

République Algérienne Démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

جامعة الجبيلالي بونعامة بخميس مليانة

Université Djillali Bounaâma De Khemis Miliana

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département de : Biologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un diplôme de

Master en

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Science biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée.

Thème:

***Etude biologique de huile essentielle de Rosmarinus officinalis
de la wilava de Ain defla .***

Présenté par :

M^{elle} Bettahar Chahrazad

M^{elle} Chekalil Salima

Les membres de jury :

M^{elle} LATTAB.A Présidente MAB UDB Khemis Miliana

M^{elle} ABDELLI.W Examinatrice MCB UDB Khemis Miliana

M^r AMROUCHE.Z Promoteur MCB UDB Khemis Miliana

Année universitaire : 2019/2020



Remerciements

*Tout d'abord, nous remercions ALLAH le tout puissant, le sachant
qui nous a Remerciements*

*Louange à Dieu, Seigneur de l'univers, le tout puissant qui m'a inspiré
et comblé de bienfaits. Je Vous rends grâce.*

*L'occasion m'est ici offerte d'adresser mes sincères remerciements aux
nombreuses personnes qui m'ont prêté leurs précieux concours pour
élaborer et parachever ce mémoire, tout particulièrement à:*

*Nous remercions très sincèrement **Mr. Amrouche .Z** pour le temps qu'il
me consacre en examinant ce mémoire.*

*Nos remerciements le plus reconnaissances vont à **M^{lle} ABDELLI.W**
et pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements et respectueux vont à **M^{lle} LATTAB .A** qui à
bien faire l'honneur de présider ce travail.*

*- Mes remerciements vont aussi à Monsieur Brada- maitre de
conférence de l'Université de khemis miliana , qui m'a aidé pour ses
précieux orientations et conseils.*

*Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide
technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de ma profonde
reconnaissance donné le courage, la santé et la patience pour terminer
ces 5 ans et d'aller jusqu'au bout du rêve.*



Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents :

Pour leur soutien et leurs encouragements sans faille tout au long de mon parcours scolaire mais aussi personnel. Aucun mot ne serait exprimer tout mon amour et toute ma gratitude, merci pour vos sacrifices le long de ces années merci pour vos présence rassurante, et si j'en suis arrivée là s'est grâce à vous.

J'espère que le bon Dieu les garde, les comble de santé et leur une longue vie.

A mes sœurs et mes frères :

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je vous porte. Le vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de réussite.

Que Dieu vous protège et vous procure santé et joie succès dans vos études.

*A mon binôme, amie et consœur **BETTAHAR CHAHRAZAD** :*

Merci pour tous les moments privilégiés que nous avons passé ensemble et pour ton soutien.

Je te souhaite beaucoup de réussite pour ta vie future.

A ma famille et mes amis :

Pour tous les bons moments passés et à venir.

A tous ceux qui m'aiment et que j'aime :

Je dédie ce travail à ceux qui ont toujours cru en moi et m'ont soutenue corps et âmes.

SALIMA

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mon cher et tendre papa aucun dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer mon amour pour toi , tu a été et tu sera toujours la personne la plus important de ma vie , le pilier de mon existence , je te remercie infiniment pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de faire pour mon éducation et mon bonheur depuis ma naissance , jusqu'à mon âge adulte . je t'aime mon papa chérie.

Ma chère et tendre maman aucune phrase ne saurait montrer le degré d'amour et d'affections que j'éprouve pour toi .Tu m'as comblé avec ton soutien, ta tendresse et ton affection tout au long de mon parcours. Tu as toujours été présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait. Je t'aime maman chérie.

Mes frères que j'adore : Abdelkader,yahia, moussa que je remercie pour leur aide et dévouement, que Dieu nous garde toujours unis.

Mes chères sœurs qui ont toujours été présentes pour moi et qui me complent d'ameur : Ramana, Naima,Aïcha, Linda.

Tous mes proches

Tous mes enseignants

A tous mes amis

Pour notre amitié et tout les bons moments passés et à venir.

A tous ceux qui m'ont aidé lors de la réalisation de ce travail, merci

A tous

CHAHRAZAD

Liste des Figures

Figure 01 : Photo de <i>Rosmarinus officinalis</i>	04
Figure 02 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	09
Figure 03: structure des acides phénoliques dans le romarin.....	10
Figure04 : Structure de base des flavonoïde.....	11
Figure 05 : Montage d'hydrodistillation	16
Figure 06 : Schéma des appareils d'Hydrodistillation (A), et d'entraînement à la vapeur d'eau (B).....	17
Figure 07 : Schéma de procédé. d'hydrodéffusion.....	20
Figure 08 : Schéma de principe d'extraction par CO ₂ supercritique.....	21
Figure 09 : Montage d'extraction par solvant volatile.....	22
Figure 10 : Montage d'extraction assistée par micro-onde	24
Figure 11 : Feuille de <i>rosmarinus officinalis</i> séché.....	25
Figure 12: Les étapes d'extraction d'huile essentielle.....	27
Figure 13: hydrodistillateur pour l'extraction de l'huile essentielle.....	28
Figure 14: le milieu de culture « Mueller-Hinton ».....	30
Figure 15: Préparation des dilutions.....	31
Figure 16: Histogramme des Rendements d'extraction de l'huile essentielle du Romarin de khemis meliana.....	33
Figure 17: Histogramme des Rendements d'extraction de l'huile essentielle du Romarin de Djelida.....	34

Liste des Tableaux

Tableau 01 :Classification botanique de l'espèce de <i>Rosmarinus officinalis</i> l.....	05
Tableau 02 : les appareils de laboratoire utilisés.....	26
Tableau 03 :Rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles de romarin de Khemis miliana.....	32
Tableau 04 :Rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles de romarin de Djelida.....	33
Tableau 05 : Comparaison entre le rendement de région de Khemis miliana et Djelida	34

Liste des abréviations :

HE : Huile essentielle.

R(%) : Rendement.

RHE : Rendement d'extraction d'huile essentielle.

min : minute.

g : gramme.

mg : milligramme.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

PPm : Partie par million.

Mg/kg : milligramme par kilogramme.

MH : Muller Hinton.

µl : Microlitre.

DMSO : Dimethyl sulfoxyde.

GTS : Glutathion S-transférase.

% : pourcentage.

C° : degré celcius.

Table des matières

Remerciement

Dédicaces

Résumé

Liste des Figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Table des matières

Introduction 01

Partie bibliographique

Chapitre I : Généralité sur le Romarin.

I . Généralités sur le romarin..... 03

I.1. Historique..... 03

I.2.Ecophysiologie..... 03

I.3. Définition 03

I.4. Description botanique..... 04

I.5. Taxonomie 05

I.6. Habitat..... 05

I.7. Variétés et espèces..... 05

I.8. Utilisation 06

Chapitre II : Généralité sur l'huile essentielle.

II.1. Définition..... 07

II.2. Répartition 07

II.3. Localisation..... 07

II.4.Origine biosynthétique 08

II.5- Composition phénolique 10

 II.5.1-Les acides phénoliques 10

 II.5.2- Les Flavonoïdes..... 10

 • Structure chimique 10

II.5 .3 terpènes..... 11

II.6-Composition chimique de l'huile essentielle du romarin..... 11

Chapitre III : Domaines d'application du Romarin :

III.1-Domaine d'application du Romarin	12
III.1.1-Usage médicinale (phytothérapie)	12
✓ voie interne	12
✓ voie externe.....	12
III.1.2-En industrie agro-alimentaire.....	12
III.1.3- En industrie cosmétique et parfumerie.....	13
III.2. Les effets thérapeutiques des huiles essentielles du romarin.....	13
✓ Activité antibactérienne	13
✓ Activité anti-oxydante.....	13
✓ Activité antifongique	13
✓ Activité antivirale.....	14
✓ Activité ovicide.....	14
✓ Activité antiseptique.....	14
✓ Effet anti-cancérogène	14
✓ Effet anti-hépatotoxique	14
✓ Les propriétés anti-inflammatoires.....	14
✓ Effet anti-acétylcholinestérase	15
✓ Effet hypoglycémiant.....	15

ChapitreIV : Procédés d'extraction Des huiles essentielles:

IV.1. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	16
IV.1.1. Distillation – Evaporation.....	16
IV.1.1.1.Codistillation avec vapeur d'eau	17
IV.1.1.2.Codistillation avec un fluide autre que l'eau.....	18
IV.1.2.Distillation sèche.....	18
IV .1.3.Extraction au moyen de solvants.....	18
IV.1.4. L'enfleurage à chaud.....	19
IV .1.5. L'enfleurage à froid.....	19
IV.1.6. Hydrodiffusion.....	20
IV.2.Extraction par des techniques innovantes	21
IV .2.1. Extraction par CO ₂ supercritique	21
IV.2.2. L'extraction par solvants volatils	22

IV.2.3.Extraction par ultrasons.....	23
IV.2.4.Extraction par micro-ondes	23
Partie pratique	
Chapitre V : Matériels et méthodes	
V.1. Matériel.....	25
V.1.1. Matériel végétal.....	25
V.1.2. Matériel au laboratoire.....	25
V.1.3. Matériel biologique	26
V.2. Méthode	26
V.2.1. Méthode d'extraction de l'huile essentielle.....	26
➤ Principe de l'extraction des huiles essentielles	27
➤ Mode opératoire.....	218
➤ Détermination du rendement d'extraction.....	29
➤ Préparation de milieu de culture.....	29
➤ Préparation des dilutions	130
➤ Préparation des disques.....	31
Chapitre VII : Résultats et discussions	
VII. Résultats et discussions.....	32
VII.1.Extraction des huiles essentielles du <i>Rosmarinus officinalis L</i>	32
VII.2. Détermination du rendement.....	32
Conclusion	35

Résumé :

-Dans le cadre de notre étude des plantes médicinales, nous avons réalisé une étude phytochimique et biologique dans la plante *Rosmarinus officinalis*.

L'extraction d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* à été effectué par hydrodistillation de type clevenger.

-Le rendement obtenu à partir de l'extraction des feuilles du Romarin estimé par 0,55% la plus grande valeur cette dernière acceptable selon les normes en vigueur.

- L'étude antibactérienne amontré que les extraits du romarin agissent différemment sur les espèces bactériennes testées.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, huiles essentielles, le processus de distillation.

Abstract:

-As part of our study of medicinal plants, we performed a phytochemical and biological study in plant *Rosmarinus officinalis*.

The extraction of essential oil of *Rosmarinus officinalis* was performed by hydrodistillation of the type clevenger.

-Yield obtained by extracting oil security estimated at 0,55% as the largest value and the latter accepted by the applicable standards.

- The study showed that bacterial extracts rosemary act differently on the bacterial species tested.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, essential oil, distillation process.

ملخص:

- كجزء من دراستنا للنباتات الطبية , أجرينا دراسة نباتية و بيولوجية على نبتة الإكليل, حيث تم استخراج الزيت العطري

من الإكليل بواسطة تقنية التقطير من نوع : Clevenger

- المردود المتحصل عليه من خلال استخراج الزيوت للأوراق يقدر ب 0.55 بالمائة كأكبر قيمة و هذا الأخير مقبول حسب المعايير المعمول بها.

- أظهرت الدراسة ضد النشاط البكتيري أن مستخلصات الإكليل له نشاط مختلف على الأنواع البكتيرية.

- الكلمات المفتاحية إكليل الجبل , الزيوت الأساسية , عملية التقطير .



Introduction

Introduction

Un grand nombre des plantes, aromatiques, médicinales, des plantes épices et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et l'agriculture.

Certaines plantes sont douées d'odeur due à la présence de produits volatils dénommés huiles éthériques, huiles essentielles ou essences. Selon espèce, ces huiles sont localisées dans différentes parties des plantes (fleurs, feuilles, écorces, bois, fruits, grains...etc.)

