

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجيلالي بونعامة خميس مليانة

Université DJILALI BOUNAAMA KHEMIS MILIANA



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Technologie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master en génie des procédés

Domaine : Science et Technologie

Filière : Science et Génie de l'environnement

Spécialité : Génie des procédés de l'environnement

Thème

Extraction et Caractérisation de l'Huile

Essentielle de mentha piperita

Réalisé par :

AZZALA Selma

Devant le jury constitué de :

Mme REZALA. H Présidente

Mr MEKHANEG. B Examineur

Mme HAMAD. T Encadreur

Année universitaire 2020/2021

Dédicaces

A la femme la plus courageuse, sensible, généreuse, à celle qui a su me donner amour et joie de vivre, à celle qui a toujours montrée affection et compréhension à mon égard, ma mère que j'aime.

A l'homme de courage et de force, à celui qui a toujours été présent, qui m'a appris les vraies valeurs de la vie, à celui qui m'a soutenu en toutes circonstances, mon père que j'aime.

A ceux qui m'ont aidé et m'ont donné joie et bonheur :

Ma sœur Assia.

Mes Frères Amine, Hamza et Azzeddine.

A mes nièces que j'adore beaucoup Nadine et Loudjaine.

A mes neveux Moussa, Younes et Iyede.

A mes amis les plus fidèles en particulier Wiaam, Aya, Ratiba, Hiziya, Fatima et Hafida.

A toute la promotion génie des procédés de l'environnement.

A ceux que j'ai eu la chance de connaître, dans les meilleurs et pires moments de ma vie.

A tous ceux que j'aime, à tous ceux qui m'aiment, je leur dédie ce modeste travail.

Selma

Remerciements

Je remercie tous d'abord Allah le clément et le miséricordieux qui m'a donné la force et le courage d'avoir accompli ce travail.

*Je voudrai adresser mais vifs remerciements à ma promotrice **Mme HAMAD** pour son assistance et sa clairvoyance qui m'a permis de réaliser ce projet de mémoire auquel je tiens tant.*

*Mes vifs remerciements à tous les membres de jury, la Présidente **Mme REZALA. H** et l'Examineur **Mr MEKHANEG. B** qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail.*

*Mes remerciements à ma collègue **Kenza** qui m'a aidé à réaliser ce travail dans de meilleurs conditions.*

Mes remerciements à tous mes amis qui m'ont aidé et encouragé et à toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce travail, par un conseil, ou même par un sourire.

Merci à vous tous.

ملخص

يعتمد عملنا بشكل أساسي على استخراج وتوصيف الزيت الأساسي للنعناع. تم استخلاص الزيت الأساسي من النعناع عن طريق التقطير بالماء وأعطى محصول الزيت 1.93%. وأظهرت نتائج دراسة الرطوبة أن نبات النعناع غني بالمياه.

تظهر دراسة حركية لاستخلاص الزيت الأساسي من النعناع أن الاستخراج من النعناع الجاف أسرع ويوفر مردوداً أعلى من إنتاج النعناع الطازج. تشير قيم المؤشرات الفيزيائية والكيميائية للزيت الأساسي للنعناع إلى أنه ذو جودة عالية ويتوافق مع معايير AFNOR (2008). يوضح عملنا أن الزيت الأساسي للنعناع له نشاط مضاد للارتجاع وليس له نشاط مضاد للحموضة.

سمح لنا التحليل بواسطة كروماتوغرافيا الغاز إلى جانب قياس الطيف الكتلي بتحديد المكونات الكيميائية لزيتنا الأساسي. أظهرت القوة المضادة للأكسدة للزيت الأساسي للنعناع وجود نشاط جيد مضاد للأكسدة. أظهر اختبار قدرة الزيت الأساسي المضادة للميكروبات أن الزيت الأساسي الخاص بنا يُظهر نشاطاً متغيراً ضد ثلاث سلالات بكتيرية تم اختبارها (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureu*).

الكلمات المفتاحية

الزيت الأساسي، النعناع، المكونات الكيميائية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

RESUME :

Notre travail est basé principalement sur l'extraction et la caractérisation de l'HE de la *Mentha Piperita* (Menthe Poivrée).

L'extraction de l'huile essentielle de la *M. Piperita* a été faite par hydrodistillation et a donné un rendement en huile de 1.93%. Les résultats de l'étude de taux d'humidité montrent que la *M. Piperita* est riche en eau.

L'étude de la cinétique d'extraction de l'HE de la *M. Piperita* montre que l'extraction à partir de la *M. Piperita* sèche est plus rapide et offre un rendement plus important que celle de la *M. Piperita* fraîche. Les valeurs des indices physico-chimiques de l'HE de la *M. Piperita* indiquent que notre HE est de bonne qualité et conforme aux normes AFNOR (2008). Notre travail montre que l'HE de *M. Piperita* a une activité anti reflux et n'a pas d'activité anti acide.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse nous a permis de déterminer les composants chimiques de notre huile essentielle. L'étude du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de la *M. Piperita* par la méthode du DPPH, a montré l'existence d'une bonne activité antioxydante. Le test de l'aromatogramme a montré que notre huile essentielle présente une activité variable vis-à-vis de trois souches bactériennes testées (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureu*).

Mots clés : Huile essentielle, menthe poivrée, composition chimique, activité antibactérienne, activité antioxydante.

Abstract

Our work is mainly based on the extraction and characterization of essential oil from *Mentha Piperita* (Peppermint).

The extraction of the essential oil of the *M. Piperita* was made by hydrodistillation and gave an oil yield of 1.93%. The results of the humidity study show that the *M. Piperita* is rich in water.

The study of the extraction Kinetics of the essential oil of the *M. Piperita* shows that the extraction from the dry *M. Piperita* is faster and offers a higher yield than that of the fresh *M. Piperita*. The values of the physico-chemical indices of the essential oil of *M. Piperita* indicate that our essential oil is of good quality and complies with AFNOR (2008). Our work shows that the essential oil of the *M. Piperita* has anti-reflux activity and has no anti-acid activity.

Analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry allowed us to determine the chemical components of our essential oil. The study of the antioxidant power of the essential oil of *M. Piperita* by the DPPH method, showed the existence of a good antioxidant activity. The chromatogram test showed that our essential oil exhibits variable activity against three bacterial strains tested (*Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus Aureu*).

Keywords: Essential oil, peppermint, chemical composition, antibacterial activity, antioxidant activity.

Sommaire

Dédicaces	
Remerciement	
Résumé	
Liste des Figures	
Liste des Tableaux	
Liste des Abréviations	
Introduction	01
Chapitre I : les huiles essentielles	
I.1. Plante aromatique	04
I.1.1. Définition	04
I.1.2. Les plantes aromatiques en Algérie	05
I.2. Les huiles essentielles	06
I.2.1. Définition	06
I.2.2. Histoire et origine	07
I.2.3. Marché des huiles essentielles	08
I.2.4. Domaines d'utilisation des huiles essentielles	08
I.2.5. Localisation des huiles essentielles dans la plante	10
I.2.6. Composition chimique	13
I.2.7. Propriétés physico-chimiques	15
I.2.8. Conservation des huiles essentielles	16
I.2.9. Critères de qualité	16
Chapitre II : la menthe poivrée	
II.1. Les plantes médicinales	19
II.1.1. Domaine d'application des plantes médicinales	19
II.2. Le genre Mentha	20
II.2.1. Étymologie	20

II.2.2. La Mentha Piperita	21
----------------------------	----

Chapitre III : Les procédés d'extraction

III.1. Choix de la méthode d'extraction	26
III.1.1. Principaux paramètres d'extraction	26
III.1.2. Paramètres influençant l'extraction	28
III.2. Techniques conventionnelles d'extraction	30
III.2.1. Distillation – Evaporation	30
III.2.2. Extraction au moyen de solvants	33
III.2.3. Méthodes d'extraction à froid	34
III.2.4. Méthode d'hydrodiffusion	38
III.3. Extraction par des techniques innovantes	39
III.3.1. Extraction par des solvants supercritiques	39
III.3.2. Extraction par Détente éclair (flash détente)	42
III.3.3. Détente instantée contrôlée (DIC)	44
III.3.4. Extraction par ultrasons	46
III.3.5. Extraction assistée par micro-ondes	47
III.4. Situation économique des huiles essentielles	53

Chapitre IV : Matériel et méthode

IV.1. Matériels	58
IV.1.1. Préparation du matériel végétal	58
IV.1.2. Séchage de la plante	58
IV.2. Extraction par l'hydrodistillation	59
IV.2.1. Montage de l'hydrodistillation	59
IV.2.2. Protocole d'extraction	60
IV.2.3. Conservation de l'huile essentielle	61
IV.3. Détermination du rendement d'extraction	61
IV.4. Détermination du taux d'humidité	61
IV.5. Etude de la cinétique d'extraction	62
IV.6. Caractérisation de l'huile essentielle	62
IV.6.1. Analyse physique	62

IV.6.2. Analyse chimique	64
IV.6.3. Analyse biologique	71

Chapitre V : Résultats et discussions

V.1. Détermination du taux d'humidité	79
V.2. Détermination du rendement d'extraction	80
V.3. Etude de la cinétique d'extraction de l'HE de menthe poivrée	81
V.4. Analyse physique	83
V.4.1. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle	83
V.4.2. Les propriétés physico-chimiques	84
V.5. Analyse chimique	85
V.5.1. Analyse par la Chromatographie en phase gazeuse -Spectrométrie de masse (GC/MS)	85
V.5.2. Activité anti reflux	91
V.5.3. Activité antiacide	91
V.6. Analyse biologique	91
V.6.1. Activité antioxydante	91
V.6.2. Activité antibactérienne	94
Conclusion	97
Références Bibliographies	99
Annexes	104

Liste des Figures

Fig.I.1 : quelques plantes aromatiques.	04
Fig.I.2 : des médicaments à base d'HE.	09
Fig.I.3 : utilisation d'HE dans la cosmétique.	10
Fig.I.4 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles.	12
Fig.I.5 : Structure de la vanilline.	14
Fig. I.6 : Schémas des principales formes de squelettes carbonés des mono et sesquiterpènes.	15
Fig. II.1 : La menthe poivrée.	21
Fig. II.2 : Dessin de la plante et des fleurs de la menthe poivrée.	22
Fig.III.1 : Principales opérations industrielles d'extraction.	28
Fig.III.2 : Schéma des appareils d'Hydrodistillation (A), et d'entraînement à la vapeur d'eau (B).	31
Fig.III.3 : Schéma des différents Sfumatrices.	36
Fig.III.4 : Photos à gauche d'une Pelatrice et à droite d'une centrifugeuse séparatrice de l'essence de citrus des eaux résiduelles.	37
Fig.III.5 : Schéma représentatif de l'extraction par pression.	38
Fig.III.6 : Schéma du procédé d'hydrodiffusion.	39
Fig.III.7 : Schéma de principe d'une extraction par CO ₂ supercritique.	40
Fig.III.8 : Schéma de l'extraction par Flash Détente.	43
Fig.III.9 : Schéma d'une unité de Détente Instantanée Contrôlée (DIC) et son cycle de traitement. La Détente Instantanée Contrôlée (DIC) trouve des applications diverses dans le séchage des fruits et légumes, et dans la décontamination microbienne. Elle offre également des avantages économiques (vitesse, coût), et qualitatifs (stérilisation, qualités organoleptiques, contenu en vitamines).	45
Fig.III.10 : Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore.	46
Fig.III.11 : Spectre électromagnétique.	48

Fig.III.12 : Schéma du procédé d'extraction MAPTM en continu (A) et photo d'une unité pilote du même procédé (B).	49
Fig.III.13 : Schéma du procédé d'extraction par entraînement à l'air assisté par micro-ondes.	50
Fig.III.14 : Schéma du procédé VMHD (A), Evolution des principaux paramètres (B), Photo d'une unité pilote du procédé VMHD (C).	51
Fig.III.15 : Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.	52
Fig.III.16 : Schéma du procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).	53
Fig.III.17 : Répartition des taux de production d'HE (en parties estimées) par pays à travers le monde durant l'année 2008	56
Fig. IV.1 : séchage des feuilles de menthe.	59
Fig. IV.2 : montage d'hydrodistillation	60
Fig. IV.3 : le réfractomètre.	63
Fig. IV.4 : mesure de PH.	64
Fig. IV.5 : analyse de l'indice d'acide.	66
Fig. IV.6 : Schéma de couplage CG/SM.	68
Fig. IV.7 : Activité anti-reflux.	70
Fig. IV.8 : Activité antiacide.	71
Fig. IV.9 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	72
Fig. IV.10 : Préparation du milieu de culture.	75
Fig. IV.11 : Préparation du milieu de culture.	75
Fig. V.1 : Taux d'humidité et la matière sèche de la partie aérienne de menthe poivrée.	80
Fig. V.2 : Représentation graphique des rendements de l'HE de menthe poivrée sèche et humide.	81
Fig. V.3 : Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de la menthe poivrée humide.	82
Fig. V.4 : Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de la menthe poivrée sèche.	82
Fig. V.5 : Aspect des huiles essentielles de la menthe poivrée.	84

Fig. V.6 : chromatogramme de l'huile essentielle de menthe poivrée.	88
Fig. V.7 : Les pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'HE et de l'acide ascorbique (VC).	92
Fig. V.8 : Représentation schématique de l'IC50 de l'HE et la vitamine C.	83

Liste des tableaux

Tableau.I.1 : Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle dans le monde.	06
Tableau.III.1 : Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction.	27
Tableau.III.2 : Production mondiale (2008) des plus importantes huiles essentielles.	54
Tableau. V.1 : suivie de masse de la plante.	79
Tableau. V.2 : les résultats de rendement d'HE de menthe poivrée.	80
Tableau. V.3 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de la menthe poivrée.	83
Tableau. V.4 : résultats des propriétés physico-chimiques.	84
Tableau. V.5 : composition chimique de l'huile essentielle de la menthe poivrée.	86
Tableau.V.6 : Structure des composés organiques principales de M. Piperita.	90
Tableau. V.7 : Pourcentage d'inhibition (I%) de l'HE de menthe poivrée et de l'acide ascorbique	91
Tableau. V.8 : IC50 de l'HE et la vitamine C par le test du DPPH.	93
Tableau. V.9 : Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition et le pourcentage d'inhibition de l'HE de menthe poivrée pour les trois bactéries.	94
Tableau. V.10 : La règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.	95
Tableau. V.11 : Transcription des diamètres d'inhibition de l'HE.	95

Liste des abréviations

AFNOR	: Association française de normalisation.
CG/MS	: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
CO₂	: Dioxyde de carbone.
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse.
DIC	: Détente instantanée contrôlée.
DPPH	: 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl.
ESSAM	: Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes.
Fig	: Figure.
g/L	: Gramme / litre.
GHz	: Giga Herz.
H	: Hydrogène.
H⁺	: Ions hydrogènes.
HE	: Huiles essentielles.
INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique.
MAE	: Microwave Assisted Extraction.
MAPTM	: Microwave Assisted Process.
Mg	: Milligramme.
MHz	: Méga Herz.
mol/L	: Mole/litre.
MVS	: Masse de la matière végétale sèche.
P	: Pression.
PC	: Pression critique.
pH	: Potentiel d'hydrogène.
T	: Température.
TC	: Température critique.
VMHD	: Vacuum Microwave HydroDistillation.

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies ; ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études [1].

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux [1].

La popularité dont jouissent depuis longtemps les huiles essentielles et les plantes aromatiques en générale reste liée à leurs propriétés médicinales en l'occurrence les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides, tonifiantes, stimulantes, et calmantes [1].

Il existe un grand nombre d'huiles essentielles connues dans le monde et plusieurs milliers d'entre elles ont été caractérisées. Cependant, de ce nombre, une faible proportion seulement présente un intérêt commercial. Cela s'explique par la composition chimique des huiles, les différentes utilisations possibles et leur cout de production [2].

