La détermination de la teneur en composés phénoliques totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu des extraits étudiés, a permis de conclure que les déchets issus de l'ESSAM constituaient une source prometteuse d'antioxydants car ils présentaient des teneurs proches de celle de la plante brute.

Les résultats de l'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante des extraits, étudiée par la capacité de piégeage du radical DPPH., ont permis d'identifier les extraits les plus actifs. Les plus importantes valeurs inhibitrices sont à créditer en faveur de la plante brute et des déchets issus de l'ESSAM.

Un second test d'activité antioxydante -à savoir le test de la réduction du fer (FRAP)-, réalisé à titre comparatif, a conduit à des résultats en parfait accord avec ceux du DPPH. (les extraits des déchets ESSAM, sont plus actifs que ceux d'HD, quelque soit le test effectué).

Résumé

Les huiles essentielles des feuilles de Romarin issues de diverses régions d'Algérie, présentent des chémotypes relatifs à leurs étages bioclimatiques. Les variations observées sur les teneurs en composés phénoliques, ne reposent pas uniquement sur le climat.

L'extraction des composés phénoliques du Romarin par Soxhlet Assisté par Micro-ondes (SAM), durant 30 minutes, conduit à des extraits de même qualité que ceux obtenus avec le Soxhlet conventionnel, mais pour une durée 20 fois plus grande (10 heures).

Les déchets de Romarin générés lors de l'extraction de l'huile essentielle par ESSAM, peuvent être économiquement valorisés, en réalisant une seconde extraction des composés phénoliques.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis* L., Huiles essentielles, Hydrodistillation, Soxhlet, SAM, Antioxydants, Acide rosmarinique.