Les quantités d'essences secrétées par les plantes sont extrêmement variables et les procédés, techniques utilisés pour l'obtention de ces essences sont aussi très variables. Les modes d'extraction les plus fréquemment employés sont l'expression, l'absorption ou l'enfleurage à froid, la macération ou enfleurage à chaud, la dissolution et les multiples variantes de la distillation (**Madjour , 2014**).

De manière générale, l'extraction des huiles essentielles préalable à l'analyse chimique se compose de deux étapes : l'extraction et l'analyse. Alors que l'étape analytique requiert en général quelques minutes, l'étape d'extraction nécessite plusieurs heures. C'est le cas de la méthode de cleverger. Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans l'eau portée à ébullition. Bien que très efficace et largement acceptée par la communauté scientifique, la distillation selon cleverger présente néanmoins plusieurs inconvénients. Les plus significatifs sont les longues procédures d'extraction requises et les grands volumes d'eau consommés (**Bousbia , 2011**).

La flore algérienne contient un nombre illimité de plantes présentant des vertus thérapeutiques. Le *Rosmarinus officinalis* (romarin) est une plante utilisée en médecine traditionnelle et dans l'industrie des parfums et des aliments. Il possède des propriétés anti-inflammatoires, antispasmodiques et une action stimulante sur le système nerveux. Cette plante est réputée également pour activer et faciliter les fonctions digestives. (**Mohhamdi , 2006**).L'objectif de notre travail est :

- L'étude de l'extraction des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* de la wilaya D'Ain defla.
- L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.
- L'étude de l'activité anti-oxydante des huiles essentielles.

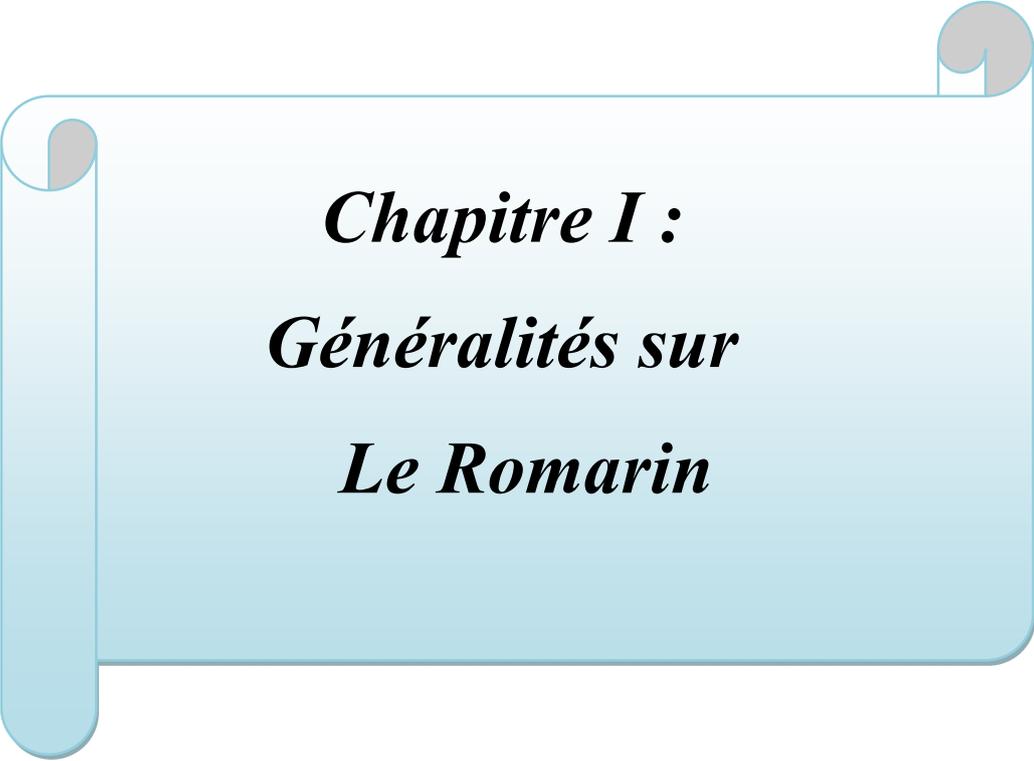
Notre travail se subdivise en quatre chapitres de la partie bibliographique :

- ✓ Le premier chapitre : est un rappel théorique sur la plante, on va donner une description botanique et systématique de *Rosmarinus officinalis* et son intérêt biologique.
- ✓ Le deuxième chapitre rapportera une généralité et les compositions des huiles essentielles du romarin.
- ✓ Le troisième chapitre portera sur les domaines d'application des huiles essentielles du romarin.
- ✓ Le quatrième chapitre portera sur les techniques d'extraction des huiles essentielles du romarin.



Partie

bibliographique



Chapitre I :
Généralités sur
Le Romarin

I. Généralités sur le romarin:**I.1-Historique:**

Le romarin est connu depuis l'antiquité, c'est l'espèce la plus utilisée dans le méditerrané surtout en Algérie. Elle possède plus de 3300 espèce et environ 200 genres.

Dans la Grèce antique : les étudiants se confectionnaient des couronnes de romarins car elles avaient la réputation d'améliorer mémoire et facultés intellectuelles (**Alma-Ata,1978**) .

Encore ; aujourd'hui en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens. Les anthropologues et les archéologues ont découvert que le romarin a été employé comme vertus médicinales, culinaires et cosmétiques en Egypte, Mesopotamia, Chine et en Inde antiques (**Stefanovits-Banyai et al., 2003**).

Actuellement le romarin est un aromate culinaire et fournit une huile essentielle encore recherchée par l'industrie des parfums. Le marché est étroit .le négoce se contente de la cueillette de gites sauvages. Mais chimiotypes et écotypes font que l'on peut être amené à réaliser des cultures de romarin (**Gilly , 2007**).

I.2- Ecophysiologie :

Le romarin est une espèce thermophile mais le jeune plant peut craindre les gelées (le sol gelé). Sur les rivages marins on le rencontre jusqu'à 1500 m d'altitude. Si l'espèce se rencontre souvent en terre calcaire, c'est par ce que le milieu est aride , mais on peut aussi le rencontrer sur le sol acide quand la pinède est peu favorables à d'autres espèces .

(**Gilly, 2007**).

I.3- Définition :

Le romarin du latin *Rosmarinus officinalis* (rose de mer) est une plante condimentaire et médicinale. Elle est originaire des régions méditerranéennes. Ainsi, on la considère parmi les plantes les plus répandues en Algérie. Elle préfère les lieux secs et arides, exposés au soleil. Cette plante est un arbrisseau de la famille des Labiées, appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, et antimicrobiennes. Le romarin est largement utilisé dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle (**Mecheri et al.,2017**).Encore ,le romarin a plusieurs noms vernaculaires : Iklil Aldjabal , Klil , Hatssalouban , Yasir , Azlir , Ouzbir , Aklel , Touzala (**Makhloufi , 2013**) .

I.4- Description botanique :

Cette plante appartient à la famille des Labiées. Elle se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacée (Zeghad, 2008) mesurant environ de 0.8 à 2 m de hauteur (Adjimi, 2014), il est facilement reconnaissable en toute saison à ses feuilles persistantes sans pétiole, coriaces beaucoup plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous. La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (Madjour , 2014) .



Figure 01 : photo de *rosmarinus officinalis*(Original).

I.5- Taxonomie :

Le nom latin *Rosmarinus* et habituellement interprété, comme dérivé «ros» : rosée et «marinus» : marin ou de marin ; sa taxonomie botanique comme suite :

Noms communs: Romarin, encensier, herbe aux couronnes ,rose des marins , rose de la mer, rose-marine (**Bousbia ,2011**)

Tableau 01:Classification botanique de l'espèce de *Rosmarinus officinalis* (**Quézel et al., 1963**) .

Règne	Plantes
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Dicotylédones
Ordre	<i>Lamiales (Labiales)</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i>

I.6- Habitat :

Le romarin pousse spontanément dans le sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semis ou de boutures au printemps. Il apprécie les climats chauds, modérément secs. En Algérie on trouve le romarin dans toute les communes, garrigues, forêts claires, et avec une floraison annuelle (**Beloued , 2001**).

I.7- Variétés et espèces:

-Il existe trois espèces de romarin :

- ❖ *Rosmarinus officinalis* Linné ; de loin l'espèce la plus aromatique et la plus importante.
- ❖ *Rosmarinus eriocalyx* ;
- ❖ *Rosmarinus tomentosus* .morphologiquement très proche de *Rosmarinus eriocalyx*. (**Bratels, 1997**)

I.8- Utilisation:

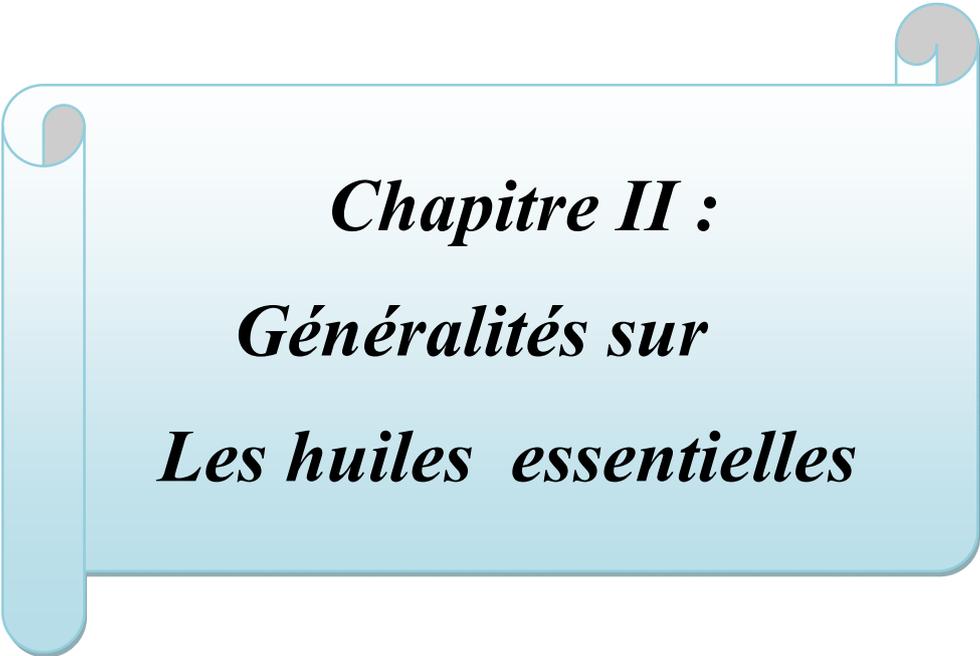
Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique et considéré utile pour contrôler l'érosion du sol. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique (**Gonzalez-Trujano et al., 2007**).

✓ Dans le Mexique et le Guatemala, il est employé principalement comme remède de Post-partum et traite également les problèmes respiratoires et les infections de la peau.

✓ En Espagne, l'huile du romarin est très populaire pour beaucoup de genres de douleur, y compris les douleurs musculaires rhumatismales et traumatiques (**Heinrich et al., 2006**)

✓ En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée Pour traiter les diabétiques (**Bakirel et al., 2008**).

Aussi utilisée dans le domaine alimentaire : dans Les pays occidentaux, utilisés l'épice du romarin dans les boissons alcoolisés. Les aliments cuits, viande et produits de viande, condiment et assaisonnement on utilise l'huile du romarin comme vinaigre (**Adjimi, 2014**)



Chapitre II :
Généralités sur
Les huiles essentielles

II.1-Définition :

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation (Oakes et al., 2001) ; Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire (Eckert et Knutson, 1993). Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce et pour certaines plantes dans les racines. (Valcarcel et al., 1994)

II.2- Répartition :

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y a 17500 espèces aromatiques.