L'huile essentielle de la menthe poivrée occupe à elle seule la 6^{ème} place avec une production mondiale estimée à 2092 tonnes/an. Cette place est appelée à se promouvoir davantage, vu l'évolution positive de la demande mondiale de produits naturels au détriment de ceux de synthèse et vu aussi la diversité de leurs domaines d'applications [3].

L'Algérie est riche en plantes aromatique et médicinales susceptible d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques et odorants. Ces plantes aromatiques sont, donc, la source des

huiles essentielles. Parmi ces plantes aromatiques, on retrouve la *Mentha Piperita* (Menthe Poivrée), qui est cultivée dans pratiquement toutes les régions de l'Algérie [3].

Dans le but de faire connaître les effets bénéfiques de l'huile essentielle, on a choisi d'étudier l'huile essentielle de la *Mentha Piperita* (Menthe Poivrée) de la région d'el Attaf (Ain defla, Algérie). On s'intéresse dans ce mémoire aux différents caractères physico-chimiques et biologiques de notre huile essentielle, ainsi qu'aux activités antioxydantes et antibactériennes qu'elle peut présenter.

Notre mémoire est divisé en deux parties :

La première est une étude bibliographique sur les plantes aromatiques, les huiles essentielles et leur composition chimique ainsi que leurs domaines d'utilisation et enfin les différentes méthodes d'extraction.

La deuxième partie de notre travail représente la partie expérimentale où nous allons présenter le matériel et les méthodes utilisés pour l'extraction de l'huile essentielle de *Mentha Piperita*, les analyses physico-chimiques effectuées ainsi que l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle. Enfin, les résultats obtenus seront interprétés.

La conclusion et les perspectives clôtureront notre mémoire.

Chapitre I

Les Huiles Essentielles

Chapitre I : les huiles essentielles.

I.1. Les Plantes aromatiques

I.1.1. Définition

Les plantes aromatiques sont un ensemble de plantes susceptibles de donner des arômes et des huiles essentielles que l'on peut extraire.

L'aromathérapie est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes. Ce mot vient du latin « Aroma » signifiant odeur et du grec « therapeia » signifiant traitement. Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odorifères [4].



Fig. I. 1 : Quelques plantes aromatiques [4].

De nos jours entre 20000 et 25 .000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale.

Les extractions de différents produits se font sous différentes formes dont les plus importantes sont : les tisanes, la gélule de la plante, suspensions intégrales de plantes fraîches et les huiles essentielles.

Les grands types des plantes aromatiques et médicinales utiles à l'homme peuvent être définis par leur principal usage. On peut citer : Plantes pour tisanes boissons hygiéniques et d'agrément, Plantes à usages cosmétiques, Plantes à usages aromatiques et condimentaires, Plantes à usages alimentaires, Plantes à usages industriels, et Plantes médicinales [4].

I.1.2. Les plantes aromatiques en Algérie

Selon Mokaddem [4], l'Algérie comprenait plus de 600 espèces de plantes médicinales et aromatiques.

On peut classer les plantes médicinales comme une ressource naturelle renouvelable, c'est à dire, que l'apparition ou la disparition des plantes, se fait périodiquement et continuellement dans des saisons définies par la nature (la biologie de la plante, l'écologie, etc.). Ces ressources subissent des dégradations irréversibles, comme on assiste aujourd'hui en Algérie et comme l'estime Mokaddem [4], que ces dix dernières années, des dizaines de plantes médicinales et aromatiques ont subits une déperdition. Les plantes médicinales comme les autres plantes subissent différents aspects de dégradation avec un gradient d'intensité variable selon plusieurs causes.

Mokaddem [4], signale que la principale cause de dégradation rencontrée dans la zone de Boussâada (zone steppique) est la désertification, qui est dû essentiellement aux :

- Exploitation abusive des sols inaptes aux cultures.
- Déboisement des plantes (les arbres).
- Le surpâturage.

Tableau. I .1 : Importance de l'utilisation de la médecine traditionnelle dans le monde [4].

Importance de l'utilisation	Pays
80 % de la population locale pour les soins primaires.	Australie
49 % d'adultes.	Chine
30 % à 50 % dans les systèmes de santé. Complètement intégrée dans les systèmes de santé. 95 % des hôpitaux ont des unités de médecine traditionnelle.	Inde
Largement utilisée. 2860 hôpitaux ont des unités de médecine traditionnelle.	Indonésie
40 % de la population totale et 70 % de la population.	Japon
72 % des médecins pratiquent la médecine traditionnelle.	Vietnam
Complètement intégrée dans les systèmes de santé. 30 % de la population se soigne par cette médecine.	Pays occidentaux
La médecine traditionnelle ou complémentaire n'est pas intégrée dans les systèmes de soins modernes <ul style="list-style-type: none"> ✓ France : 75 % de la population a recours à la médecine traditionnelle au moins une fois. ✓ Allemagne : 77 % des cliniques pratiquent l'acupuncture. ✓ Etats-Unis : de 29 % à 42 % de la population utilisent la médecine complémentaire. 	

I .2. Les huiles essentielles

I .2.1. Définition

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergent sur le fait que les huiles essentielles, sont des produits de composition généralement assez complexe, renfermant les principes odorants volatils contenus dans les végétaux. Elles diffèrent

des huiles végétales (huile d'olive...) et des graisses végétales par leur caractère volatil ainsi que leur composition chimique.

L'AFNOR définit l'huile essentielle comme : « Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par des procédés mécaniques, l'huile est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physique» [5].

I .2.2. Histoire et origine

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis des millénaires en Chine (cannelle, anis, gingembre), en Inde, au Moyen Orient (khella, pin, fenouil, etc.), en Egypte, en Grèce, en Amérique (Azèques, Mayas, Incas : bois de Hô, sassafras) et en Afrique (encens, myrrhe, ravensare), les huiles essentielles tombent dans l'oubli au Moyen Age.

A ce moment, l'Europe connaît un retour à la barbarie avec un déclin général du savoir. Il faudra attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouvent alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque.

L'extraction des huiles essentielles par distillation à la vapeur d'eau naît à l'époque de la révolution industrielle et permet le développement de produits alimentaires et de parfums. Au début du XXème siècle, des chercheurs (Chamberland, Cadéac, Martindale) démontrent, par leurs expérimentations, le pouvoir antiseptique des huiles essentielles. Mais les véritables « pères » de l'aromathérapie sont Gattefossé puis Valnet et ses disciples. R.M. Gattefossé, pionnier de la parfumerie moderne se brûlant les mains lors d'une explosion dans son laboratoire, a le réflexe génial de plonger ses mains dans un récipient rempli d'huile essentielle de lavande. Soulagé instantanément, sa plaie se guérit avec une rapidité Déconcertante. Etonné par ce résultat, il décide d'étudier les huiles essentielles et leurs propriétés.

L'aromathérapie moderne était née. Toutefois, malgré son incontestable efficacité, l'aromathérapie ne reçoit pas des médecins, l'accueil qu'elle était en droit d'attendre. La concurrence des laboratoires de produits chimiques de synthèse, financièrement

beaucoup plus puissants, et une mauvaise utilisation des HEs. Suite à une méconnaissance des différentes variétés pour une même espèce sont les raisons de l'absence d'utilisation de l'aromathérapie à cette époque.

Aujourd'hui, des médecins (Valnet, Duraffourd, Lapraz, d'Hervincourt, Belaiche) et des chercheurs, des pharmaciens ont définitivement assis la réputation, l'efficacité et l'extraordinaire richesse des huiles essentielles [5].

I .2.3. Marché des huiles essentielles

Dans les vingt dernières années, il y a eu une augmentation significative des applications des huiles essentielles dans les parfumeries et les industries cosmétiques. Cependant, dans la même période, les huiles essentielles synthétiques ont pris le monopole au détriment des huiles naturelles, surtout dans le secteur de la parfumerie. La production mondiale des huiles essentielles est estimée à environ 50 000 tonnes et le marché représente 700 millions de dollars. Près de 65 % de la production mondiale provient de l'extraction de la partie d'arbres ou arbustes cultivés ou présents à l'état sauvage dans la nature floristique. Les plantes non arbustives qui représentent le reste de la production de 35 % sont en majorité cultivées [6].

I .2.4. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

I .2.4.1. Dans les industries agro-alimentation

Les huiles essentielles sont utilisées comme condiments, aromates ou épices. C'est le cas des HEs de gingembre, de girofle, de vanille, de basilic, de poivre, de citrus. Les huiles essentielles extraites de citrus, par exemple, trouvent leur utilisation dans la confiserie, les sirops, les biscuiteries. On note leur intégration aussi dans les boissons, les produits laitiers, les soupes, les sauces, les snacks, les boulangeries ainsi que la nutrition animale [7].

I .2.4.2. La médecine et l'industrie pharmaceutique

- Les propriétés pharmacologiques des HE leurs confèrent un pouvoir antiseptique contre les bactéries, champignons et levures, en plus des propriétés bactériostatiques, bactéricides, vermicide, fongicides, antiseptiques, insecticides. Les He de thym, girofle,

lavande, eucalyptus. Le thymol, constituant principal de l'huile essentielle de thym, est 20 fois plus Antiseptique que le phénol [7].

L'huile essentielle de Malaleuka a prouvé cliniquement son action antiseptique, antimicrobienne et antioxydante.

- Des propriétés spasmolytiques et sédatives : Certaines drogues à HE (menthe, verveine) sont réputées efficaces pour diminuer les spasmes gastro-intestinaux.
- Des propriétés irritantes : De nombreuses crèmes, pommades à base d'HE sont destinées à soulager entorses, courbatures ou claquages musculaires, certaines HE ex : oléorésine dans la térébenthine) augmentent la microcirculation, induisent une sensation de chaleur et dans certains cas une légère anesthésie locale.



Fig.I.2 : des médicaments à base d'HE [7].

I .2.4.3. L'industrie de la parfumerie et de la cosmétique

La cosmétique, la parfumerie et le secteur des produits d'hygiène naturels et synthétiques utilise fréquemment les huiles essentielles. Elles sont intégrées dans des analgésiques pour la peau, les produits solaires, les préparations pour bains, les shampoings et les parfums. Elles sont aussi intégrées aux huiles de massage ; cependant, leur teneur ne doit pas

dépasser 3 à 4%. Le menthol trouve aussi une utilisation variée dans les produits tels que les dentifrices et les mousses à raser. L'huile de menthe poivrée est la troisième saveur mondiale, derrière les saveurs vanille et citron [7].



Fig. I .3 : utilisation des HE dans la cosmétique [7].

I .2.4.4. Dans diverses industries

Ce sont surtout les industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des HE) comme matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, etc.

Citons ainsi l'utilisation des isolats linalool, D-limonène dans des shampoings et sprays insecticides pour les chats et les chiens [7].

I .2.5. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaciaceae ou Asteraceae). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à HEs sont localisées dans les tissus internes.

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à

des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air.

- Les poils sécréteurs ou trichomes qui peuvent se présenter sous quatre formes : ils peuvent se composer de plusieurs cellules sécrétrices associées pour constituer un plateau porté par un pédicelle court, poils peltés, poils capités à pieds court ou long ou bosselé.

Les poils sécréteurs peuvent être externes ou bien internes, comme dans les divers eucalyptus ; Les trichomes glandulaires constituent un autre type de structure de sécrétion et/ou d'accumulation des CTV. Ces trichomes ont particulièrement été étudiés chez certaines familles botaniques telles que les Solanacées et les Lamiacées.

- Les cellules épidermiques : il s'agit de cellules plus petites que les autres cellules épidermiques. Elles sont davantage perméables car leur paroi ne contient pas de cutine ; ce type de cellules se rencontre généralement dans les pétales de fleurs. Chez la rose.

- Les poches sécrétrices : leur genèse débute par la division d'une cellule Parenchymateuse en quatre cellules, qui forment en leur centre une poche. Dès lors, il existe deux voies d'évolution pour cette poche : soit les cellules entourant la poche, continuent à se diviser tout en formant une seule rangée tout autour ; la poche est qualifiée de schizogène ; soit les cellules, entourant la poche, vont se diviser et s'organiser pour constituer des rangées successives autour de la poche, avec un phénomène de lyse pour les cellules de la rangée la plus interne formant alors une poche schizolysigène [8].

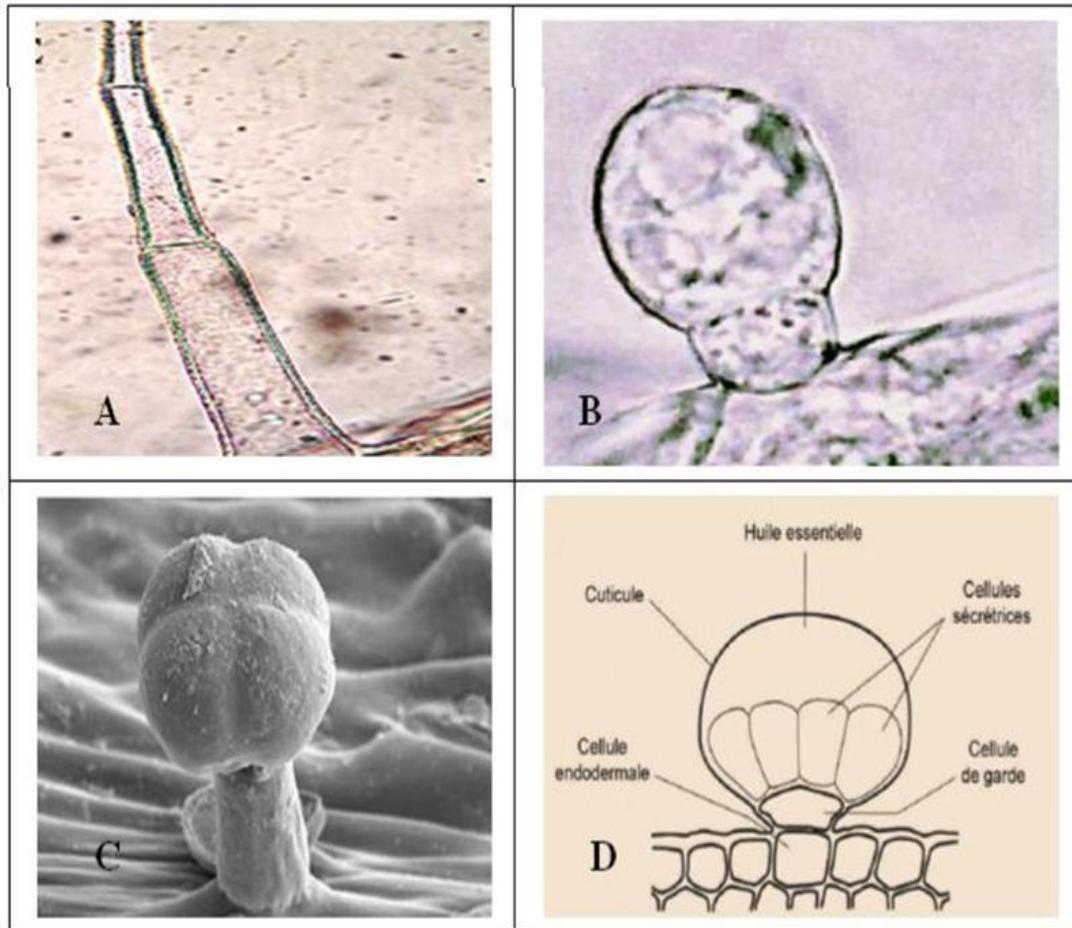


Fig.I.4 : Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles [8].

(A) : poil sécréteur de *Mentha pulegium*) ;

(B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium* ;

(C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* ;

(D) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris*.