Les familles botaniques capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont réparties dans un nombre limité des familles, Exemple :

Myrtaceae (girofle), *Lauraceae* (laurier), *Rutaceae* (citron), *Lamiaceae* (menthe), *Apiaceae* (coriandre), *Zingiberaceae* (gingembre)... etc.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemples: dans les sommités fleuries (menthe, lavande) les feuilles (eucalyptus, laurier) les rhizomes (gingembre) les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (vétiver), les graines (muscades), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (cannelier)

(Florence, 2012)

II.3- Localisation :

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante aromatique (Gonzalez-Trujano et al., 2007) .

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologiques spécialisés, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont: cellules à huiles essentielles de *Lauraceae*, les poils sécrétrices des *Laminaceae*, poches sécrétrices des *Myrtaceae*, des *Rutaceae*, et les *Laminaceae*, et les canaux sécrétrices qui existent dans de nombreuses familles. Il est intéressant de remarquer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante (Florence, 2012)

II.4.Origine biosynthétique :

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA.

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2',4', 6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone: la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes ; Des étapes ultérieures surtout de glycosylation et acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent *in vivo*. (**Madjour,2014**).

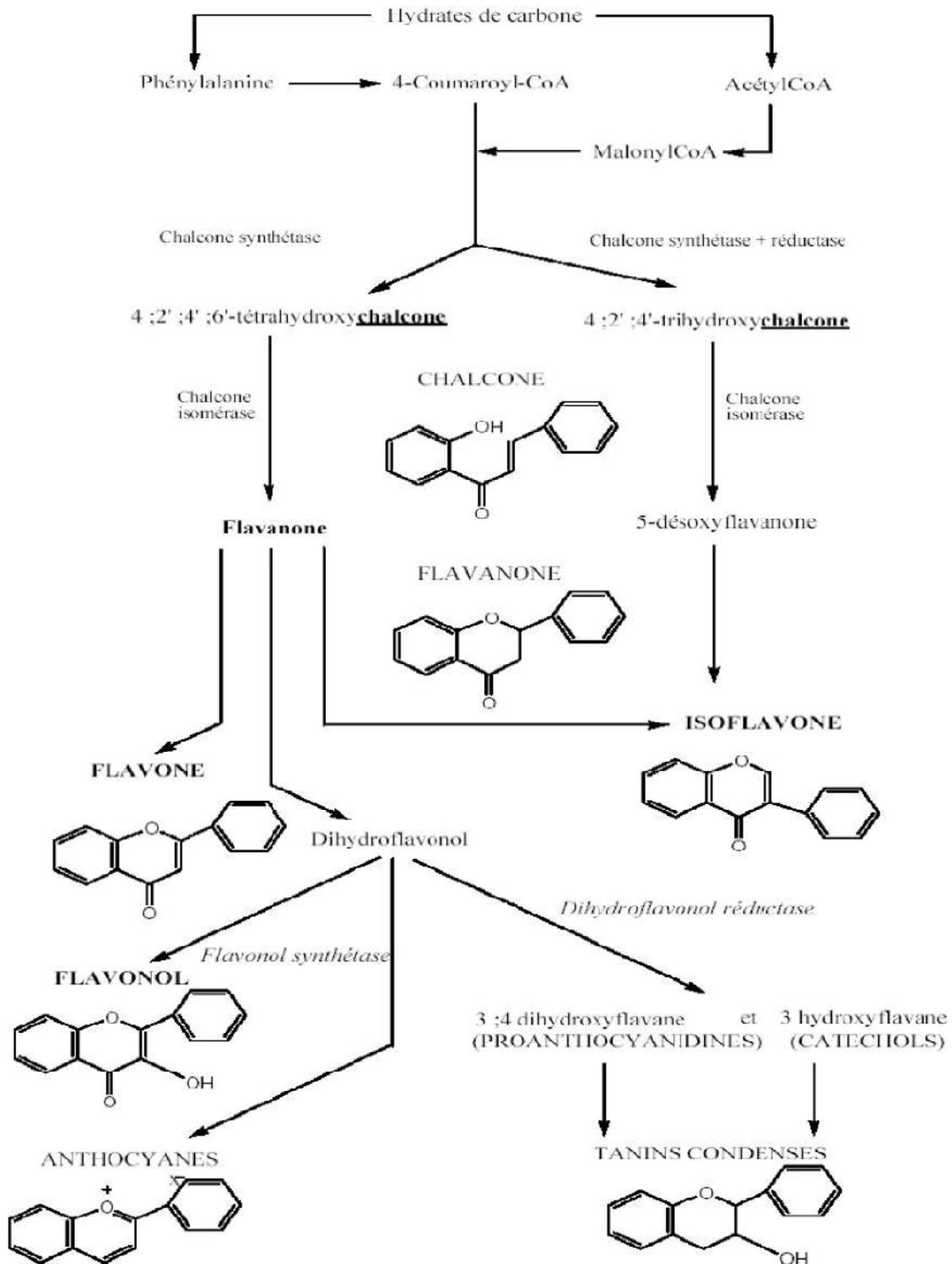


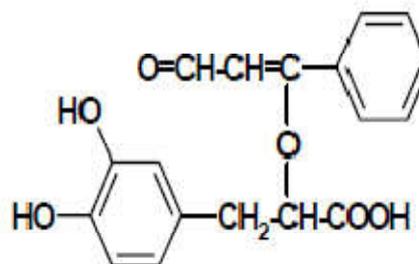
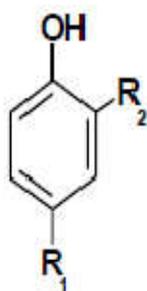
Figure 02 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes (Madjour, 2014).

II.5- Composition phénolique :

II.5.1- Les acides phénoliques :

Les phénols ou les acides phénoliques sont des petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être estérifiées, étherifiées et liées à des sucres sous forme d'hétérosides, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires, leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Wichtl et Anton, 2003).

Aussi les acides phénoliques présents dans le romarin et à des teneurs importantes sont l'acide rosmarinique, l'acide caféique et l'acide vanillique (Zoubeidi, 2004).



Acide Rosmarinique

	R ₁	R ₂
Acide vanillique :	COOH	OCH ₃
L'acide caféique :	CH=CH-COOH	OCH ₃

Figure 03 : structure des acides phénoliques dans le romarin (Abdoune et al., 2018)

II.5.2- Les Flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C₆ (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C₃ qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (Figure 04).

Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes: flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones. Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances (Madjour, 2014).

- **Structure chimique :**

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone à 15 atomes de carbone ($C_6-C_3-C_6$), constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C, portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. On signale que le noyau flavone est lui même un dérivé du noyau flavane de base (**Madjour, 2014**).

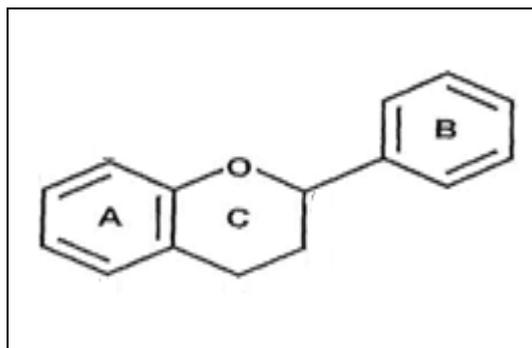


Figure 04: Structure de base des flavonoïdes (**Adjimi ; 2014**).

II.5 .3.Terpènes :

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence de térébenthine produite à partir de résine. Les terpènes se rencontrent également chez les Métazoaires (phéromones et hormones sesquiterpéniques des Hexapodes, di terpènes d'organismes aquatiques. (**Belkhiri, 2015**).

II.6-Composition chimique de l'huile essentielle du romarin :

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient de l' α -pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène. En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin environ 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol; des lactones diterpéniques en particulier le picrosalvine, les dérivés de l'acide carnosolique, le rosmanol, le rosmadial, et des acides phénoliques ; des acides gras hydroxylés notamment des dérivés de l'acide décanoïque ; et enfin des acides gras organiques tels que l'acide citrique, les acides glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage (**Belakdhar, 1997**)



Chapitre III :
Domaines d'application
Du Romarin

III.1-Domaines d'application du romarin:**III.1.1-Usage médicinale (phytothérapie) :**

Le romarin est employé dans le traitement de plusieurs maladies, son usage peut être interne ou externe :

➤ **voie interne :**

Il est utilisé sous forme d'infusion, extrait fluide ou autre préparation galénique contre les douleurs d'estomac. Il est associé fréquemment à d'autres cholagogues et cholérétiques pour favoriser les fonctions d'élimination rénale et digestive (**Bruneton, 1993**).

Aussi, contre la diarrhée, la fermentation intestinale, les spasmes et les troubles hépatiques. Il stimule les grandes fonctions nutritives et hormonales, améliore la circulation sanguine et lutte contre l'asthme, dyspepsies atonique ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire (**Poletti, 1988**).

➤ **voie externe :**

Pour les traitements externes tels que (les entorses, les foulures, les contusions, et les torticolis), on emploie les sommités infusées dans de l'alcool. L'extrait alcoolique lui-même agit sur les ulcères, et les dermatoses parasitaires. L'huile essentielle du Romarin soulage les troubles rhumatismaux. Ainsi, elle soigne les blessures, soulage les maux de tête, et traite l'inflammation des voies respiratoires (**Mecheri et al., 2017**).

III.1.2-En industrie agro-alimentaire :

Les extraits végétaux de romarin présentent un pouvoir antioxydant et peuvent être appliqués à la conservation des aliments telle que (les boissons alcoolisées, les aliments cuits, viande et produits de viande, sauces, les aliments industriels) et des huiles lipidiques. Ces propriétés sont dues aux acides polyphénolique (rosmarinique, caféique) (**Albert et al., 1996**).

Les huiles essentielles jouent un rôle capital dans l'aromatisation des aliments (**Porter et al., 2001**).

III.1.3-En industrie cosmétique et parfumerie :

Rosmarinus officinalis est couramment utilisé comme additif parfumé dans les savons et autres produits cosmétiques pour traiter la cellulite, les rides et normaliser la sécrétion excessive d'huile de la peau (**Hamedo et al., 2009**).

III.2. Les effets thérapeutiques des huiles essentielles du romarin :**✓ Activité antibactérienne :**

Les effets des extraits aqueux et méthanoliques du romarin, sur la croissance du *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyltransférase ont été étudiés par les résultats ont suggéré que les extraits du romarin peuvent empêcher la lésion de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* peuvent aussi éliminer les plaques dentaires par suppression de l'activité de la glucosyltransférase (**Adjimi , 2014**)

L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone(CO₂) supercritique du romarin, après enté un large spectre antimicrobien.la croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait d'acide carnosique (**Adjimi, 2014**).

✓ Activité anti-oxydante :

L'activité anti-oxydante du romarin est connue depuis environ 30 années, l'huile essentielle du romarin est largement accepté en tant qu'épices dont l'activité anti-oxydante la plus élevée. (**Ethamena, 2009**).

✓ Activité antifongique :

La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle du Romarin à une concertation de 450 ppm. Selon les résultats indiqués, le potentiel de cette huile essentielle en tant que préservatif naturel contre l'*Aspergillus parasiticus* (**Rasooli et al., 2008**).

En utilisant la technique standard de diffusion sur gélose, ont évalué l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du romarin, les résultats ont montré que de ces huiles ont une activité inhibitrice modérée sur les cinq levures (*Candida albicans*, *Rhodotorula aglitinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowialy politica*) Examinées.(**Ethamena , 2009**).

✓ Activité antivirale :

L'évaluation de l'activité antivirale de l'extrait commercial du romarin a indiqué qu'il ya une inhibition de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) à la concentration très basses. Cependant, le carnosol a montré une activité (anti-HIV) à une concentration modérée qui n'était pas cytotoxique (**Belkhiri , 2015**)

✓ Activité ovicide :

L'huile essentielle du Romarin s'est avérée un agent ovicide contre trois espèces de moustique (*Anophele stephensi*, *Aedessa egypti* et *Culexquinque asciatus*) ;(Belkhiri , 2015)

✓ Antiseptique :

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (Berkani et al.,2013).

✓ Effet anti-cancérogène :

Grace à certains composants (Carnosol, Rosmaridiphénol, Rosmanol et l'acide rosmarinique), le Romarin est considéré comme une thérapie contre le cancer (Belkhiri, 2015).

✓ Effet anti-hépatotoxique :

De nombreuses études ont été réalisées pour étudier l'effet anti hépatotoxique du Romarin, le travail a été concentré pour l'évaluation de l'efficacité de l'extrait méthanolique du Romarin pour normaliser certains paramètres histologiques et biochimiques du foie, après l'ingestion d'un hépatotoxine le tétrachlorure de carbone(CCL4). les résultats ont indiqué que cet extrait a empêché la peroxydation lipidique, (l'information, la nécrose, normalisé les taux de la bilirubine, la glycogène et l'activité du l'alanine aminotransférase) et enfin il augmenté l'activité du glutathion-S-transférase (GST) (Belkhiri, 2015).

✓ Les propriétés anti-inflammatoires :

Les aldéhydes sont doués de propriétés actives contre les états inflammatoires.

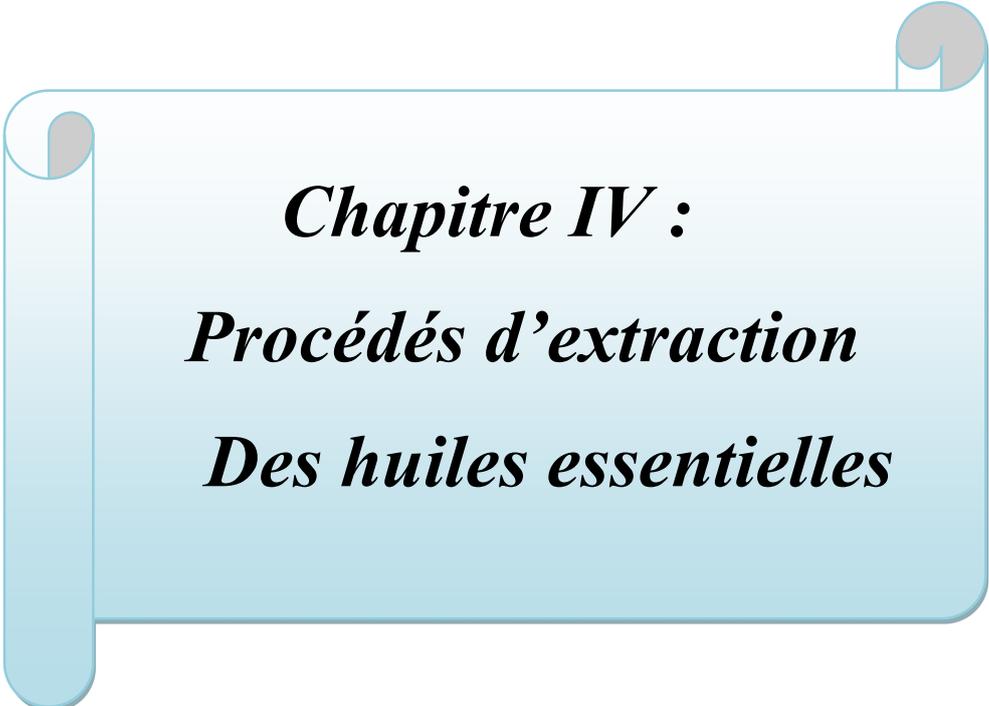
Ainsi, les huiles essentielles sont très utilisées par voir interne ou locale, dans les troubles articulaires inflammatoires. (Berkani et al., 2013).

✓ Effet anti-acétylcholinestérase

Des extraits aqueux et méthanoliques de 11 plantes utilisés dans la médecine traditionnelles chinoise pour l'amélioration de la mémoire ont été examinées pour évaluer leurs activités inhibitrices d'acétylcholinestérase en utilisant la méthode colorimétrique d'Allman. L'extrait méthanolique du Romarin a montré une inhibition modérée (17%) de l'enzyme à une concentration de 0.1%(Berkani et al., 2013).

✓ Effet hypoglycémiant

Les observations après l'administration orale de différentes doses de l'extrait éthanolique du Romarin à 3 groupes de lapins (lapins ayant une glycémie normale, lapins ayant une hyperglycémie provoquée par l'administration orale du glucose, lapins diabétiques d'alloxane) ont clairement montré que cet extrait exerce une activité hypoglycémiante remarquable à une dose de 200 mg /kg (**Berkani et al., 2013**).



Chapitre IV :
Procédés d'extraction
Des huiles essentielles

IV.1 Procédés d'extraction des huiles essentielles:

Différentes méthodes sont mises en oeuvre pour l'extraction des essences végétales.

En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ...), de la nature des composés (par exemple, les huiles essentielles, huiles lourdes...). Le rendement en huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées ; Les principales méthodes d'extraction sont :

IV1.1 Distillation – Evaporation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult). Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotrope. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger (El Haib ,2011).

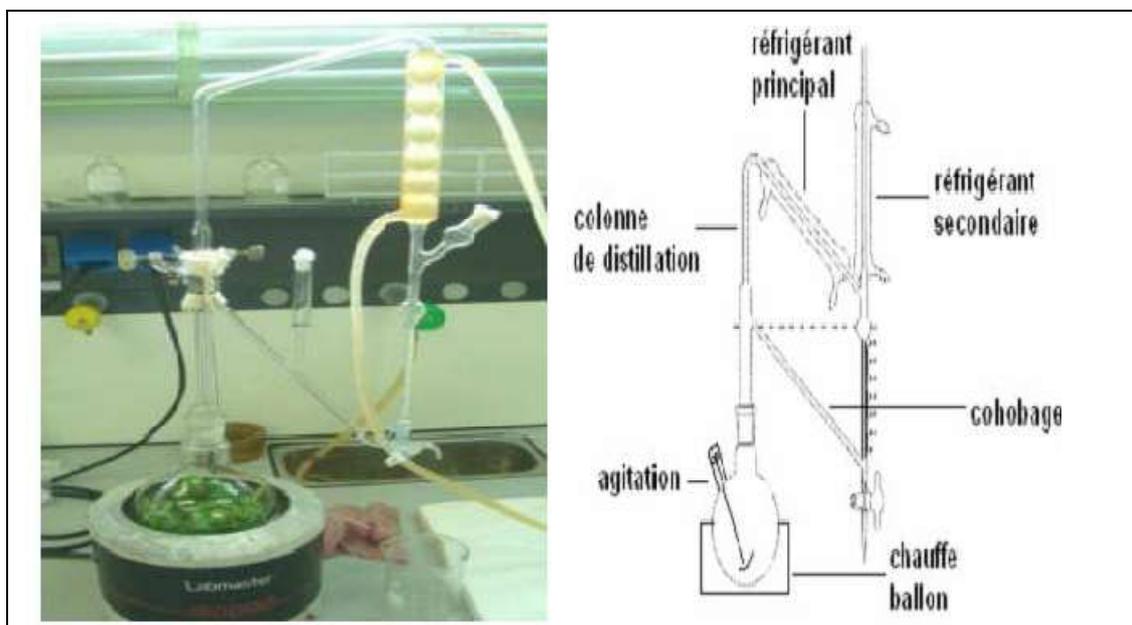


Figure 05 : Montage d'hydrodistillation (Belkhiri, 2015).

Chapitre IV : Procédés d'extraction des huiles essentielles

IV1.1.1 Codistillation avec vapeur d'eau:

C'est probablement sur le plan tonnage, que la codistillation avec vapeur d'eau est la principale technique de production des huiles essentielles. Trois groupes de techniques sont utilisés:

- ✓ La distillation à la vapeur, ou hydrodistillation (Figure 06, A), dans laquelle le végétal est en contact direct avec l'eau bouillante, ce qui évite d'agglutiner les charges végétales comme le fait l'injection de vapeur. Quelques utilisations actuelles : rose, fleurs d'oranger, amande pulvérisée (Gayda, 2013).
- ✓ La distillation à la vapeur saturée : le végétal est supporté dans l'alambic par une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau (Figure 06 B). Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante.
- ✓ La distillation à la vapeur directe, saturée ou surchauffée, souvent à des pressions supérieures à l'atmosphérique, est identique à la précédente, sans eau dans le fond de l'alambic, la vapeur étant introduite au-dessous de la charge végétale (ou en dessus dans le système d'hydrodiffusion). Technique la plus utilisée actuellement, elle évite le contact prolongé du végétal avec l'eau en ébullition et la formation de certains artefacts (Bousbia, 2011).

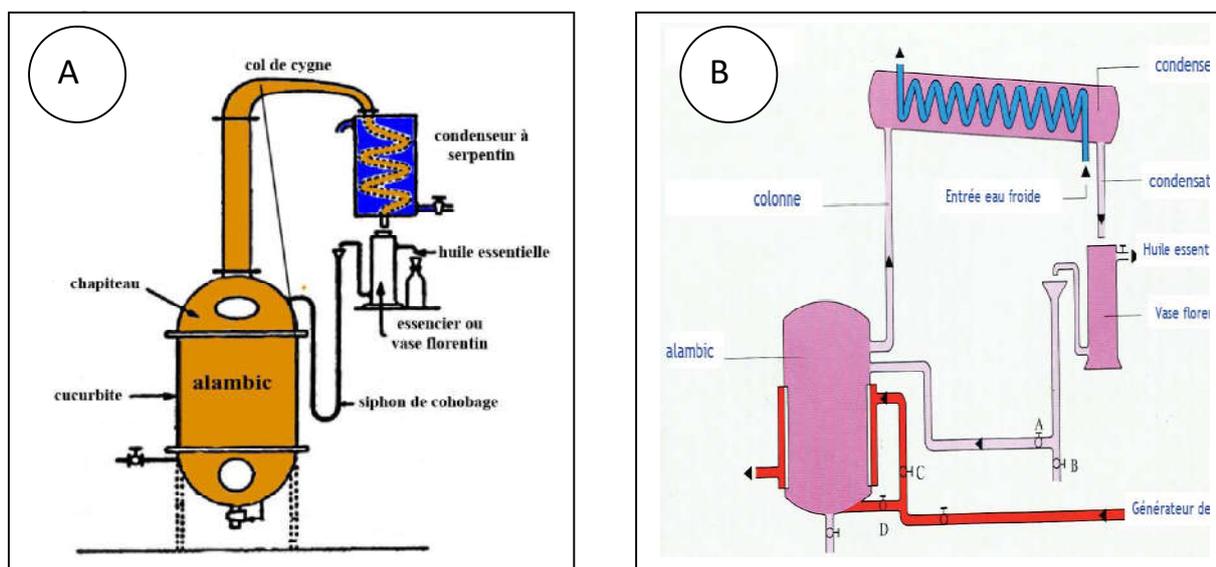


Figure 06: Schéma des appareils d'Hydrodistillation (A), et d'entraînement à la vapeur d'eau (B) (Berkani et al., 2013).