I.2.6. Composition chimique

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe, Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable, d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces. De masse moléculaire relativement faible (terpènes : 136 u.m.a, terpinols : 154 u.m.a, et sesquiterpènes : 200 u.m.a.), ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives. HE est constitué de deux fractions. La première fraction dite volatile (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle.

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes (Cisowski, 1985), composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante.

Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires où il apparaît clairement comment les molécules très volatiles sont synthétisées à partir d'unités méthyl-2-buta-1,3-diène (isoprène) et où les réactions d'addition de ces unités conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, diterpènes et leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques.

L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique [9].

I.2.6.1. Monoterpènes :

Molécules hydrocarbonées qui constituent des composés essentiels, acycliques, monocycliques, bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (Citrus, Térébentine) [9].

I.2.6.2. Sesquiterpènes

L'allongement de la chaîne (Fpp) accroît le nombre de cyclisations possibles. Ainsi, plus d'une centaine de squelettes différents a été décrite.

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes, composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante [9].

Composés aromatiques :

Dérivés du phénylpropane (C6-C3). Ils sont beaucoup moins fréquents que les molécules volatiles. Un noyau aromatique est couplé à une chaîne de trois carbones [9].

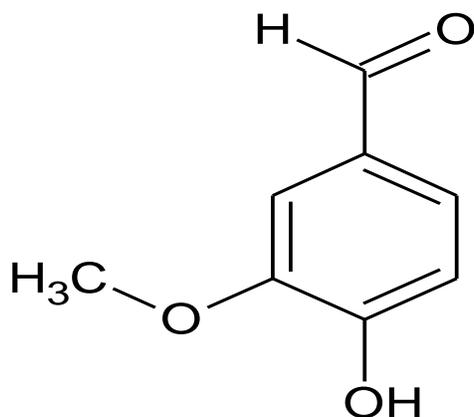


Fig.I.5 : Structure de la vanilline [9].

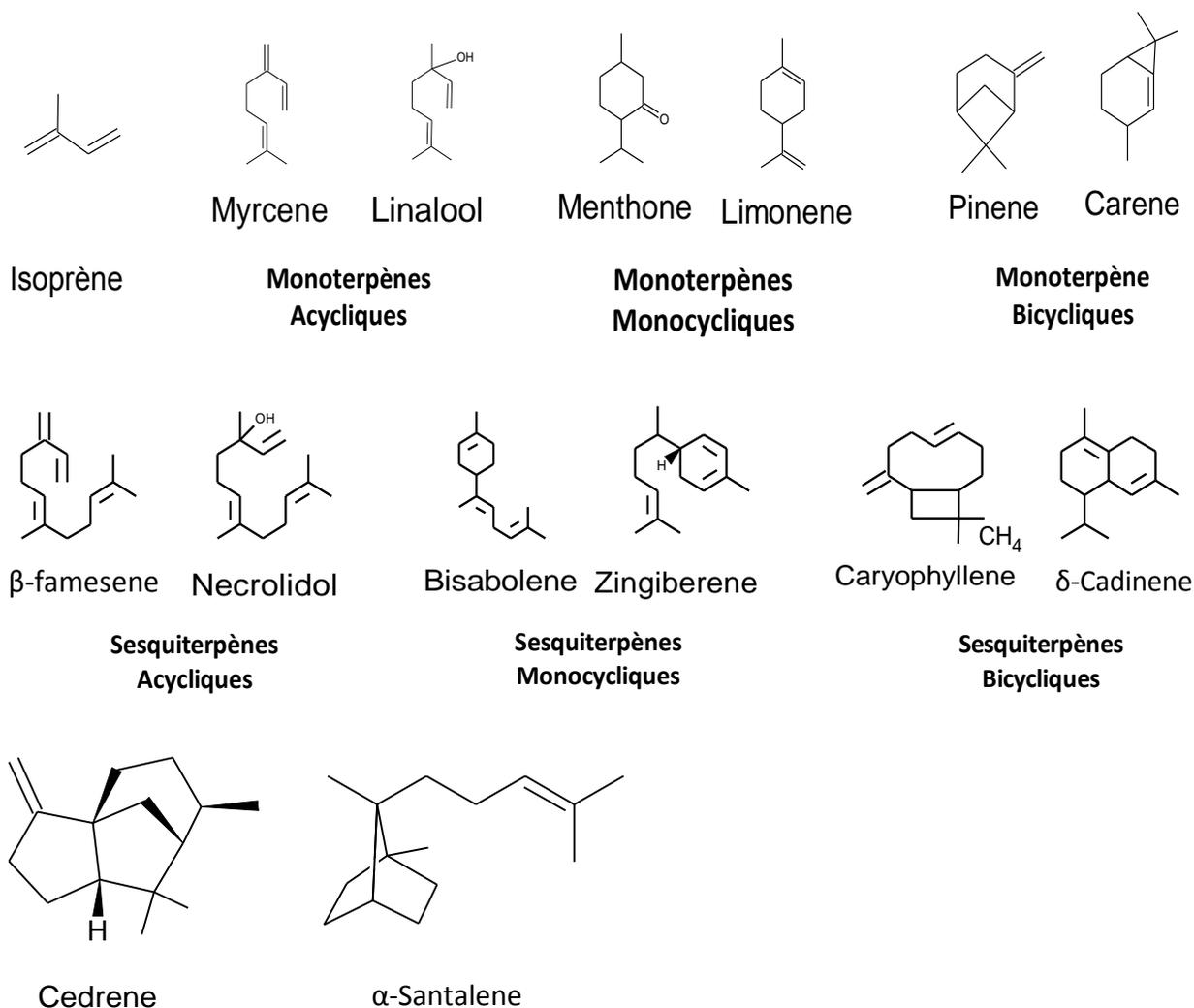


Fig.I.6 : Schémas des principales formes de squelettes carbonés des mono et sesquiterpènes [10].

Composés d'origines diverses :

Certains composés aliphatiques de faible poids moléculaire sont entraînés lors de l'hydrodistillation des HE à savoir les carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters [10].

I .2.7. Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène. Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante.

- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Volatiles et très rarement colorées.
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes.
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux [11].

I.2.8. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se conservent plusieurs années. Elles ont même tendance à se bonifier avec le temps (à l'exception des huiles essentielles extraites des zestes d'agrumes qui ne se conservent pas plus de 2 ans).

Il est recommandé de les stocker dans des flacons en verre ambre ou foncé, de manière à les protéger de la lumière, il faut éviter les forts écarts de température et le contact avec l'air, il faut bien refermer les flacons après usage car les arômes s'évaporent dans l'atmosphère. Tenir les flacons hors de portée des enfants. Les flacons doivent être stockés en position verticale, en position horizontale, il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (les huiles ont une action corrosive sur le plastique). Dans ces conditions, les huiles essentielles se conservent plusieurs années [12].

I.2.9. Critères de qualité

L'huile essentielle utilisée en thérapeutique doit posséder de nombreux critères de qualité:

- *L'espèce botanique :*

La certification botanique doit apparaître selon la nomenclature internationale sous son nom latin précisant le genre, l'espèce et la sous-espèce.

- *L'organe producteur :*

Selon la partie de la plante (feuilles, fleurs...) distillée (ou pressée pour les zestes de Citrus), il peut exister plusieurs huiles essentielles pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes.

- *L'origine géographique :*

Cela permet de connaître l'environnement dans lequel grandit la plante et de caractériser ainsi l'huile essentielle obtenue. Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine.

Une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes.

- *Le mode de culture :*

Il définit si la plante est cultivée ou sauvage. Il est souvent représenté par un label si la plante provient d'une culture biologique.

- *Le chémotype :*

Il définit la molécule aromatique révélatrice des principales propriétés thérapeutiques de l'huile essentielle.

Une plante de même variété botanique peut produire des huiles essentielles de compositions chimiques différentes selon son origine, son pays, son climat, son sol.

Une huile essentielle peut contenir de vingt-cinq à cent molécules biochimiques différentes. Ce qui explique la polyvalence d'action des huiles essentielles. On effectue une chromatographie en phase gazeuse liée à une spectrométrie de masse pour identifier et quantifier chacune de ces molécules et connaître ainsi la composition précise des huiles essentielles [13].

- *Le mode d'extraction*

Chapitre II

La Mentha Piperita

Chapitre II : La Mentha Piperita.

II.1. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Ce sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses.

Environ 35000 espèces de plantes sont employées dans le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne [14].

II.1.1. Domaine d'application des plantes médicinales

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans les industries pharmaceutique, alimentaire, cosmétique et en agriculture. En effet, la pharmacie utilise encore une forte proportion de médicament d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour les semi-synthèse [15].

- a. **Utilisation en médecines :** Les plantes sont utilisées en tant que médicament pour l'homme dans plusieurs domaines médicaux comme l'urologie et la dermatologie. Elles sont aussi utilisées comme laxatifs et pour traiter les gastrites aiguës, toux, ulcères d'estomac, trouble du sommeil et désordres nerveux, ainsi que le diabète (*Azadirachta indica*).
- b. **Activité antimicrobienne, antivirale, antifongique et antiparasitaire :** les produits naturels des plantes depuis des périodes très anciennes ont joué un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ex : la quinine obtenue à partir du quinquina « *Cinchona* » a été avec succès employée pour traiter la malaria, l'arbre de thé (*Melaleuca alternifolia*) est renommé pour ses propriétés antibactériennes, anti-infectieuses, antivirales. Mais aucune plante n'est aussi efficace que les médicaments antirétroviraux pour arrêter la réplication du VIH,

antifongiques (Adenocalymmaalleaceum, Allium ampeloprasum, Allium ramosum, Allium sativum, Tulbaghiaviolacea, Capsicumannuum, Capsicumchinese).

- c. **En agriculture** : l'arbre Azadirachta indica, qui se développe dans tout le subcontinent indien, est une des plantes médicinales les plus importantes au Bangladesh, de 12 à 18 mètres de hauteur avec un périmètre atteignant jusqu'à 1.8 à 2.4 mètres. ; les huiles de cet arbre ont des utilisations dans l'agriculture dans le contrôle de divers insectes et nématodes (vers parasites).
- d. **En alimentation** : les plantes sont utilisées en assaisonnement, dans les boissons, les colorants et les composés aromatiques. Les épices et les herbes aromatique utilisées dans l'alimentation sont pour une part responsable des plaisirs de la table, ils sont considérés comme condiments et aromates.
- e. **En cosmétique** : dans la fabrication des produits de beauté, parfums et articles de toilette et produits d'hygiène.
- f. **Comme suppléments diététiques [15].**

II.2. Le genre Mentha

Les Mentha sont des herbes vivaces très odorantes. Les inflorescences sont en épis cylindriques terminaux non feuillés, en têtes sphériques ou en verticilles. Le calice est tubuleux ou en cloche à 5 ou 4 dents subégales. La corolle infundibulifonne blanche rosée ou violet pâle à 4 lobes subégaux. Les carpelles sont lisses. Corolle non velue à la gorge. Ce genre est caractérisé par des feuilles sessiles ou subsessiles, distinctement pédonculées. Elles sont ovales obtuses moins de 2 fois plus longues que larges, ridées en réseau. Les Plantes sont pubescentes à épis florifères grêles et allongés [16].

II.2.1. Étymologie

Le mot « menthe » vient du latin Mentha, qui dérive lui-même du grec μίνθη / Mínthê ou μίνθα / míntha, du nom de Minthé qui dans la mythologie grecque était une nymphe que Perséphone a métamorphosé en cette plante (Elle est chez Oppien fille du Cocyte, un des cinq fleuves des Enfers) [16].

II.2.2. La Mentha Piperita

La Mentha Piperita « Menthe Poivrée » est une menthe très odorante. La Menthe était connue des égyptiens qui la cultivaient et des japonais qui utilisaient le menthol depuis plus de 2000 ans. Hippocrate décrit ses vertus stomachiques et diurétiques et Charlemagne en impose la culture parmi d'autres plantes à huile essentielle.

Ce sont les anglais qui au cours du 18^{ème} siècle ont répandu la M. Piperita en Europe et en Amérique.

La Menthe est l'une des espèces les plus célèbres parmi les plantes médicinales. Ses feuilles renferment une huile essentielle d'où elle doit son parfum à une huile essentielle douée de propriétés antiseptiques dont le principe actif est le menthol. Il est contenu dans toute la plante, son contact procure une sensation de fraîcheur, voire d'anesthésie locale. Son usage comme aromatisant en pharmacie, en alimentaire et en confiserie est très largement répandu (**Fig.II.1**) [17].



Fig.II.1 : La Mentha Piperita [17].

II.2.2.1. Description botanique

La M. Piperita est une plante herbacée de la famille des Lamiacées. Ce type de menthe est hybride de la Mentha Aquatica (Menthe Aquatique) et de la Mentha Spicata (Menthe Verte), qui ont des vertus médicinales semblables. C'est une plante vivace par son rhizome qui se propage sous terre ; elle se propage également par stolons.

Ses feuilles mesurent de 4 à 10cm de long, elles sont ovales, vert foncé et se teignent de nuances rougeâtres au soleil et de rouge cuivré à l'ombre. Elles sont recouvertes de gros poils sécréteurs arrondis dans lesquels s'accumulent les substances volatiles odorantes. Ses tiges sont violacées de section carrée, ses fleurs se trouvent tout en haut de la plante et sont rose violet. Sa hauteur en cm est de 10 à 14cm (**Fig.II.2**) [18].



Fig.II.2 : Dessin de la plante et des fleurs de la M. Piperita [18].

II.2.2.2. Nomenclature et taxonomie

Le nom de la Menthe vient du grec « Minthe », nom d'une nymphe transformée en fleur par Proserpine et de « Piperata » qui signifie « Poivrée ». La menthe est l'une des espèces les plus célèbres parmi les plantes médicinales.

Selon **Quezel** [19], la classification de la menthe est la suivante :

Règne:	Plantae;
Division:	Magnoliophyta;
Classe:	Magnoliopsida;
Ordre:	Lamiales;
Famille:	Lamiaceae;
Genre:	Mentha;
Espèce	Mentha piperita.

II.2.2.3. Les dénominations communes de la M. Piperita

Noms communs:	Menthe, Menthol, Menthe Anglaise, Menthe Sauvage.
Nom latin:	Mentha Piperita.
Nom anglais:	Peppermint, Mint.
Nom allemand:	Pfefferminze.
Nom italien:	Menta.
Nom portugais:	Menta - Hortelã.
Nom arabe:	Ennaanaa al folfoli, Enaanaa al beldi (Maroc), Enaanaa (Algérie et Tunisie) [19].

II.2.2.4. Répartition géographique

On cultive la M. Piperita en Europe, en Asie, en Afrique du nord et en Amérique du nord. On la trouve un peu partout en Europe ainsi qu'en Amérique. Elle affectionne les sols humides ou, au contraire, secs, en fait, cela dépend de l'espèce. On plante, en général, la M. Piperita en mars, avril. On peut la bouturer en mars, juillet et août. On la récolte en mai, juin, juillet, août, septembre et octobre. Elle doit, de préférence, être plantée dans un endroit ensoleillé. Elle nécessite un sol drainé, fertile et frais, riches en calcaire et en argile. Elle requiert un pH entre 6 et 7. Elle se reproduit grâce à des stolons [19].

II.2.2.5. Les principes actifs

La feuille de M. Piperita contient une huile essentielle, des acides-phénoliques, des flavonoïdes (glycosides de la lutéoline et de l'apigénine), des triterpènes. L'huile essentielle est principalement constituée de menthol (30 à 40%), de menthone et d'autres monoterpènes. Cette huile essentielle est responsable de l'odeur puissante de la M. Piperita. Les feuilles de bonne qualité destinées à un usage pharmaceutique contiennent plus de 9ml d'huile essentielle par kg de feuilles sèches.