Chapitre IV : Procédés d'extraction des huiles essentielles

D'une façon générale, l'hydrodistillation, de même que l'entraînement à la vapeur, engendrent des réactions d'isomérisation, de saponification ou de polymérisation. Par ailleurs, le temps de distillation affecte la composition de l'huile essentielle dans la mesure où l'hydrodiffusion des composés volatils présents dans les tissus végétaux à travers les parois cellulaires constitue l'étape limitant du processus. Le mélange huile essentielle-eau est recueilli par un col de cygne et refroidi dans un condenseur : la séparation se fait le plus souvent par simple décantation dans un vase florentin (**Bousbia, 2011**).

IV1.1.2 Codistillation avec un fluide autre que l'eau :

L'alcool a été anciennement utilisé pour fabriquer les alcoolates. L'emploi de liquides entraîneurs convenablement choisis (polyols, polyesters et autres composés chimiques à point d'ébullition élevé) s'est généralisé depuis quelques décennies, en codistillant le végétal lui-même, ce qui est rare, mais surtout un de ses extraits primaires (huile essentielle, concrète...) sous pression élevée ou très réduite (distillation moléculaire : vide élevé, court trajets des vapeurs). On obtient ainsi d'excellents produits commerciaux, peu colorés, sans odeur empyreumatique (**Bousbia, 2011**).

IV1.2 Distillation sèche :

En chauffant en milieu clos, certains bois (cade, bouleau,...) à des températures élevées, on fabrique des huiles empyreumatiques (cade, bouleau, arôme fumé...) d'importance assez limitée, mais riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérigènes (**Khadija, 2002**).

IV1.3 Extraction au moyen de solvants :

Certains organes de végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau ou l'hydrodistillation. C'est le cas des fleurs de jasmin, d'œillet, de tubéreuse... Il faut donc, pour ces végétaux, recourir à d'autres méthodes d'extraction des composés odorants volatils telles que l'extraction par les solvants fixes (extraction par les corps gras ou enfleurage) et volatils (extraction par l'hexane)

Ces matières végétales renferment souvent à côté d'une très faible quantité de composé aromatique, un ballast énorme, solide ou liquide, qu'il faut séparer. Pour séparer ces aromatiques du ballast, deux types d'extraction ont été utilisés :

- L'extraction solide/liquide, c'est-à-dire l'opération de transfert ou d'échange de matière

Chapitre IV : Procédés d'extraction des huiles essentielles

entre une phase solide (la matière à extraire), et une phase liquide (le solvant d'extraction). Elle est réalisable :

- soit par simple contact (à étage unique). L'extraction dans ce cas est souvent incomplète même avec un très bon solvant ;

- soit par contacts multiples, à co-courants parallèles ou à contre-courant (extraction méthodique), cette dernière est plus économique **(Bousbia, 2011)**.

- L'extraction liquide/liquide, c'est-à-dire l'opération de transfert ou d'échange de matière entre deux phases liquides, la solution et le solvant. Il s'agit d'une extraction systématique en continu, utilisée pour extraire un constituant particulier ou pour en éliminer d'autres, en utilisant deux solvants non miscibles à pouvoir dissolvant plus spécifique de chaque groupe **(Bousbia, 2011)**.

IV1.4 L'enfleurage à chaud :

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60°C. Les plantes y sont incorporées et détremées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse. Ensuite une opération de filtration est nécessaire pour séparer la graisse des fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid **(Bousbia, 2011)**.

IV1.5 L'enfleurage à froid :

Ce processus d'extraction, n'est plus trop utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité ; **(Bousbia, 2011)**, utilisé pour les fleurs délicates comme le jasmin et les violettes et l'enfleurage à chaude pour les plantes moins fragiles telles l'iris et les jonquilles. Pour cela, la graisse est portée à une température de 60°C à 70°C **(Nourachani, 2010)**

Les senteurs particulièrement délicates peuvent également être capturées par enfleurage dans de la graisse froide. Pour ce faire, le mieux est de suspendre simplement les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures. Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la délayer de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins afin de concentrer davantage la senteur.

Chapitre IV : Procédés d'extraction des huiles essentielles

L'enflourage constitue en quelque sorte la part royale dans le domaine de la confection de parfums, car il permet également de préserver des senteurs particulièrement délicates dans leur haute qualité et leur pureté. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enflourage au niveau de la qualité (Bousbia, 2011).

IV1.6 Hydrodiffusion :

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure 07). Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (El Haib ,2011)

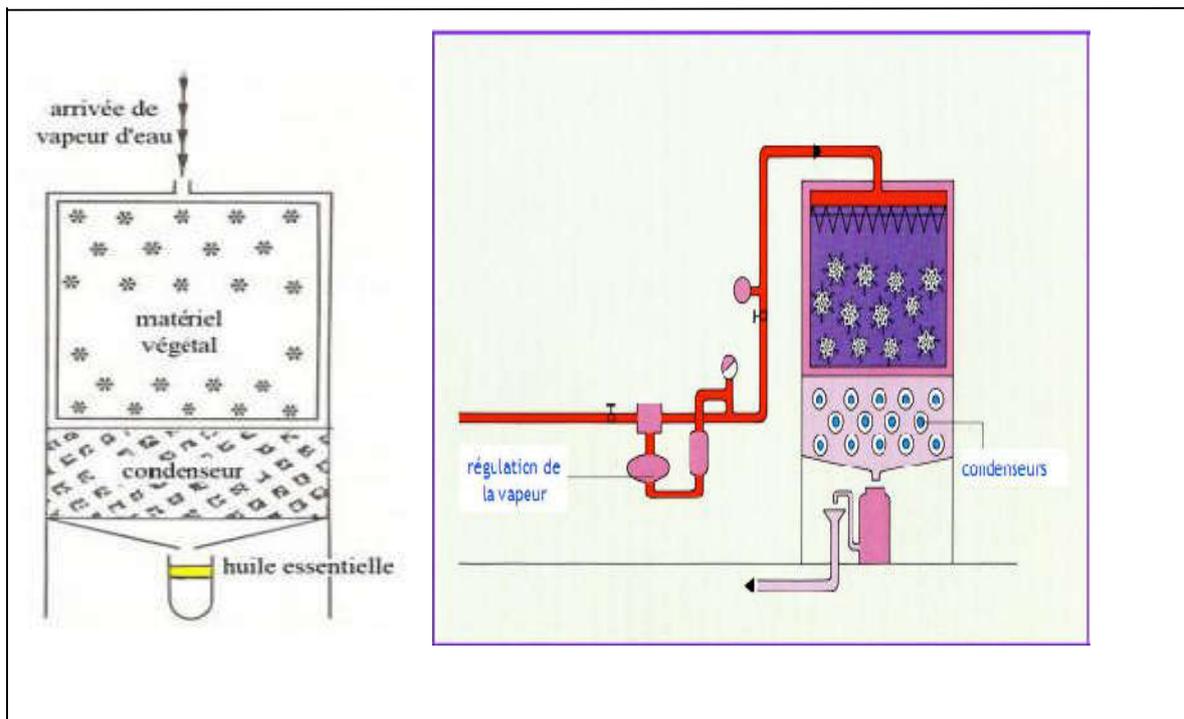


Figure 07 : Schéma de procédé d'hydrodiffusion (Belkhiri, 2015).

IV2 Extraction par des techniques innovantes :

Plusieurs méthodes d'extraction vont être décrites ci-dessous y compris celles par fluide supercritique, par ultrasons et enfin par micro-ondes. Ce sont des techniques qui répondent à bon nombre d'exigences actuelles en termes de durabilité, de répétabilité et de respect de l'environnement, de vitesse et d'automatisation(**Bousbia, 2011**).

IV2.1 Extraction par du CO₂ supercritique :

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Figure08).

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. Cette technique est utilisable pour les essences difficilement distillables (**Belkhiri, 2015**).

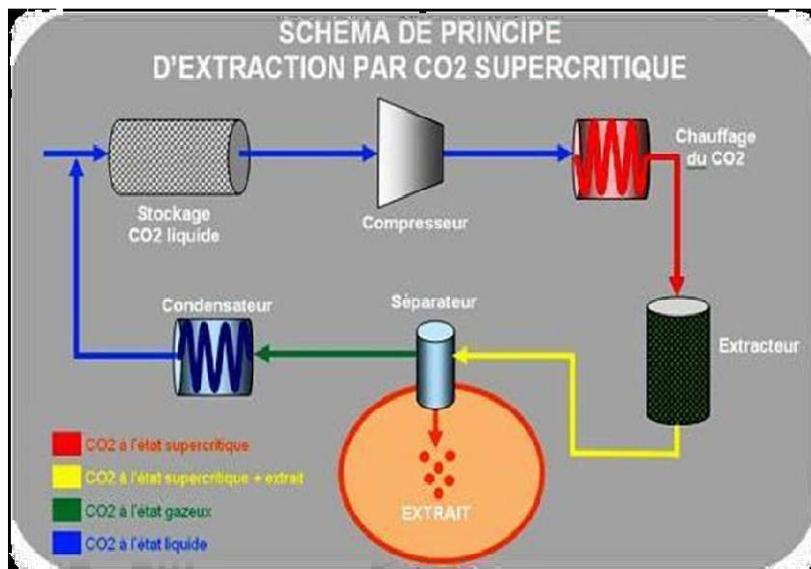


Figure 08 : Schéma de principe d'extraction par CO₂ supercritique (**Belkhiri, 2015**).

Chapitre IV : Procédés d'extraction des huiles essentielles

IV 2.2 L'extraction par solvants volatils :

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique (Zermane , 2010).

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson (Figure 09).

Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances (Belkhirin ,2015).

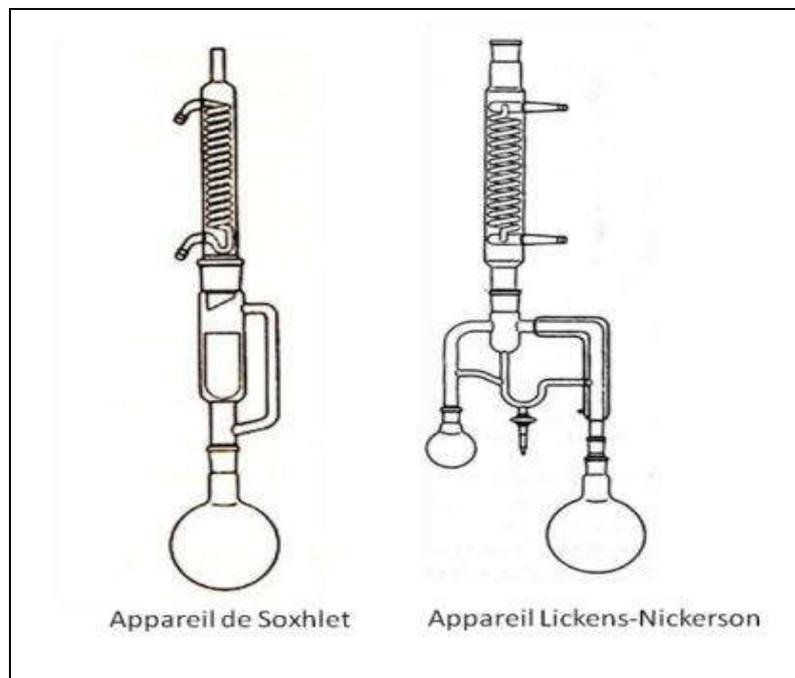


Figure 09: Montage d'extraction par solvant organique (Belkhirin ,2015).

IV2.3 Extraction par ultrasons :

Deux types d'équipements à ultrasons sont couramment utilisés dans le laboratoire. Le premier est le bain de nettoyage à ultrasons qui est couramment utilisé pour la dispersion de solides dans un solvant, pour le dégazage des solutions ou même pour le nettoyage du petit matériel par immersion de la verrerie. Les bains à ultrasons sont moins utilisés pour des extractions ou réactions chimiques, même si ils sont faciles à manipuler et économiquement avantageux. D'une densité de puissance très faible, ils entraînent une faible reproductibilité des réactions. En fait, l'intensité délivrée est faible et est fortement atténué par l'eau contenue dans le bain ainsi que par les murs de la verrerie utilisée pour l'expérience. Le second équipement, une sonde à ultrasons ou un système dit « Horn », est beaucoup plus puissant en raison d'une intensité ultrasonore délivrée sur une petite surface (point de la sonde) par rapport au bain à ultrasons. Une autre changement provient du fait que la sonde est directement immergée dans le réacteur ce qui provoque moins d'atténuation du signal. Ce système de sonde est largement utilisé pour la sonication de petits volumes d'échantillons, mais une attention particulière doit être portée à ces derniers en raison de la hausse rapide de la température au sein du milieu. Un système de double enveloppe réfrigérée est ainsi nécessaire dans ce système (Adhim,2015)

IV2.4 Extraction par micro-ondes :

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (Mengel et al., 1993). Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et se libère ainsi en huile.(Mecheri et al., 2017)

Le protocole expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes s'articule autour de trois points importants :

- La qualité de matière végétale traité ;
- La puissance micro-ondes appliquée ;
- La durée totale de l'extraction (Fekih, 2015).

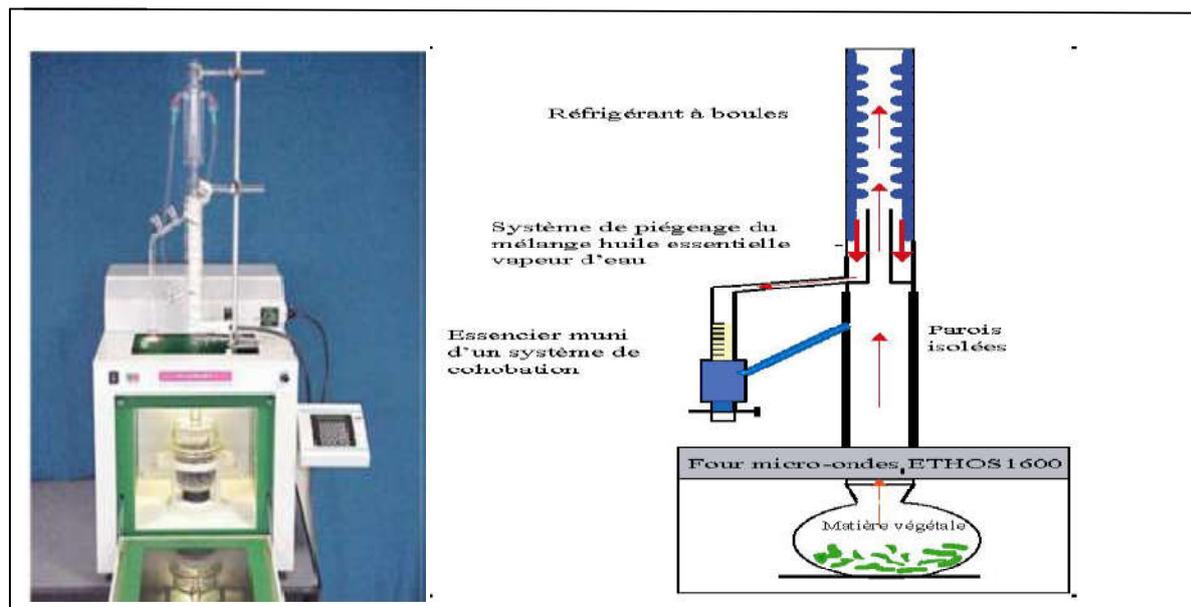


Figure 10: Montage d'extraction assistée par micro-onde (Belkhiri, 2015)

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'obtenir un bon rendement d'extrait (El Haib, 2011)



Partie pratique



CHAPITRE V :
Matériel et méthodes

V. Matériel et méthodes :

Le but de ce travail :

Etude l'effet des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* sur la croissance des microorganismes.

V.1 Matériel :**V.1.1 Matériel végétal :**

Le matériel végétal est constitué de Romarin (*Rosmarinus officinalis*), la récolte a été effectuée durant deux mois Février – Mars 2020, Dans la wilaya de Ain defla « Des régions de Djelida et Khemis miliana ».

Au niveau du laboratoire, on prend les feuilles, les étaler sur du papier et les laisser les sécher dans un endroit ombragé, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante jusqu'au séchage complet, puis on les conserve dans des sacs de papier.

Après un certain temps, on les sèche à l'air et à l'abri de la lumière pendant 10 jour.

Parties utilisées : Feuilles et sommités fleuries.



Figure 11 : Feuilles de *Rosmarinus officinalis* séchées.(Original)

V.1.2 Matériel au laboratoire

- ✓ bec bunsen
- ✓ les tube à essai et les boîte de pétrie
- ✓ les flacons
- ✓ Papier whatman(Ø=6mm)
- ✓ pipette pasteur

✓ **Les appareils :**

Plusieurs appareils utilisés pour étudier l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis*. le tableau suivant site ces appareils :

Tableau 02 : les appareils de laboratoire utilisés :

Matériel	Utilisation
Appareil d'hydrodistillation de type Clevenger	Extraction des HE
Agitateur plaque chauffante	Préparation du milieu de culture
Réfrigérateur	Conservation des échantillons
Autoclave	Stériliser les matériels et les milieux de culture

V.1.3 Matériel Biologique :

Le teste d'activité antibactérienne effectuée au laboratoire d'analyse médicale

« Dr : Zibouche à Ain defla », Il s'agit de :

Staphylococcus aureus (Gram+); *Escherichia coli*(Gram-) ;*Pseudomonas aeruginosa*(Gram-).

V2 Méthodes :**V2.1 Méthode d'extraction de l'huile essentielle:**

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de l'université Djilali Bounaama de khemis miliana de la faculté SNV « laboratoire de chimie 02 et laboratoire de microbiologie », durant la période de 25 Février 2020 au 25 Mai 2020.

➤ **Plan d'extraction :**

Le protocole général de notre travail est comme suite :

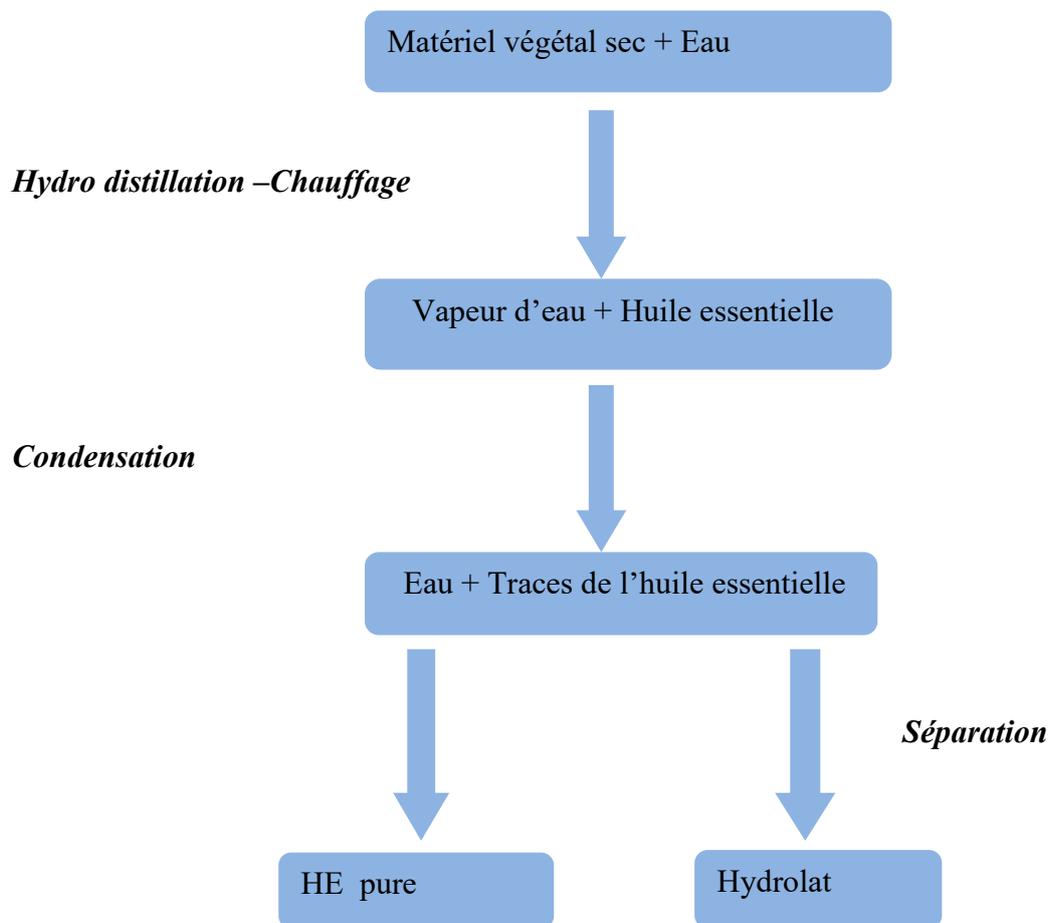


Figure 12: Les étapes d'extraction d'huile essentielle(Adjimi , 2014).

➤ **Principe de l'extraction des huiles essentielles:**

L'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* a été extraite au niveau du laboratoire de l'université Djilali Bounaama à Khemis Miliana par le procédé de hydrodistillation. Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide (végétal) dans l'eau portée à ébullition, la vapeur saturée d'huiles essentielles traverse un serpentin ou elle se condense pour donner le distillat qui est composé de l'eau florale et de l'huile essentielle.



Figure 13 :hydrodistillateur pour l'extraction de l'huile essentielle(**Original**).

➤ **Mode opératoire**

Dans un ballon d'une capacité de 1 litre, on introduit 50 g de matière végétale découpée. Puis, on ajoute un volume d'eau qui correspond à 500ml de la capacité du ballon. Ensuite, on adapte le ballon à l'appareil de condensation et on alimente le réfrigérant en eau. Ainsi, le ballon et son contenu sont mis sur un chauffe ballon. Les huiles essentielles entraînées par les vapeurs d'eau générées dans le ballon sont dirigées vers le col de cygne (le coude) qui relie le ballon au réfrigérant. Enfin l'huile essentielle est récupérée dans des tubes eppendorf opaque recouvert d'un papier d'aluminium pour protéger de la lumière et stockée à 4C°. L'extraction des huiles essentielles dure plus de 2 heures (**Mecheri et al., 2017**).

➤ **Conservation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines conditions, jusque cinq ans.

Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons. Il est préférable de les conserver dans un flacon en aluminium ou en verre teinté (brun, vert, ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusque vingt degrés. (**Raynaud ,2006**).

➤ **Détermination du rendement d'extraction :**

Le rendement des huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'essence obtenue et la masse de la matière végétale sèche utilisée.

$$\text{RHE (\%)} = (M' / M) \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en %

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

V.3 Méthode de recherche de l'activité antimicrobienne :

V.3.1 Méthode de diffusion sur disque (l'aromatogramme) :

La méthode de diffusion a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne. Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures de chaque souche bactérienne est préparée avec l'eau physiologique (NaCl). Des boîtes de Pétri contenant la gélose de Mueller Hinton sont inoculées. A la surface de chaque boîte on dépose six disques de papier filtre (papier de Whatman) stériles de 6 mm de diamètre imbibés par 10 µl de différentes concentrations d'huile essentielle supplémentée de DMSO (HE, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 et DMSO). L'ensemble est incubé pendant 24 heures à 37°C. Cette méthode est dite l'**aromatogramme**.