L'obtention d'un litre d'huile essentielle de M. Piperita nécessite l'utilisation de 400 kg de cette plante. L'huile essentielle extraite de la M. Piperita contient principalement du menthol (40%), de la menthone (20%), du néomenthol (4%) et du cinéole (4%) [20].

II.2.2.6. Place de la menthe en phytothérapie

Il existe de nombreuses espèces de Menthe. En dehors de la *Mentha Pulegium* qui peut être dangereuse pour la santé dans la mesure où elle contient une substance toxique, toutes les autres menthes ont des vertus médicinales similaires.

La *M. Piperita* est utilisée depuis fort longtemps en nature et pour son huile essentielle. Chez les égyptiens, elle était conseillée contre les nausées. Il suffisait de passer un peu de menthe sous les narines.

Chez les romains, ils l'utilisaient pour aromatiser du vin et des sauces mais également pour soulager les maux de tête et d'estomac. A la renaissance, on l'utilisait contre les vomissements et les maux de tête et depuis toujours, les arabes boivent du thé à la menthe pour calmer la soif et pour sa vertu antiseptique.

Ses propriétés, antispasmodique et antiseptique, calme la toux, soigne les névralgies, soulage les douleurs sciatiques ou dentaires, calme la paroi interne de l'estomac, aide à accélérer la digestion, stimule la sécrétion biliaire. La menthe sert pour calmer les spasmes intestinaux, les crampes digestives, les nausées, les ballonnements. C'est aussi un vermifuge et un stimulant du système nerveux.

Le menthol contenu dans l'huile essentielle a un effet antibactérien et antioxydant, cette huile est souvent utilisée dans les dentifrices et les bains de bouche (contre les névralgies dentaires) ainsi elle soulage les migraines. En usage externe, utilisée comme pommade ; efficace contre le rhume. Elle est utilisée aussi pour éloigner les moustiques [21].

Chapitre III

Les procédés d'extraction

Chapitre III : Les procédés d'extraction.

III .1. Choix de la méthode d'extraction

La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils. Pour cela, différents paramètres et propriétés sont à prendre en compte [22].

III .1.1. Principaux paramètres d'extraction

Les principaux paramètres à prendre en compte dans les opérations fondamentales d'extraction de matières premières naturelles aromatiques sont :

- La volatilité;
- La solubilité ;
- La taille et la forme des molécules constitutives ;
- L'adsorption.

Le **Tab.III.1** résume les techniques les plus couramment utilisées et quelques types de produits fabriqués. Ces techniques d'extraction mettent en œuvre, en ligne la plupart du temps, plusieurs types d'opérations fondamentales. Les principales opérations industrielles ont été résumées dans la **Fig.III.1** [23].

Tableau. III. 1 : Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction [23].

Techniques	propriétés	Produits fabriqués
Evaporation Déshydratation – Séchage Concentration de miscella (S/pres. atm. ou réduite) Concentration de jus de fruits	Volatilité	Résinoïdes, concrètes Oléorésines
Distillation Rectification (S/pres. atm. ou réduite) Distillation sèche		Isolats, déterpénés Huile empyreumatique
Co-distillation Avec eau (S/pres. Atm. ou en surpression) <ul style="list-style-type: none"> Hydrodistillation et à vapeur humide Vapeur sèche Avec un autre fluide (S/pres. Atm. ou réduite) <ul style="list-style-type: none"> Alcool Polyols 		Huiles essentielles Eaux aromatisées Alcoolats Distillats moléculaires
Extraction liquide / solide Solvant conservé : <ul style="list-style-type: none"> Crops gras Alcool Solvant éliminé : <ul style="list-style-type: none"> Fluide liquide Fluide liquéfié (ou supercritique) 	solubilité	Pommade Influsion – Teinture Concrète, résinoïde
Extraction liquide / liquide Discontinue Continue		Huiles essentielles déterpénées
Cristallisation Après concentration partielle et refroidissement		Menthol - Anéthol
Broyage - tamisage Expression - Filtration Glaçage -Filtration	Formes et taille des particules	Huiles essentielles d'agrumes
Séparation au moyen de membranes		
Séparation chromatographique Décoloration	Adsorption	Huiles essentielles Absolues

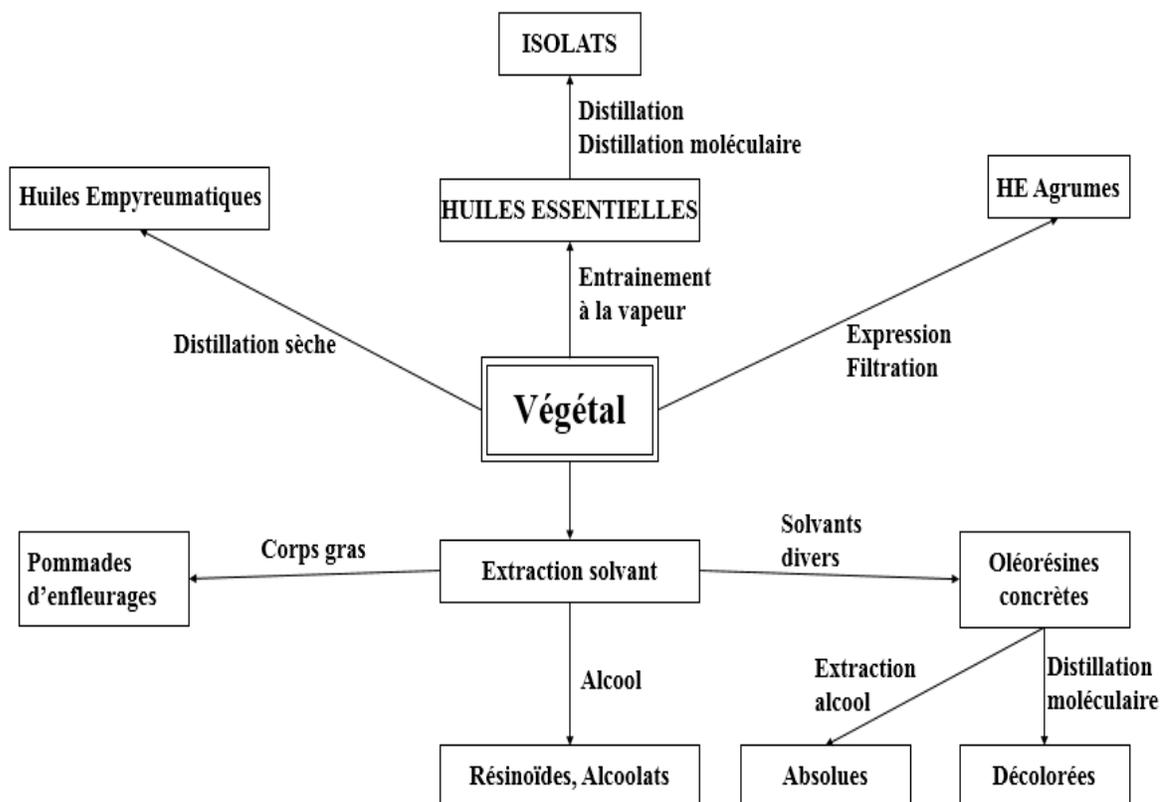


Fig.III.1 : Principales opérations industrielles d'extraction [23].

III.1.2. Paramètres influençant l'extraction

III.1.2.1. Matière Végétale

- Choix des plantes : Seules les plantes saines de l'espèce recherchée doivent être récoltées.
- Mode de cueillette : On peut cueillir les fleurs, feuilles, bourgeons et petites baies en les arrachant simplement de la plante à la main. Puis on récolte les tiges, les racines et écorces de préférence avec un petit couteau ou un sécateur. Cette méthode est plus écologique et permet d'obtenir des huiles essentielles de meilleure qualité.
- Provenance (région d'origine) : Le sol dans lequel pousse la plante et le climat qui règne dans une région donnée déterminent et différencient en grande partie la qualité de l'HE que produit cette région par rapport à l'HE de la même plante provenant d'une autre région.

- Stade végétatif : La récolte doit avoir lieu pendant le stade végétatif quand la plante est plus riche en HE. Ce moment varie d'une plante à une autre.
- Période de la journée : La qualité de l'HE d'une plante varie en fonction de la période de la journée où elle est récoltée. C'est dès l'aube, lorsque la rosée s'évapore, que la concentration des huiles essentielles est la plus élevée dans les plantes, car les gouttelettes de rosée empêchent encore l'évaporation des huiles. A défaut, on peut récolter en fin d'après-midi ou en début de soirée, au moment où les plantes exhalent le moins leur parfum.
- Partie de la plante distillée : Les diverses parties d'une même plante (fleur, feuille, tige, écorce, racine, etc.) peuvent produire des HEs différentes [24 ;25].

III.1.2.2. Nature et état du solide et du soluté

La nature et l'état physique du soluté ont une importance primordiale et déterminent le mécanisme de transfert de matière. Le soluté contenu dans ces corps est soit un solide, soit un liquide, stable ou non à la chaleur ou à l'atmosphère. Il est réparti uniformément en des teneurs variables dans le solide.

Si le soluté est dispersé uniformément dans le solide, les parties superficielles sont dissoutes en laissant derrière elles un solide poreux. Le solvant doit ensuite pénétrer cette couche extérieure avant d'atteindre le soluté situé en profondeur. Le chemin du solvant est rendu de plus en plus difficile, traduisant ainsi une diminution de la vitesse superficielle.

Lorsque la teneur en soluté est importante dans le solide, la structure poreuse peut être détruite par broyage. La dissolution ultérieure du soluté devient plus facile. Dans les matières végétales, le soluté est généralement occlus dans des cellules d'où il est extrait par un mécanisme de dialyse ou de diffusion capillaire à travers des parois cellulaires. L'ordre de grandeur expérimentale de la diffusivité d'une huile est de 10^{-9} m²/s dans le solvant libre et de 10^{-14} m²/s dans le tissu cellulaire intact [26].

III.1.2.3. Nature, concentration et volume du solvant

Le choix du ou des solvants est très important. Il doit être d'une grande pureté et avoir un faible point d'ébullition pour pouvoir être éliminé facilement en limitant la perte de composés volatils. Il ne doit pas interférer avec la méthode d'analyse utilisée. Il doit

pouvoir extraire les composés polaires et apolaires ou bien être sélectif. Le choix est fonction de la matrice et des composés à étudier. Il faut tenir compte de la polarité des composés, de leurs températures d'ébullition et de la miscibilité avec les autres solvants [27].

III.1.2.4. Méthode, durée, Température et pression

La réduction de la pression de marche provoque un abaissement des températures d'ébullition et de condensation. Inversement, toute augmentation de pression entraîne une élévation de ces températures.

L'élévation de la température permet l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité. Elle doit être limitée pour éviter les risques d'extraction des composés nuisibles et la dégradation thermique du soluté.

La durée de l'extraction (longue ou prolongée) permet de recueillir l'ensemble des fractions «de tête » et «de queue » dans le cas de la distillation. Elle dépend du procédé d'extraction utilisé et de l'objectif de l'extraction [27].

III.2. Techniques conventionnelles d'extraction

D'après Guenther [28], les huiles essentielles sont obtenues le plus souvent par distillation.

III.2.1. Distillation – Evaporation

La différence entre distillation et évaporation, est l'intérêt porté aux produits séparés. Dans la distillation, c'est la phase vapeur qui a de la valeur car elle contient le ou les constituants à séparer, alors que dans l'évaporation, c'est le résidu solide ou liquide obtenu par vaporisation du solvant, qui est le produit intéressant [28].

III.2.1.1. 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 (**Fig.III.2, 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.
- 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 (**Fig.III.2, 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 [28].

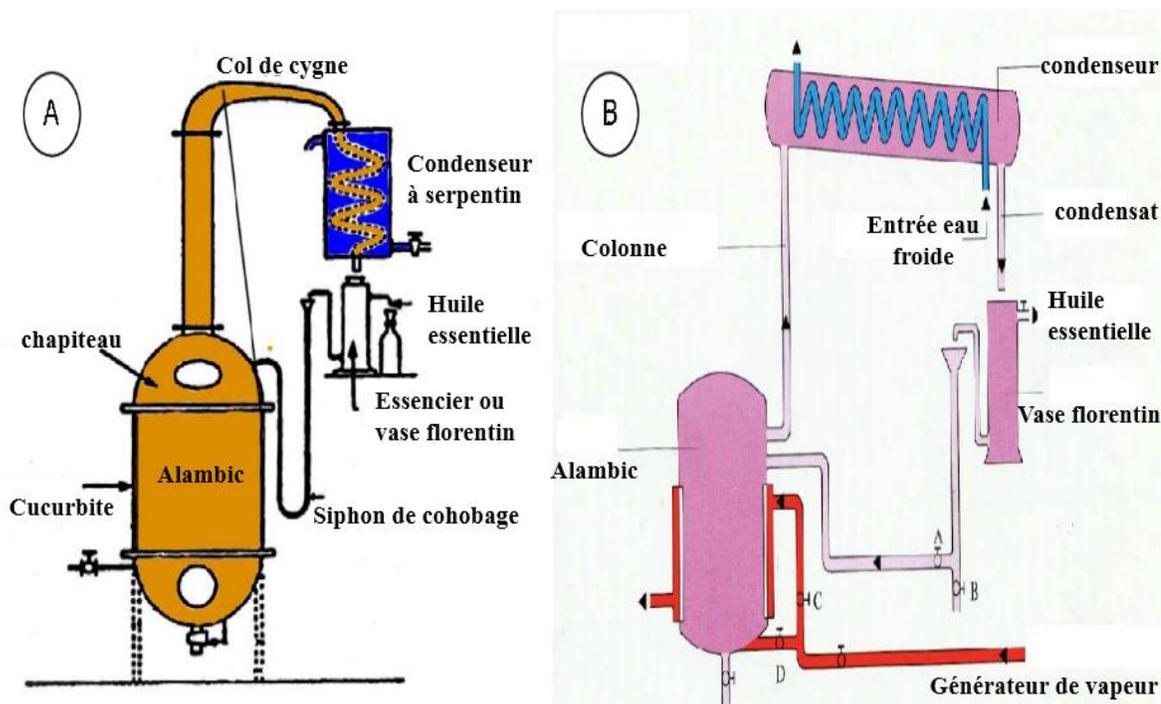


Fig.III.2 : Schéma des appareils d'Hydrodistillation (A), et d'entraînement à la vapeur d'eau (B) [28].

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 limitante 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 [28].

III.2.1.2. Codistillation avec un autre 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, etc.) sous pression élevée ou très réduite (distillation moléculaire : vide élevé, court trajet des vapeurs). On obtient ainsi d'excellents produits commerciaux, peu colorés, sans odeur empyreumatique [28].

III.2.1.3. Evaporation – concentration

Les miscella évacués des extracteurs, soit par gravité, soit au moyen d'une pompe centrifuge de circulation, sont envoyés dans un décanteur, séparant la phase aqueuse, de la phase huileuse qui est filtrée puis concentrée pour récupérer le solvant.

Notons que « la qualité d'un extrait est en raison inverse de la température maximale mise en œuvre pour son obtention et de la durée d'application de cette température, en particulier dans la concentration du solvant d'extraction » [28].

III.2.1.4. Rectification (fractionnement)

Cette opération de distillation sous vide consiste à séparer plusieurs constituants d'un mélange liquide par échange de matière entre une phase vapeur et une phase liquide, au moyen d'une série de vaporisations et de condensations entre ce liquide et cette vapeur qui chemine à contre-courant dans une colonne. Elle permet de séparer des composants de

mélanges liquides dans un état de grande pureté, voire éliminer les traces d'eau, les matières solubles ou résineuses et les colorants [29].

III.2.1.5. Distillation sèche

En chauffant en milieu clos, certains bois (cade, bouleau, etc.) à des températures élevées, on fabrique des huiles empyreumatiques (cade, bouleau, arôme fumé, etc.) d'importance assez limitée, mais riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérigènes [30].