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole avec des disques standard de 10µg. Cette méthode est dite l'**antibiogramme**.

Après 24 heures d'incubation, une zone ou un halo clair est présent autour du disque si l'huile essentielle inhibe le développement microbien.

Dans la technique de diffusion il y a une compétition entre la croissance de la bactérie et la diffusion du produit à tester (**Belkhiri, 2015**).

V.3.2. Isolement des souches bactériennes :

On a fait un prélèvement des souches bactériennes qui sont testées par anse et ensemencées selon la méthode de stries sur une boîte de Pétri coulée par gélose nutritive puis incubée à 37°C pendant 24 heures, pour l'obtention des souches pures et jeunes.

V.3.3 Préparation du milieu de culture :

Le gélose Mueller –Hinton est préparée en dissolvant 38g de poudre de gélose dans 1L d'eau distillé dans un ballon placé sur un agitateur plaque chauffante.

Le gélose dissolue est versée dans des flacons puis stérilisées dans l'autoclave à 120°C pendant 20mn, et en fin conservée dans le réfrigérateur à 4°C avant utilisation milieu Mueller –Hinton .est fondu dans un bain marie à 95°C.

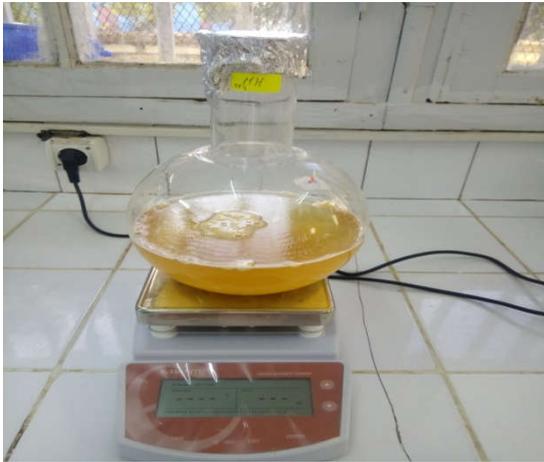


Figure 14:préparation le milieu de culture « Mueller-Hinton »(Original).

➤ **Mode opératoire :**

- ✓ Couler la gélose de Mueller-Hinton dans les boites de pétrie jusqu'à 2mm d'épaisseur.
- ✓ Préparation de l'inoculum : A partir des boites contenant les germes pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*).

A partir des pré-cultures congelées, on racle 3 colonies à l'aide d'une pipette pasteur , puis on la décharge dans un tube qui contient l'eau physiologique stérile. On dépose 3 à 5 gouttes de suspension bactérienne, préparer sur la gélose coulée dans un boite de pétrie, on obtient ainsi, un étalement uniforme en nappe.

• **Préparation des dilutions de l'HE :**

On prépare 4 tubes en verre stériles(1/2,1/4,1/8,1/16) ;le premier contient 500µl de DMSO et 500 µl de diluant .On ajoute dans le deuxième tube(1/4) 500 µl du premier tube(1/2) et 500 µl DMSO agiter bien , aussi on ajoute 500µl du deuxième tube(1/4) et 500 µl DMSO agiter bien. On répète le procédé jusqu'on terminé, Comme la Figure (15) :

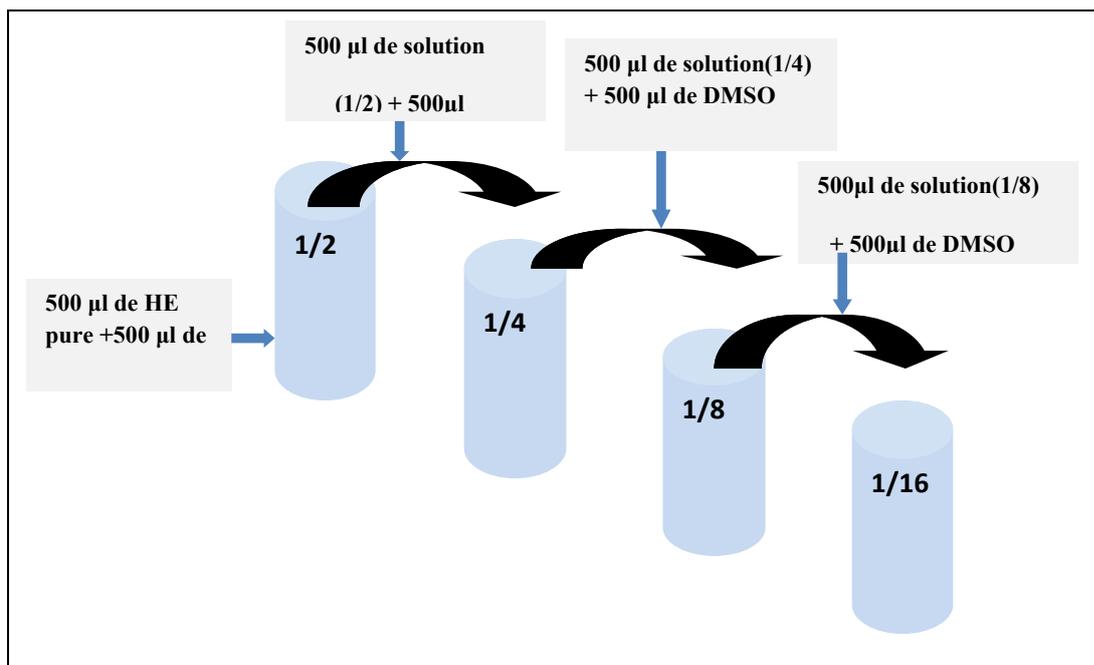


Figure 15: Préparation des dilutions (Belkhiri, 2015).

- **Préparation des disques :**

On a coupé le papier de whatman en disque de 6mm, ces disques doivent posséder un contour régulier pour donner une zone d'inhibition que l'on peut mesurer facilement. Ces disques sont stérilisés dans un autoclave pendant 20 minutes à 120°C.

- **Application des disques :**

On utilise une pince stérile pour mettre 06 disques dans la boîte, à l'aide d'une micropipette on imbibe chaque disque par 10 µl d'extrait: les quatre disques contiennent les dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) et le cinquième disque pour l'huile pure, et le sixième pour DMSO.

C'est pour les trois souches ; puis incubés à 37°C pendant 24 heures.



Chapitre VI :
Résultats et discussion

VII. Résultats et discussion :**VII.1 Extraction des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* :**

Nous avons réalisé l'extraction des huiles essentielles de romarin à partir d'une matière végétal (*Rosmarinus officinalis*) de deux régions différentes « Khemis miliana et Djelida ».

La méthode utilisée est l'hydrodistillation qui permet d'évaporer les huiles essentielles avec l'eau distillée.

VII.2 détermination du rendement :

Les résultats du rendement de l'extraction de l'huile essentielle du romarin , représentés dans les tableaux suivant :

Tableau 03 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles de romarin de la région de Khemis miliana.

Les extractions	Quantité du romarin (g)	Quantité d'huile (mg)	Le rendement(%)
01	50	138	0,276
02	50	158	0,316
03	50	153	0,306
04	50	163	0,326
05	50	122	0,244
06	50	206	0,412

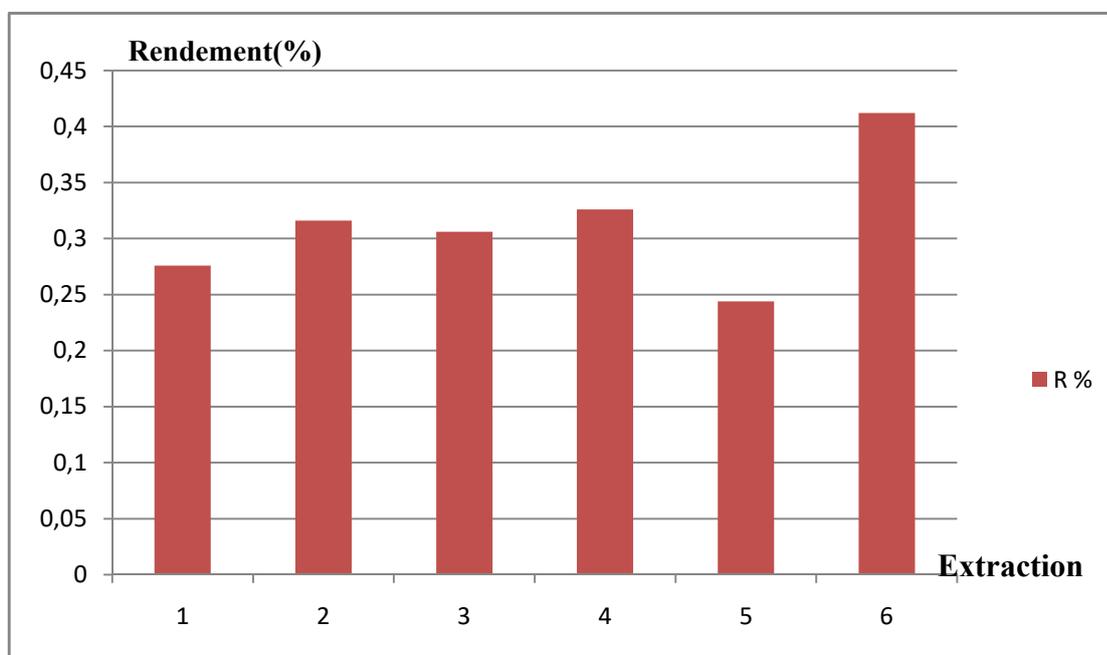


Figure 16: Histogramme des rendements d'extraction de l'huile essentielle du romarin De Khemis miliana.

Tableau 04 : Rendement d'extraction de l'huile essentielle des feuilles de romarin de la région de Djelida.

Les extractions	Quantité du romarin(g)	Quantité d'huile (mg)	Le rendement(%)
01	50	275	0,55
02	50	158	0,316
03	50	138	0,272

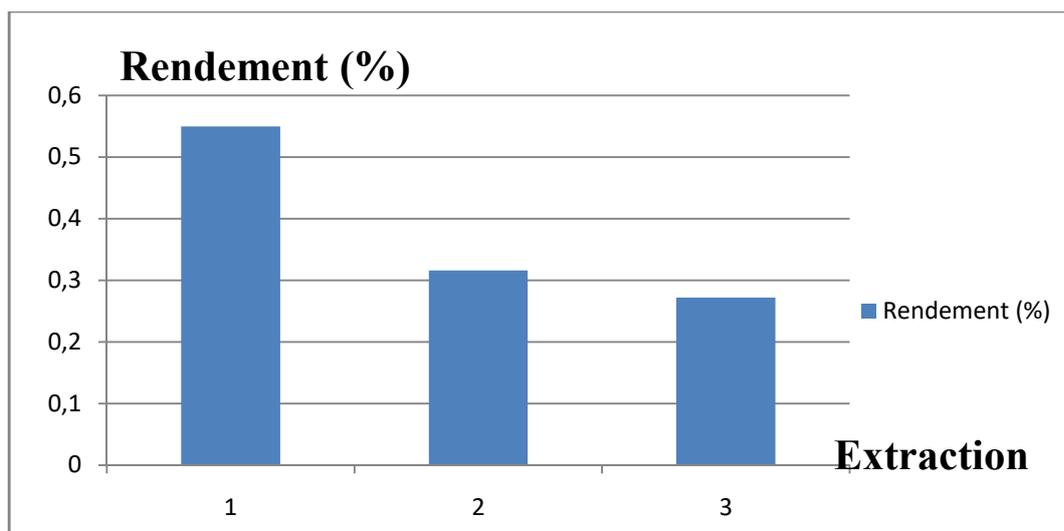


Figure 17: Histogramme des rendements d'extraction de l'huile essentielle du romarin de Djelida.