III.2.2. 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, etc. 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 composants aromatiques, 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 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.
- 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 [30].

III.2.2.1. L'enfleurage à froid

Ce processus d'extraction, n'est plus trop utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité. 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. L'enfleurage 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 enfleurage au niveau de la qualité [30].

III.2.2.2. 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 degrés. 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 [30].

III.2.3. Méthodes d'extraction à froid

La pression à froid est le moyen le plus simple mais aussi le plus limité. Cette technique d'extraction est utilisée pour obtenir des HEs d'agrumes contenues dans les zestes. Autrefois, les fruits étaient frottés manuellement sur des parois garnies de picots d'une écuelle de bois. L'huile exprimée était recueillie à l'aide d'une éponge. Elle était ensuite

soigneusement filtrée. Quatre à cinq heures sont nécessaires pour traiter une centaine de kilo d'écorces, sans compter les pertes de rendement.

Afin d'augmenter le rendement et de réduire les coûts, de nombreux essais ont été effectués pour mécaniser le procédé. En 1908, Perroni-Paladini suivi de Lo Castro, Marisca et, plus tard, Speciale et Indelicato ont inventé des machines ayant une capacité de traitement supérieure (environ 1 tonne/heure). De concepts mécaniques différents, ces machines consistent en deux rouleaux sur lesquels tourne une chaîne spéciale, avec des éléments déformables. Après extraction du jus par "birillatrice", les écorces sont entraînées en tournant entre la chaîne et un plateau horizontal nervuré fixe. Des jets d'eau permettent de récupérer l'HE et l'émulsion est ensuite centrifugée. Ces machines sont appelées « Sfumatrice ».

En appliquant des systèmes plus performants, Speciale et Indelicato ont mis au point de nouvelles machines telles que la "Super-Sfumatrice" et, plus récemment "AZS-204 " permettant l'extraction automatique et simultanée du jus et de l'huile essentielle, avec des capacités supérieures à 2 tonnes/heure. Le fruit est coupé en deux par une lame fixe et les moitiés tombent dans des coupelles dans lesquelles elles sont pressées par des têtes rotatives pour récupérer le jus. Elles sont ensuite entraînées entre un rouleau et un plateau fixe où l'HE est récupérée avec des jets d'eau. L'émulsion eau - HE est séparée par centrifugation [31].

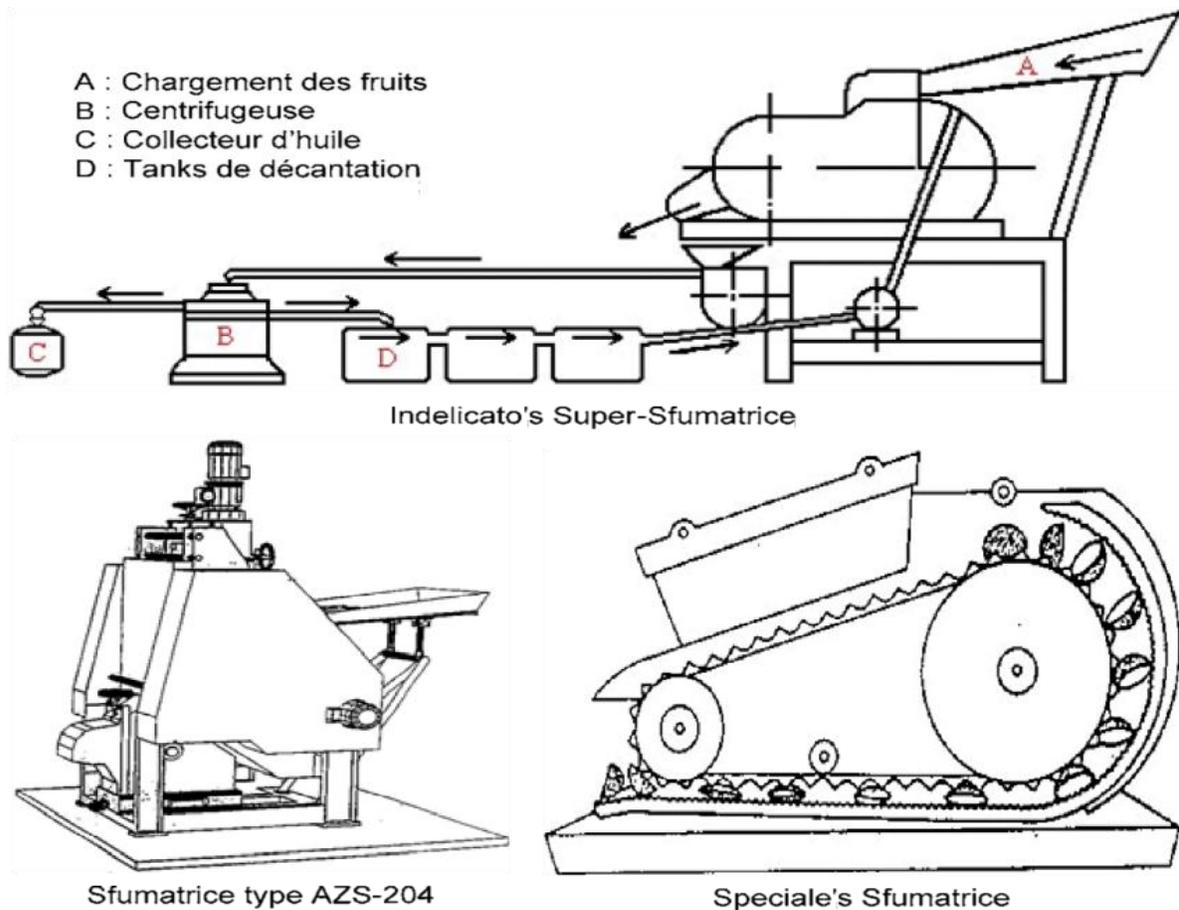


Fig.III.3 : Schéma des différents Sfumatrices [31].

Poursuivant leurs recherches pour améliorer l'extraction de l'HE à partir du fruit entier, Ando, Avena, et plus récemment Speciale et Indelicato, ont développé une nouvelle méthode d'extraction appelée « Pelatrice » largement diffusée dans le monde (**Fig.III.4**). Les fruits sont envoyés dans une machine comportant trois couples de rouleaux en acier inox percés de trous comme une râpe, tournant en sens contraire et forçant les fruits à tourner sur eux-mêmes afin d'en râper toute l'écorce. Des jets d'eau récupèrent l'HE formant une émulsion. Celle-ci est séparée puis clarifiée dans plusieurs centrifugeuses [31].



Fig.III.4 : Photos à gauche d'une Pelatrice et à droite d'une centrifugeuse séparatrice de l'HE de citrus des eaux résiduelles [31].

Les extracteurs sont équipés de quatre têtes d'extraction, chacune d'elles étant constituée d'un bol inférieur et d'un bol supérieur mobile qui compriment le fruit. Des couteaux supérieurs et inférieurs tranchent le fruit pendant le mouvement de descente du bol supérieur. Le jus est ainsi pressé dans un tuyau tamiseur qui se comprime pendant le mouvement ascendant synchronisé du tuyau d'écoulement. Parallèlement, l'HE obtenue est écoulee latéralement lorsque les cellules du zeste (flavedo) éclatent lors de la descente du bol supérieur [31].

Il convient de mentionner une autre technique utilisée avec succès par l'industrie. Elle consiste en deux vis qui forcent les écorces à libérer l'HE à une pression donnée (**Fig.III.5**). L'émulsion est envoyée dans un filtre-presse pour éliminer les principaux résidus [31].

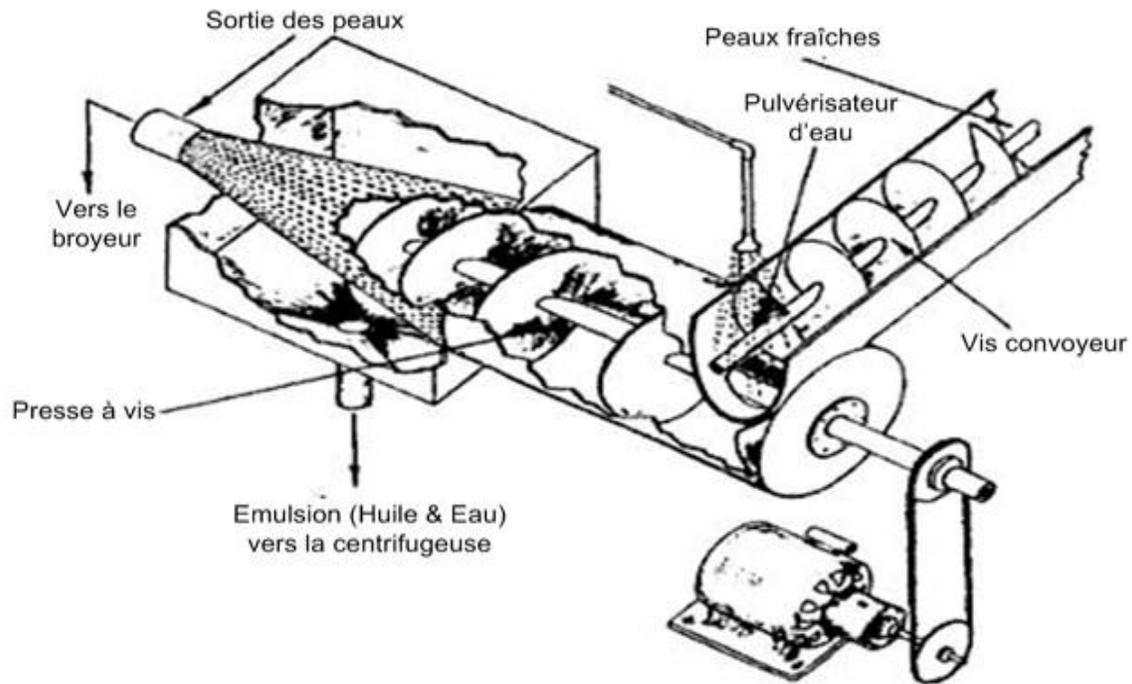


Fig.III.5 : Schéma représentatif de l'extraction par pression [31].

III.2.4. Méthode d'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion (**Fig.III.6**), est une co-distillation descendante. Dans ce procédé, le végétal est disposé dans un parallélépipède métallique grillagé. On soumet donc le végétal à une pulsion de vapeur d'eau, saturée et humide, mais jamais surchauffée de haut en bas. La forme de l'appareillage permet une meilleure répartition des charges. La vapeur d'eau emporte avec elle toutes les substances volatiles. L'huile essentielle est recueillie grâce à un collecteur qui permet un équilibre avec la pression atmosphérique. On peut aussi préciser qu'il y a un procédé de cohobation qui renvoie dans la chaudière toutes les eaux qui sont séparées des huiles [32].

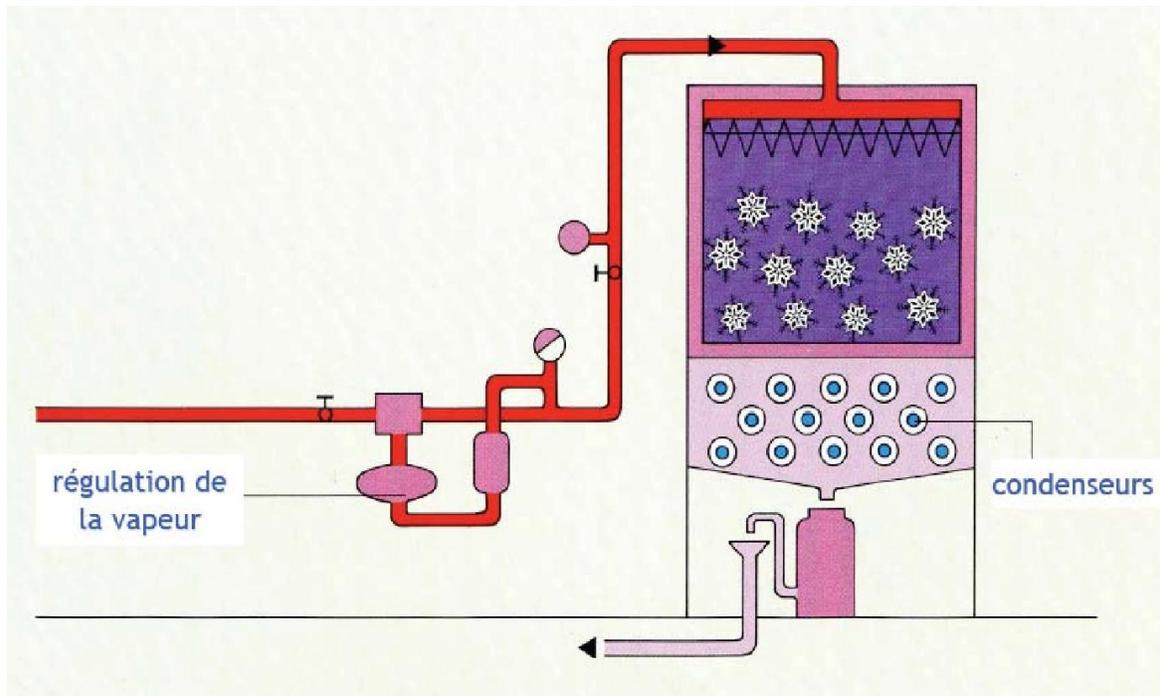


Fig.III.6 : Schéma du procédé d'hydrodiffusion [32].

III.3. 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 [32].

III.3.1. Extraction par des solvants supercritiques

C'est une nouvelle technologie utilisée industriellement qui fait encore l'objet de nombreuses recherches. L'originalité de cette technique repose sur le comportement du solvant utilisé sous des conditions particulières puisqu'au-delà d'un certain point, dit point critique, caractérisé par une température (T_c) et une pression (P_c), les corps purs se trouvent dans un état particulier dit supercritique. Dans leurs conditions d'utilisation, les fluides supercritiques ont une masse volumique voisine de celle des liquides, une viscosité proche de celle des gaz et une diffusivité intermédiaire ; leur polarité est modifiée par rapport à l'état liquide. Leur pouvoir dissolvant dépend fortement de la température et de la pression. Le fluide supercritique le plus utilisé est le dioxyde de carbone. Le CO_2 est

thermodynamiquement stable, insipide, inodore et incolore, il est inflammable mais peut être asphyxiant à haute concentration. Son point critique est de $P_c = 73,6$ bar et $T_c = 31,4$ °C.

Dans cet état, l'extrait devient insoluble dans le CO₂ et précipite au fond de l'enceinte. Le gaz carbonique est ensuite liquéfié et peut être à nouveau utilisé (**Fig. III.7**).

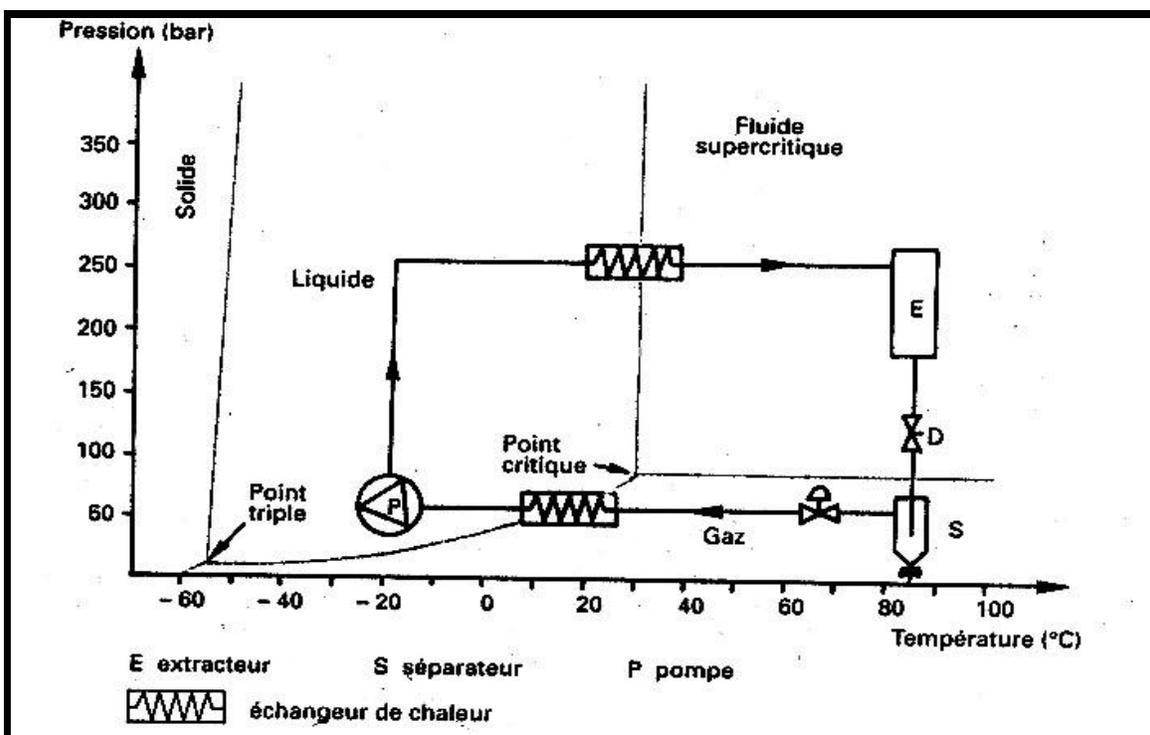


Fig.III.7 : Schéma de principe d'une extraction par CO₂ supercritique [33].

L'extrait récupéré ne contient aucune trace de solvant résiduel qui est facilement éliminé sous forme gazeuse. Le CO₂ est ensuite recyclé et ramené à l'état supercritique. Afin d'extraire les composés les plus volatils dont la composition est de type « huiles essentielles », on utilise des pressions d'extraction modérées (entre 80 et 100 bar). A des pressions plus élevées (200 à 280 bar), on extrait également des composés plus lourds dont la composition est de type « concrètes ». Evidemment selon les conditions opératoires, on peut en théorie obtenir tous les extraits intermédiaires. Le rendement est alors beaucoup plus élevé. Les extractions sont rapides ; il faut compter environ 90 min pour extraire 500 g de matière végétale [33].

Le CO₂ étant une molécule apolaire, il extrait préférentiellement les composés apolaires. Cependant, à des pressions élevées, la polarité du CO₂ augmente et il va extraire des composés de plus en plus polaires. Étant donné que l'on chauffe très peu la matière première, les composés thermosensibles et hydrolysables ne sont pas dégradés. Cependant, le CO₂ présente une certaine acidité, il peut se former de l'acide carbonique, pouvant entraîner une légère hydrolyse acide. L'extrait obtenu par extraction au CO₂ supercritique est un des extraits qui se rapproche le plus de la matière première.

L'extraction au CO₂ supercritique entièrement « verte » semble être viable avec l'ajout de cosolvants qui sont introduits à l'aide d'une pompe à débit constant. L'éthanol et l'eau sont les plus utilisés à cause de leurs polarités comme co-solvants/réactifs intermédiaires, et l'eau dans le domaine compris entre le point d'ébullition et les conditions supercritiques. Ainsi, l'extraction est moins sélective, plus de composés sont extraits, le rendement en est amélioré. D'autres solvants peuvent être utilisés. Cependant, leur utilisation supprime certains avantages majeurs rencontrés lors de l'utilisation du CO₂. En effet, avec un co-solvant, il est possible de perdre des composés volatils lors de l'étape de concentration.

L'appareillage est assez coûteux car il doit pouvoir supporter des pressions allant jusqu'à 300 bar en toute sécurité et permettre ainsi un éclatement des poches à HE et un entraînement des substances aromatiques.

L'extraction aux fluides supercritiques, le plus souvent du CO₂, permet d'extraire des substances odorantes peu volatiles et plus particulièrement les matières sèches qui sont récalcitrantes aux méthodes d'extraction traditionnelles. De ce fait, elle a été utilisée pour extraire les composés aromatisants de nombreux aliments comme des épices, du riz, diverses boissons et du café.

Autre avantage, ce gaz ne pollue pas et est inoffensif car il est recyclé à l'intérieur du système. Les huiles essentielles extraites de cette manière ont l'avantage d'éviter la dégradation thermique associée à la distillation à pression atmosphérique. L'avantage, bien sûr, c'est qu'aucun résidu de solvant ne reste, puisque, aux pressions et températures normales, le CO₂ revient simplement à l'état gazeux et s'évapore.

L'extraction aux fluides supercritiques est donc une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives (méthode d'extraction plus complète et moins dégradante). Le développement de cette technologie continue à s'appuyer sur des traitements et/ou des produits qui n'affectent pas l'environnement et les consommateurs. Le changement des températures et/ou des pressions réduites des fluides critiques offre une profusion d'opportunités, dont un excellent exemple est constitué par l'état critique relatif de l'eau. Par exemple, l'eau sous-critique fournit, légèrement au-dessus de son point d'ébullition, un milieu unique imitant celui des solvants organiques polaires, qui a même été utilisé pour l'extraction des solutés thermiquement labiles ou dans la chimie réactionnelle [33].

III.3.2. Extraction par Détente éclair (flash détente)

La Flash-Détente brevetée par l'INRA en 1993, fut mise au point pour extraire les arômes de bananes, de mangues ou de lichis. La flash détente (**Fig.III.8**), est un procédé multiusage, multi-effets. Cette technique se réalise en deux étapes, la première consiste à étuver la matière végétale à 85 – 90°C par l'utilisation d'une vis à injection de vapeur. La seconde est une détente avec introduction brutale sous vide (environ 30 mbar) du matériel végétal (fruits, légumes, plantes, etc.). La température d'ébullition de l'eau dans ces conditions de vide se situe entre 27 et 30°C. Cette mise sous vide instantanée provoque donc l'évaporation brutale d'une partie de l'eau de constitution du matériel végétal étuvé (environ 10 % de la masse humide initiale) et une chute brutale de la température du milieu. Cette perte d'eau instantanée engendre un broyage fin dû à la création de micro-canaux intercellulaires. Ce bouleversement et cette explosion cellulaire confèrent aux produits des qualités physico-chimiques, rhéologiques et organoleptiques bien particulières. Les eaux d'évaporation sont récupérées séparément par condensation : ces eaux, particulièrement riches en composés volatils aromatiques, sont appelées eaux aromatiques et pourront être réintroduites dans les produits après l'extraction par Flash Détente [34].

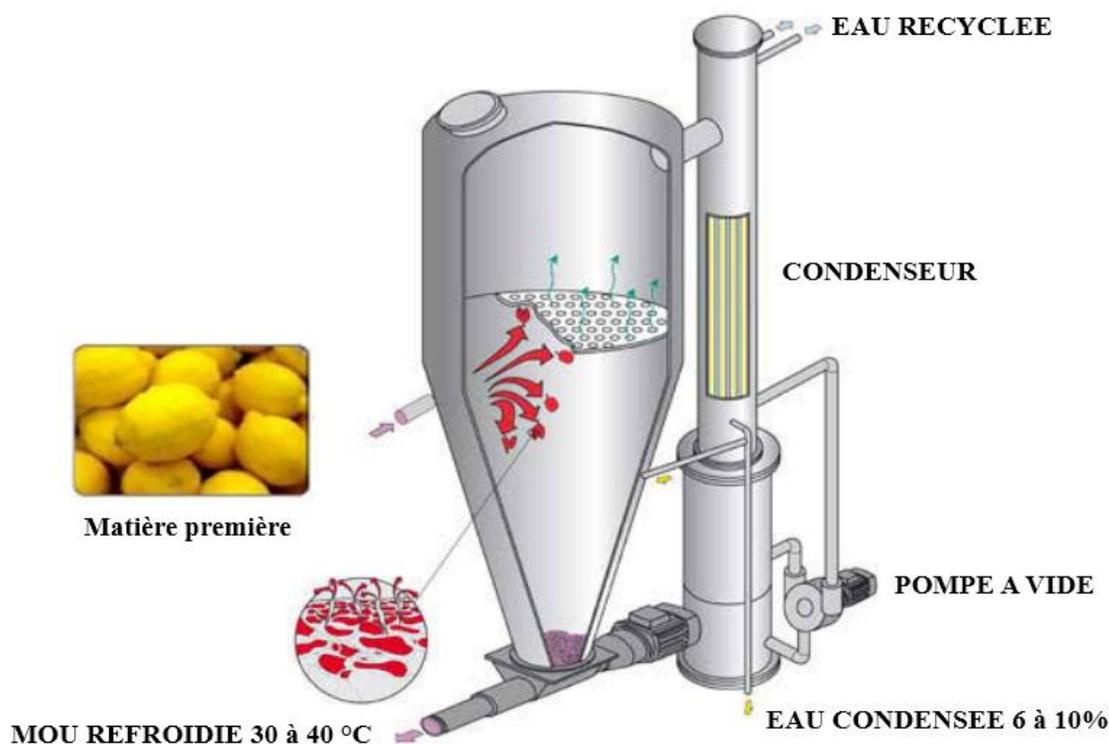


Fig.III.8 : Schéma de l'extraction par Flash Détente [34].

Des essais ont été effectués par le CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement – France) pour l'extraction des huiles essentielles d'écorces d'agrumes (pomelo, orange, mandarine, citron), préalablement étuvées dans la chambre de vide, provoquant l'explosion des glandes à huiles essentielles contenues dans le flavedo. Les huiles seront donc vaporisées simultanément avec une partie de l'eau présente dans les écorces. Après condensation, les huiles seront récupérées sous forme d'émulsion aqueuse, puis purifiées par centrifugation. Les rendements d'extraction obtenus à partir d'écorces de citron, d'orange, de mandarine et de pomelo sont respectivement égaux à 44 %, 29 %, 33 % et 27 %. Après déterpénation, les huiles essentielles extraites par le procédé de Flash-Détente sont de qualité supérieure à celles des huiles fraîchement pressées et ce, avec des proportions relatives supérieures en aldéhydes mono- et sesquiterpéniques.

En plus de l'extraction des huiles essentielles d'agrumes, cette technique permet, de produire simultanément de la purée de fruits (aux propriétés sensorielles renforcées) avec un rendement avoisinant les 75 %. Donc de 1000 kg de fruits introduits nous recevons 750

kg de purée de fruits, 330 kg de drêches de citrons et 100 kg d'eaux aromatiques de citron et d'huiles essentielles. La Flashe Détente présente ainsi d'une part un intérêt technologique et économique en améliorant et en développant les propriétés sensorielles et nutritionnelles des produits qui en sont issus ; et d'autre part un intérêt environnemental par la réduction des volumes transportés, la diminution de la charge organique des effluents et la valorisation de l'alimentation du bétail (digestibilité améliorée et durée de vie accrue) [34].

III.3.3. Détente instantée contrôlée (DIC)

Cette méthode d'extraction est née des études théoriques menées par le Professeur Allaf sur l'expansion par extrusion et suivies de travaux expérimentaux. La Détente Instantanée Contrôlée est fondée sur la thermodynamique de l'instantanéité et des processus d'autovaporisation couplée à l'évolution hydro-thermo-mécanique de nombreux polymères à usages alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, etc. Le traitement par "Détente Instantanée Contrôlée D.I.C." est utilisé en vue d'extraire les arômes et les huiles essentielles à partir de végétaux adéquats naturels ou préalablement séchés. En effet, appliquée aux végétaux, la D.I.C. permet la modification de leur structure, provoquant ainsi leur texturation et facilitant alors les opérations de transfert de matière. L'auto-vaporisation qui accompagne la détente implique la séparation liquide-solide et permet donc l'extraction de composés spécifiques. Cette opération se distingue par un traitement thermique très localisé, durant un temps réduit (quelques dizaines de secondes).

Comparée aux autres procédés traditionnels, la D.I.C. (**Fig.III.9**), est relativement rapide, et donc nettement plus flexible. D'un rendement supérieur, la méthode est comparable à l'extraction par CO₂ supercritique au niveau de la qualité de l'extrait, alors que la consommation énergétique est inférieure à celles de la distillation et par entraînement à la vapeur. Les différents aspects de la qualité sont ainsi couplés : ceux du produit fini, ceux du procédé et ceux de son impact environnemental :

- *Vecteur qualité* : Améliorer la qualité de l'extrait obtenu par élimination de la dégradation thermique et de la présence de solvants résiduels.

- *Vecteur environnemental* : Réduire les rejets de solvants, d'eau usée et de matières résiduelles.
- *Vecteur énergétique* : Réduire la consommation énergétique nécessaire à l'extraction des huiles essentielles [35].

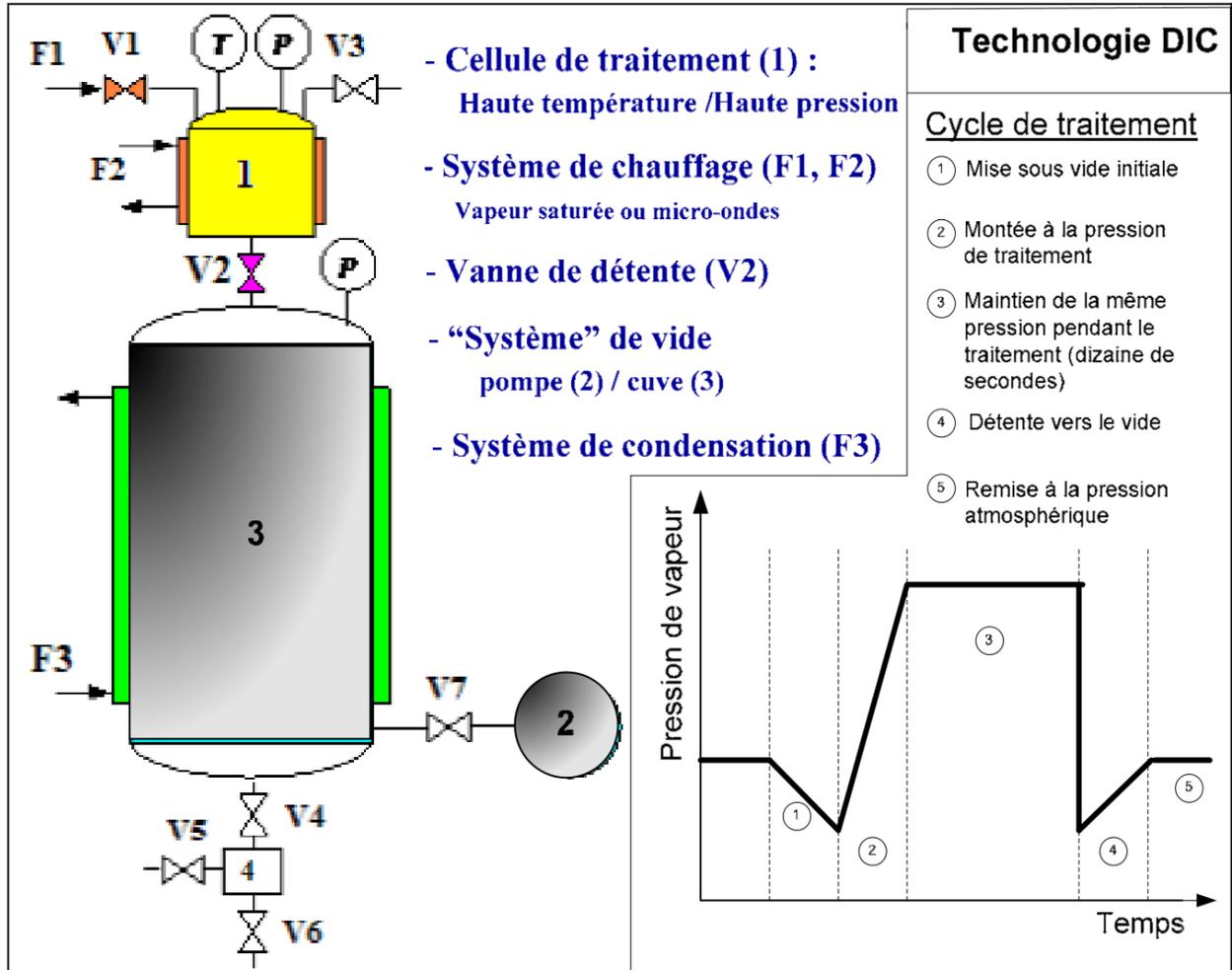


Fig.III.9 : Schéma d'une unité de Détente Instantanée Contrôlée (DIC) et son cycle de traitement. La Détente Instantanée Contrôlée (DIC) trouve des applications diverses dans le séchage des fruits et légumes, et dans la décontamination microbienne. Elle offre également des avantages économiques (vitesse, coût), et qualitatifs (stérilisation, qualités organoleptiques, contenu en vitamines) [35].