Tableau 05 : Comparaison entre le rendement de région de Khemis miliana et Djelida.

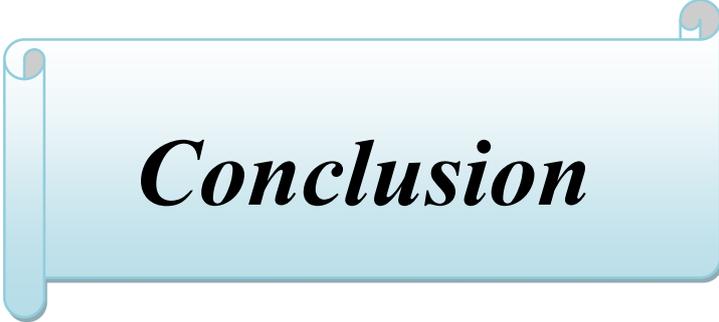
La région	la Quantité de l'huile (ml)	Le nombre d'extraction	Le rendement (%)
Khemis meliana	1	6 fois	0,24-0,41
Djelida	0,9	3 fois	0,27-0,55

Le rendement est le temps nécessaire à la récupération de l'huile essentielle contenue dans la matière végétal.

Nous avons obtenir le rendement de l'huile essentielle de Djelida superieur à Khemis miliana.

Ce rendement est varié entre « 0,24- 0,41 » dans la région de Khemis meliana et « 0,27- 0,55 » de Djelida, cette variation peut être due aux différentes facteurs , parmi eux :

- ✓ la nature du sol
- ✓ la période de la récolte (relation avec le climat) ;
- ✓ la durée de séchage des feuilles, sachant que la durée de la distillation qui influe sur le rendement mais également sur la composition des huiles essentielles (**Luicita et al., 2006**)



Conclusion

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Un grand nombre de plantes aromatiques représente une source de composés chimiques doués d'activité antimicrobienne.

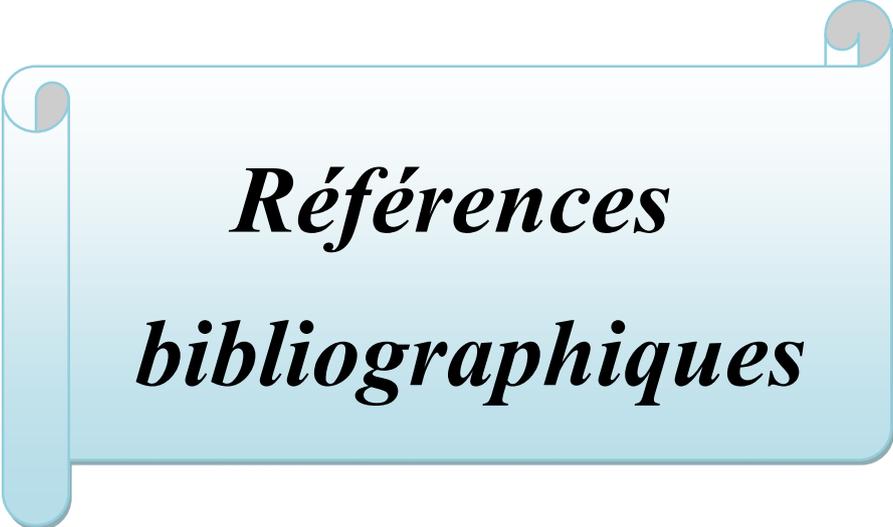
Notre travail porte sur une espèce de la famille des lamiacées: le *Rosmarinus officinalis*. Largement répandue en Algérie, le genre *Rosmarinus* a fait l'objet d'un grand nombre d'études.

Les huiles essentielles, sont obtenues par hydro distillation de matériel végétal, trouvant des emplois dans divers secteurs (parfumerie, aromathérapie, cosmétique, alimentaire, industriel et énergétique...) et pouvant constituer le point important dans le développement économique durable.

Le rendement obtenu à partir des feuilles est conforme normes recommandés internationalement.

La valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* estimé par : 0,41% la plus grande valeur dans la région de Khemis miliana et 0,55% dans la région de Djelida cette variation peut être due aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi eux on cite la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage, et le mode d'extraction.

Nous souhaitons que ces travaux continueront dans ce sens, dont l'objectif est de récupérer les molécules thérapeutiques qui rentrent dans la fabrication de certains médicaments.



***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

A

Abdoune S , Slimani N.,(2018) ; « Synthèse et caractérisation du Cobalt par l'extrait de la plante romarin et son application comme capteur électrochimique pour la détection des sulfites » mémoire de master ; Université Abderrahmane Mira Bejaia.

Adhim A,(2015) ; « Contrôle de la qualité d'une huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* .L » ; mémoire de master ; Université Djillali Bounaâma - Khemis miliana.

Adjimi N,(2014) ;Mémoire master Académique ; Université – Ziane Achour – Djelfa; Etude physico-chimique de L'huile extraite du *Rosmarinus officinalis*.L .

Albert.Y.leung, Steven Foste.,(1996); Encyclopedia of common Naturel Ingredients used In Foods ,Drugs, and cosmetics, 2ème édition , Awreley-interscience publication, P445.

Alma-Ata, du 6 au 12 septembre, (1978) ; Déclaration d'Alma-Ata a été établie à l'issue de la Conférence internationale sur les soins de santé primaires.

B

Bakirel, T., Bakirel, U., UstunerKeles, O., GunesUlgen, S., Yardibi, H., (2008) ;In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabeticrabbits. J Ethnopharmacol. 116: 64-73.

Belakhdar J,(1997);La pharmacopée marocaine traditionnelle. Idis PRESS(Ed). Paris, p. 764

Belkhiri F.Z, (2015) ; «Etude de l'activités antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L » mémoire de master ; Université Mohamed Khider – Biskra.

Beloued abdelkader ,(2001);Plante médicinale d'alger .,Office des publication universitaire. 203p.

Berkani I., Hamdi H., Razkallah N.,(2013) ; « Détermination de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Rosmarinusofficinalis* » mémoire de master ; Université de 08 Mai 1945 Guelma.

Boudjemaa N.,Benguega H.,(2010);L'effet Antibactérien de *Nigella sativa* .Mémoire d'ingénieur.Université Kasdimerbeh-Ouargla. Algerie.60p.

Bousbia N.,(2011) ; « Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires » ; thèse de Doctorat :INA EL Harrach-Alger .

Références bibliographiques

Bruneton J., (1993); pharmacognosie phytochimie ; plantes médicinales ; édit : la voisier TEC et DOC Paris 1^{ème} édition.

Bruneton J.,(1999);Pharmacognosie Phytochimie, Plantes Médicinales. 3^{ème} édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

Bratels A, (1997) ; Guide des plantes du bassin méditerranées Ed Eugen. Ulmer. 324p.

E

Eckert C. A., Knutson B. L., (1993); Molecular charisma in supercritical fluids. Fluid PhaseEquilibria, 83-93-100.

El Haib A,(2011); « valorisation de terpènes naturels issus de plantes Marocaines par transformation catalytiques » ; thèse de doctorat ; Université de toulouse .

Ethamena S,(2009) ;« Etude quantitative des Flavonoïdes des Graines de cuminum cyminum et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique » Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme magister , Université de El hadj lakhdar – Batna .

F

Fekih N,(2015) ;« Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus Poussant* en Algérie » ; thèse de doctorat ;Université AbouBekr Belkaid ; Tlemcen.

Florence M ,(2012) ; « utilisations thérapeutiques des huiles essentielles: étude de cas en maison de retraite » ; thèse de doctorat ; Université de l'orraine.

G

Gayda A , (2013);« Etude de principales huiles essentielles utilisées en rhumatologie » ; thèse de doctorat ; Université Toulouse III paul Sabatier .

Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz,F.J., (2007); « Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinusofficinalis*L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol* ».111: 476-482.

Gilly G,(2007) ; « Les plantes aromatiques et huile essentielle à Grasse » ; Edition corlet numérique 144110 condé –sur –noireau ;pp186-187.

H

Hamedo, H.A., Abdelmigid, H. M., (2009); Use of antimicrobial and genotoxicity potentiality for evaluation of essential oils as food preservatives. *The Open Biotechnology Journal*, 3(1).

Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M., (2006) Ethnobotany and ethnopharmacology-Inter disciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* 107:157-160.

K

Khadija.R ; (2002) ; « Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli* , *Bacillus subtilis* et sur *mycobactérium fortuitum* » ; Thèse de Doctorat ; Université Sidi Mohamed Ben Abdellah .

L

Luicita .LagomezRivera,(2006) ; Natural essentielle oils : extraction processes and applications to some major oils , perfumer&flaverist , 9 , 93-103.

Luque de Castro M.D., Valcarcel M., Tena M.T.,(1994) ; in *Analyticalsupercritical Fluid extraction*. Springer laboratory, Berlin, p 321.

M

Madjour.S ,(2014) ; « Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne d'une labiée *romarinus officinalis* » mémoire de fin d'étude en master université Med khider Biskra.

Makhloufi A ,(2013) ; « Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*matricariapubescens* (desf) et *RosmarinusoffcinalisL*) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru » ; thèse de doctorat ; Université d'Aboubaker belkaid.

Mecheri F , Akdif N.,(2017) ; « Contribution à l'étude de l'effet des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et de *Rutagraveolens* sur la croissance des quelques microorganismes pathogènes » , Mémoire de l'obtention du diplôme de master ; d'Université M'hamed Bougara de Boumerdases

Mengel P., Beh D., Bellido G.M .et Monpon B.,(1993) ;VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-onde. *Parfums Cosmétique Aromes*, 114 :66-67.

Mohhamdi Z (2006); Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Tlemcen. Thèse de l'obtention de Magister : Université Abou Bakr Belkaid ,115P.

Références bibliographiques

N

Nourachani I,(2010) ; « caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle des écorces de *cryptocayacrassifolia(Lauraceae)*» ; thèse de l'obtention du diplôme d'étude approfondie (D.E.A) ; Université d'atananarivo .

Nassu R T, Aparecida Guaraldo Goncalves L, Aparecida A P da Salva M, José Beserra F.,(2003); Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. Meat Science.63:43-49.

O

Oakes R. S., Clifford A. A., Rayner C. M.,(2001);The use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry , J. Chem. Soc., 1, 917-941.

P

Porter N. (2001) ; Essential oils and their production. Crop & Food Research.Number39.

Q

Quézel P. et Santa, S. (1963) ; Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales : Éditions du Centre national de la Recherche scientifique.

R

Raynaud J, (2006). Prescription et conseil en aromathérapie Editions Lavoisier.

Rasooli I, Hadi Fakoor M, Davod Y, Gachkar L, Allameh A, Bagher Rezaei M (2008); Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. International Journal of Food Microbiology, Grugliasco, v.122, p.135-139.

S

Stefanovits-Banyai E., Tulok M.H., Hegedus A., Renner C., Szollosi Varga I., (2003); Antioxidant effect of various rosmmary (*Rosmarinus officinalis L*) clones+.acta biologias zegediensis.47:111-113

W

Wichtl M, Anton R., (2003) ; Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2 e éd. EMInter/Tec & Doc éditions, Paris, 382-386.

Wang W, Wu N, Yuan-Gang Zu, Yj Fu (2008) ; .Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis L*.essential oil comared to its main components.Food Chem.108:1019-1022.

Références bibliographiques

Z

Zoubeidi C, (2004) ; Etude des antioxydants dans le Romarins officinales .Labiatea .Thèse de magistère, Université d'Ouargla,p.65.

Zeghade N, (2003) ; « Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris* , *rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne » ; Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale), Université Mentouri Costantine, P8.