III.3.4. Extraction par ultrasons

L'extraction des composés bioactifs par ultrasons (20 – 100 kHz) est une technique émergente qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant. Elle est facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie. En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatique ou des HEs de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique [36].

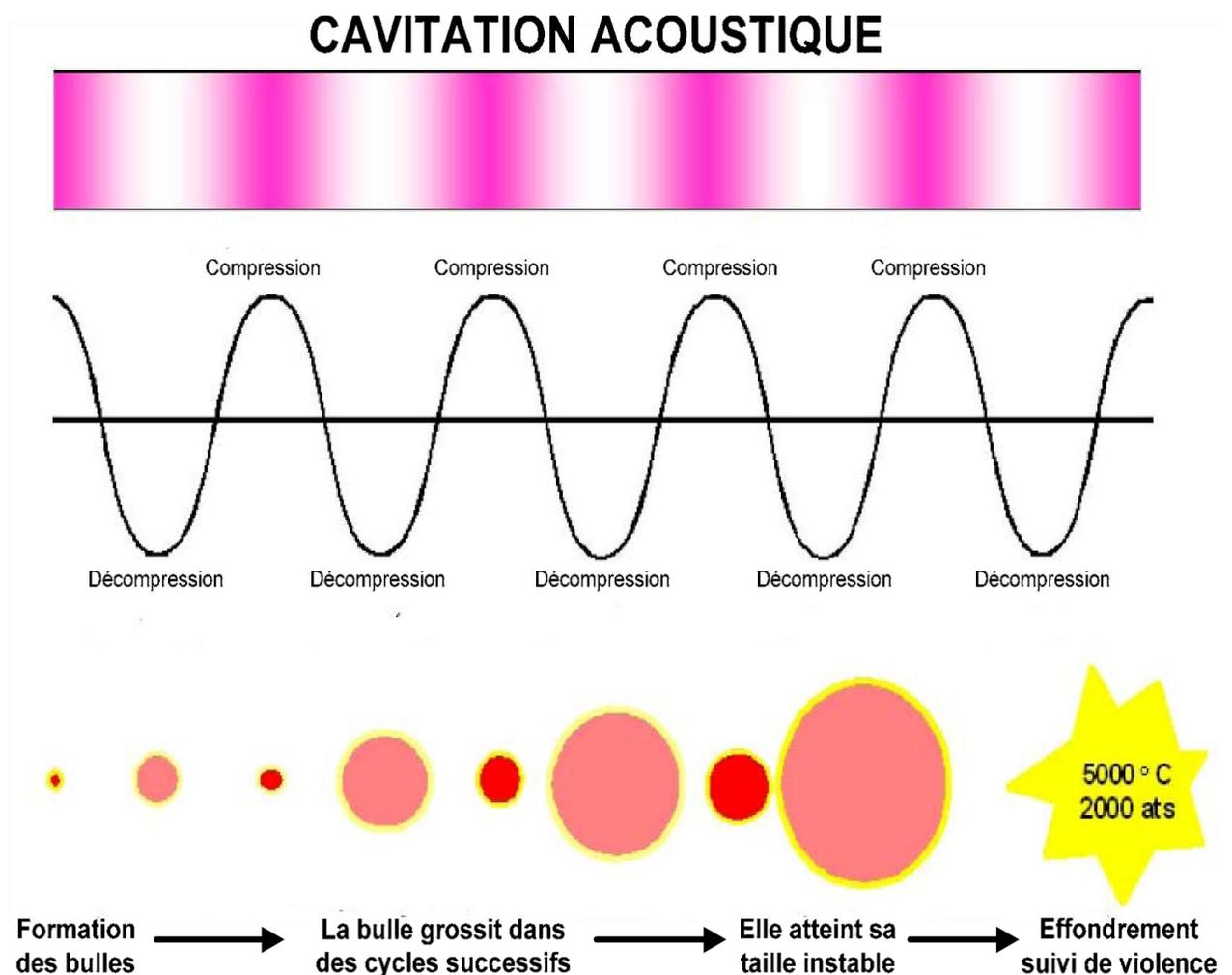


Fig.III.10 : Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore [36].

Pendant la sonication, les ondes sonores utilisées induisent des vibrations mécaniques dans le solide, le liquide ou le gaz, à travers une succession de phases d'expansion et de compression, comme au cours d'un phénomène de cavitation. Les bulles, formées par l'expansion, vont se développer puis dégonfler. Si ces bulles se situent près d'une surface solide, alors le dégonflement sera asymétrique, ce qui produira des jets de liquide ultra-rapides (**Fig.III.10**) [36].

D'après Vinatoru [36], les mécanismes d'extraction impliquent deux phénomènes physiques :

- Les molécules peuvent parfois traverser la paroi cellulaire par simple diffusion ;
- Le contenu des cellules peut être « lessivé » après destruction des parois cellulaires, afin de récupérer l'ensemble des composés d'intérêt

Les ultra-sons permettent d'améliorer ces deux phénomènes. Ils pourraient augmenter le rendement, diminuer la quantité de solvant nécessaire et/ou le temps de traitement [36].

III.3.5. Extraction assistée par micro-ondes

Les rayonnements micro-ondes sont des ondes électromagnétiques qui se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière. Elles sont caractérisées par une fréquence comprise entre 300 MHz et 30 GHz, c'est-à-dire par une longueur d'onde comprise entre 1 m et 1 cm. Sur le spectre électromagnétique(**Fig.III.11**), elles sont situées entre les radiofréquences et les infrarouges [37].

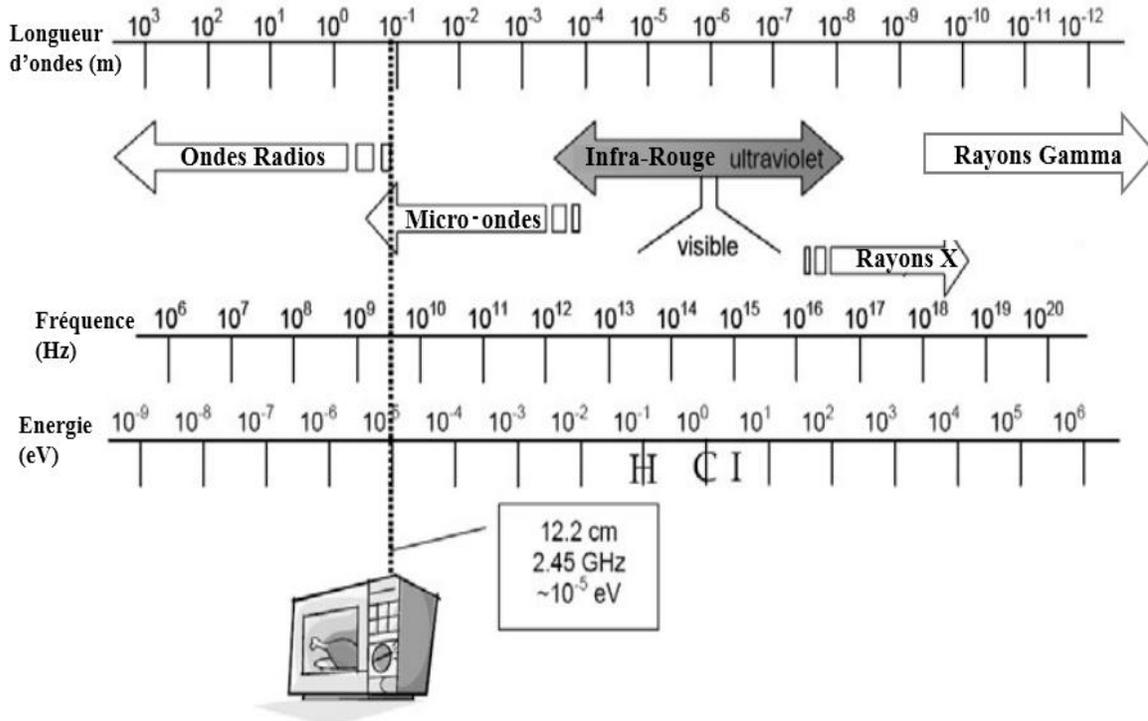


Fig.III.11 : Spectre électromagnétique [37].

Les fréquences utilisables par les applications industrielles des micro-ondes sont réglementées pour éviter le risque d'interférence avec la radiocommunication et les radars, qui sont les principales utilisations des micro-ondes. La fréquence de 2,45 GHz ($\lambda = 12,2$ cm) est généralement utilisée. Le transfert de chaleur par micro-ondes représente une propriété intéressante et est donc utilisé dans le domaine de l'extraction des huiles essentielles. En effet, contrairement à un chauffage classique, c'est le produit traité qui est la source de chaleur. Le dégagement de chaleur s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur, tout le contraire d'un chauffage classique. Il n'est alors plus nécessaire de faire chauffer le récipient. Le matériel végétal est chauffé de manière directe. Cela est rendu possible par la rotation dipolaire. Le champ magnétique haute fréquence (2,45 GHz) appliqué dans le four micro-ondes permet un échauffement, un frottement entre les dipôles, qui conduit ensuite à un dégagement de chaleur [37].

III.3.5.1. Extraction par solvant assistée par micro-ondes

La méthode d'extraction par solvant assistée par micro-ondes a été mise au point par l'équipe canadienne de. Celle-ci a déposé le premier brevet européen sur « l'extraction de

produits naturels assistée par micro-ondes ». Ces auteurs proposaient de traiter sous micro-ondes un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant partiellement ou totalement transparent aux micro-ondes qui permettent d'accélérer la cinétique d'extraction et de réduire le ratio solvant/charge [38].

Des essais effectués par cette nouvelle technique - notamment sur la menthe -, ont souligné le gain de temps ainsi que la similitude de la qualité des produits à ceux obtenus par entraînement à la vapeur classique. De nombreux brevets seront déposés alors par Paré et son équipe tant au niveau américain qu'au niveau européen. Le procédé original sera par la suite quelque peu modifié et enrichi et sera dénommé : MAPTM (Microwave Assisted Process). Il a pour vocation d'être une méthode d'extraction utilisable pour un grand nombre de matrices solides ou liquides telles que les végétaux mais aussi les tissus animaux, les sols, les cosmétiques ou les eaux polluées. Actuellement l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave Assisted Extraction) est actuellement très généralement citée dans la littérature. En réalité, la MAE et MAPTM sont toutes deux des techniques d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. A titre d'exemple, un pilote d'extraction des épices et aromates par la technique MAPTM est présenté dans la **Fig.III.12** [38].

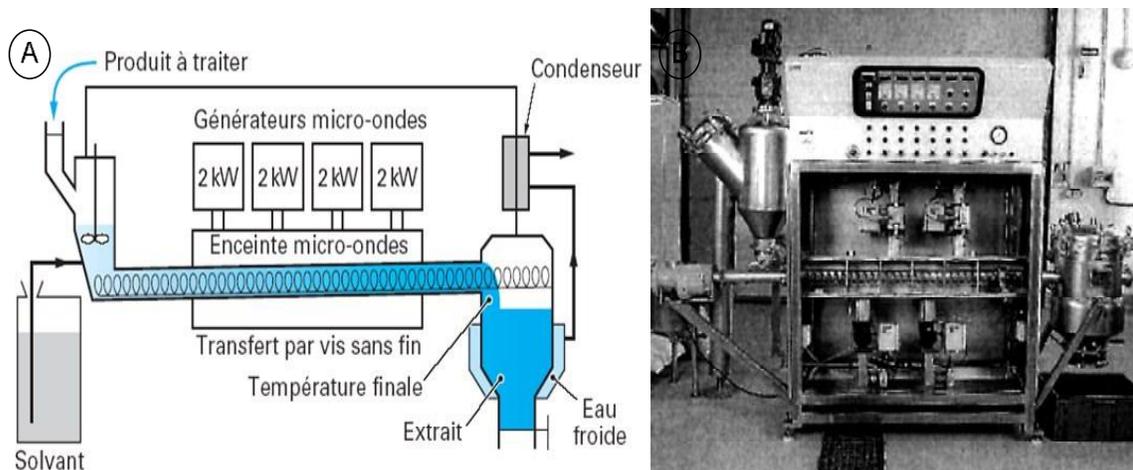


Fig.III.12 : Schéma du procédé d'extraction MAPTM en continu (A) et photo d'une unité pilote du même procédé (B) [38].

III.3.5.2. Entraînement à l'air assisté par micro-ondes

Craveiro [39], ont proposé une technique originale d'extraction de l'huile essentielle de Lippiasidoides par chauffage micro-ondes sans solvant en utilisant un compresseur à air. L'huile essentielle extraite en 5 minutes sous chauffage microondes était présentée comme qualitativement identique à celle obtenue en 90 minutes par entraînement à la vapeur. Le système proposé est inspiré du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau classique. Il se compose en fait de trois parties : un compresseur envoyant de l'air dans le ballon où se trouve la matière végétale placée dans un four micro-ondes domestique, comme le montre la **Fig.III.13**.

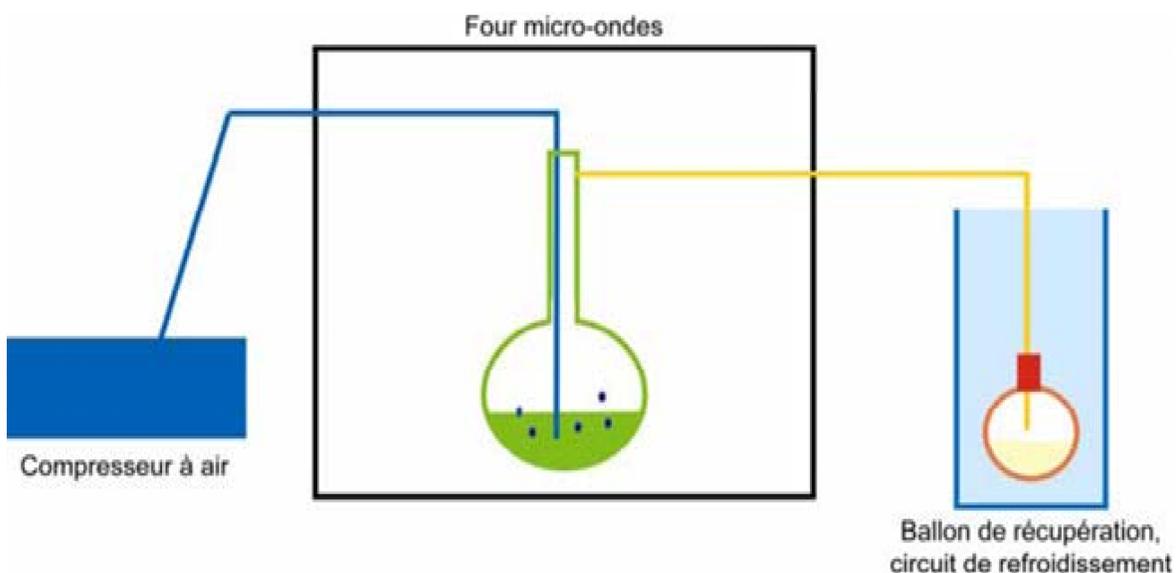


Fig.III.13 : Schéma du procédé d'extraction par entraînement à l'air assisté par micro-ondes [39].

III.3.5.3. Hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite

Le procédé « VMHD » ou Vacuum Microwave Hydro Distillation a été élaboré et breveté par la société Archimex dans les années 1990, avant d'être racheté par l'équipementier Pierre Guérin. Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Le matériel végétal traité, frais ou sec (auquel cas on lui rajoute la quantité d'eau requise) est soumis d'une part aux micro-ondes dont le rôle est d'assurer le transfert de matière, puis d'autre part à un vide

pulsé qui permet l'entraînement azéotropique des substances volatiles à une température inférieure à 100°C. Cette opération peut être répétée plusieurs fois selon le rendement souhaité. D'après les concepteurs du VMHD (**Fig.III.14**), l'extraction serait, pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique, dix fois plus rapide que l'hydrodistillation. Les notes « crues », les plus thermosensibles, semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique [40].

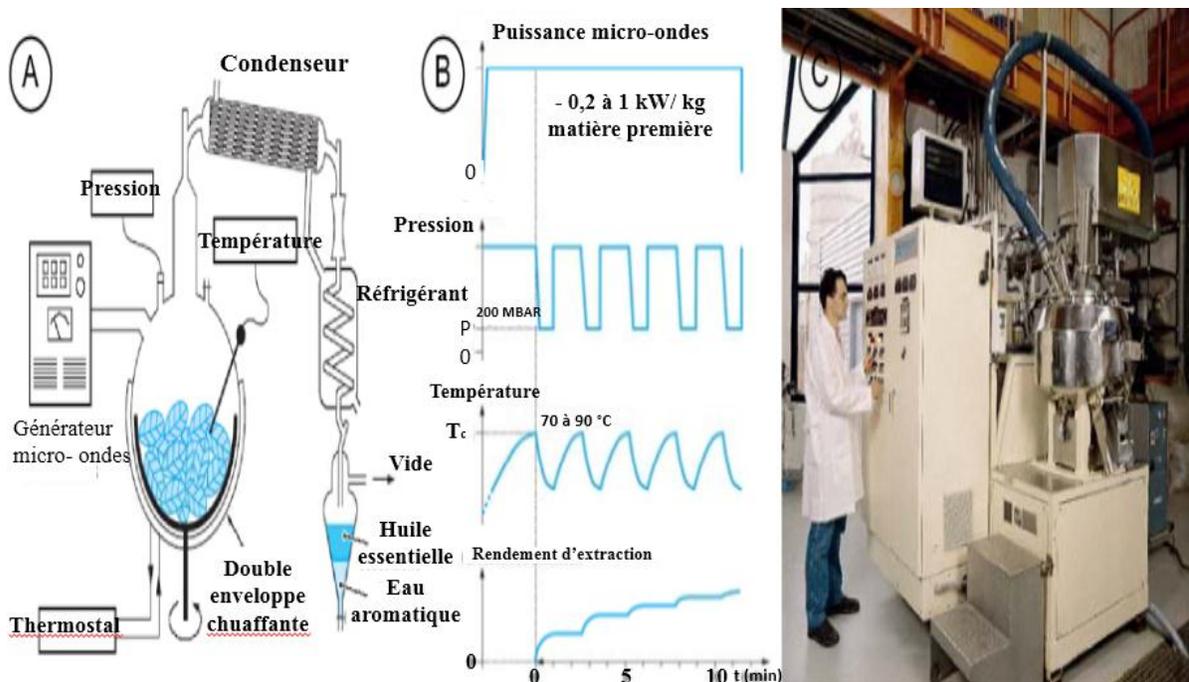


Fig.III.14 : Schéma du procédé VMHD (A), Evolution des principaux paramètres (B), Photo d'une unité pilote du procédé VMHD (C) [40].

III.3.5.4. Hydrodistillation assistée par micro-ondes

Récemment, utilisent un procédé d'hydrodistillation par microondes. Ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes (**Fig.III.15**). Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des HEs sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités par ces auteurs sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique [40].

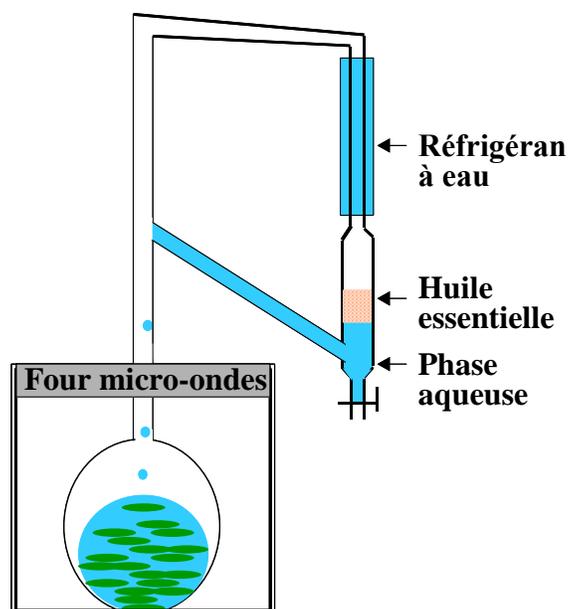


Fig.III.15 : Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes [40].

III.3.5.5. Procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM)

En 2004, une méthode originale d'extraction des produits naturels assistée par micro-ondes à pression atmosphérique, sans solvant et sans eau a été développée et brevetée. Basée sur un principe relativement simple, cette méthode décrit une distillation sèche assistée par micro-ondes qui consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes contenant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite à partir de l'eau de la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal (**Fig.III.16**). La distillation sèche assistée par micro-ondes, a été appliquée à deux types de plantes, les épices, et les herbes aromatiques. Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction les rendements en huiles essentielles obtenus par ESSAM sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation. D'un point de vue qualitatif, on retrouve dans les huiles essentielles obtenues par ESSAM une proportion plus importante de composés oxygénés, les plus valorisables sur le plan olfactif [40].

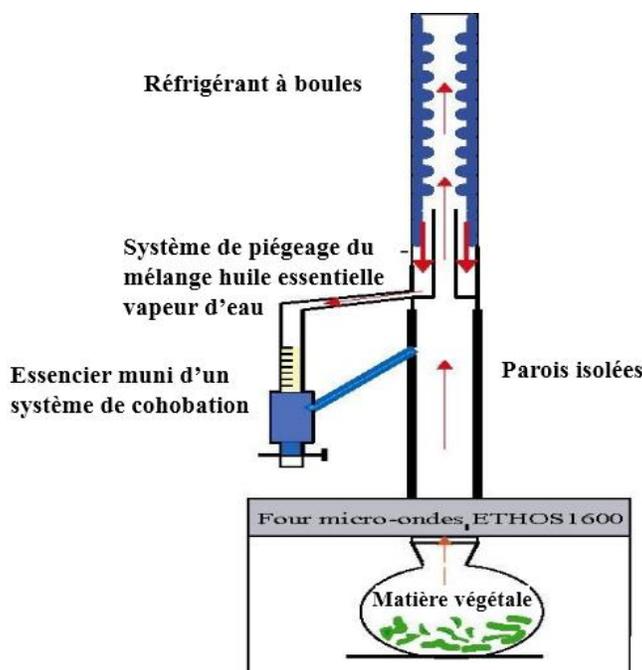


Fig.III.16 : Schéma du procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM) [40].

III.4. Situation économique des huiles essentielles

Les quantités d'huiles essentielles produites dans le monde varient considérablement. La production annuelle de quelques huiles essentielles dépasse 35 000 tonnes tandis que d'autres ne peuvent atteindre que quelques kilogrammes. Certains chiffres d'estimation de la production, en tonnes, basées sur l'année 2004 sont indiqués dans le **Tableau.III.2**. De même, de grandes variations se produisent également pour la valeur monétaire des différentes huiles essentielles. Les prix varient de 1,80 \$ US/kg pour l'huile d'orange à 120 000,00 \$ US/kg pour l'huile d'iris. La valeur annuelle totale du marché mondial est de l'ordre de plusieurs milliards de dollars US.

La production d'huiles essentielles à partir des plantes sauvages ou des plantes cultivées est possible presque partout, sauf dans les pays les plus froids du monde et les régions couvertes de neige en permanence. Le nombre global des espèces végétales est de l'ordre de 300 000. Environ 10% d'entre elles contiennent des huiles essentielles et pourraient être utilisées comme bases pour leur production. Tous les continents possèdent leurs propres flores caractéristiques. Parfois, ces plantes peuvent être limitées à une zone géographique

particulière, comme Santalum album en Inde et au Timor en Indonésie, Pinus mugo dans les Alpes européennes, ou Abies sibirica à la CEI [Communauté des Etats Indépendants (ex-Russie)]. Pour de nombreux pays, principalement en Afrique et en Asie, la production d'huile essentielle est leur principale source d'exportation. Pour l'Indonésie, le Sri Lanka, le Vietnam, et même l'Inde, les chiffres d'exportation d'HE sont très élevés [41].

Tableau.III.2 : Production mondiale des plus importantes huiles essentielles [41].

Huiles essentielles	Production en Tonnes	Principaux pays producteurs
Huile d'Orange	51 000	Etats-Unis, Brésil, Argentine
Huile de Mentha arvensis (<i>7des champs</i>)	32 000	Inde, Chine, Argentine
Huile de Citron	9 200	Argentine, Italie, Espagne
Huile d'Eucalyptus	4 000	Chine, Inde, Australie, Afrique du Sud
Huile de Mentha Piperita	3 300	Inde, Etats-Unis, Chine
Huile de Feuilles de Clous de Girofle	1 800	Indonésie, madagascar
Huile de Citronnelle	1 800	Chine, Sri Lanka
Huile de Menthe Verte	1 800	Etats-Unis, Chine
Huile de Cèdre	1 650	Etats-Unis, Chine
Huile de Listée (Listeacubeba)	1 200	Chine
Huile de Patchouli	1 200	Indonésie, Inde
Huile de Lavandin Grosso	1 100	France
Huile d'Eucalyptus citronné (<i>Corymbiacitriodora</i>)	1 000	Chine, Brésil, Inde, Vietnam

Les principaux pays producteurs se trouvent dans tous les continents. En Europe, le cœur de production se trouve dans les pays méditerranéens : Italie, Espagne, Portugal, France, Croatie, Albanie et Grèce, qui produisent tous des huiles essentielles en quantités industrielles. Sans oublier de mentionner les pays d'Europe centrale tels que, la Bulgarie, la Roumanie, la Hongrie et l'Ukraine, l'immense Fédération de Russie, répartie sur une grande partie de l'Europe de l'Est et de l'Asie du Nord, a non seulement des ressources de plantes sauvages presque infinies mais aussi de vastes zones de terres cultivées. Le continent asiatique avec la diversité de ses climats semble être le plus important producteur d'huiles essentielles. La Chine et l'Inde jouent un rôle majeur suivies de l'Indonésie, le Sri Lanka et le Vietnam. Beaucoup d'huiles essentielles uniques et insolites proviennent de l'immense continent australien et de ses voisins : la Nouvelle-Zélande et la Nouvelle-Calédonie. Les principaux pays producteurs d'HE en Afrique sont le Maroc, la Tunisie, l'Égypte, l'Algérie et la Côte d'Ivoire. Les pays qui jouent un rôle mineur sont l'Afrique du Sud, le Ghana, le Kenya, la Tanzanie, l'Ouganda et l'Éthiopie. Les plus importantes îles productrices d'épices : Madagascar, les Comores, Mayotte, la Réunion sont situées le long de la côte Est du continent africain. Le continent américain est également l'un des plus grands producteurs d'huiles essentielles. Les États-Unis, le Canada et le Mexique possèdent une richesse en matières végétales naturelles et aromatiques. En Amérique du Sud, les huiles essentielles sont produites au Brésil, en Argentine, au Paraguay, en Uruguay, au Guatemala, et dans l'île d'Haïti. Outre les principaux pays producteurs d'huiles mentionnés ci-dessus, il y en a beaucoup d'autres, moins importants, comme l'Allemagne, Taiwan, le Japon, la Jamaïque, et les Philippines. La **Fig.III.17**, montre les principaux pays producteurs d'huiles essentielles à travers le monde [41].

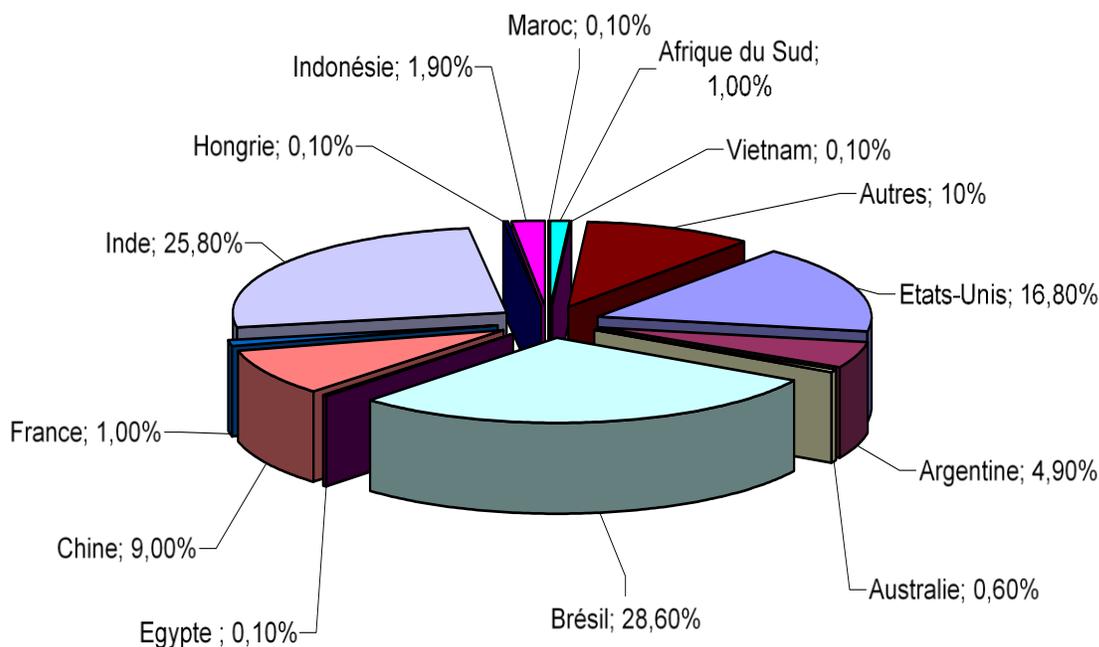


Fig.III.17 : Répartition des taux de production d'HE (en parties estimées) par pays à travers le monde durant l'année 2008 [41].

La culture des plantes aromatiques a changé de site géographique au cours des deux derniers siècles. De 1850 à 1950, les centres de la culture commerciale des plantes à huiles essentielles étaient la Provence en France, l'Italie, l'Espagne et le Portugal. Avec l'augmentation du coût de la main d'œuvre, la culture s'est déplacée vers les régions méditerranéennes de l'Afrique du Nord.

Comme la récolte manuelle s'est avérée d'un coût trop élevé sous les conditions européennes, et que des améliorations très nettes ont été apportées dans la conception de machines de récolte, seules les cultures pour les HE qui se prêtaient à la récolte mécanique ont continué à être poursuivies en Europe. Au début des années 1990, même les récoltes en plantes aromatiques en Afrique du Nord se sont avérées très coûteuses et les centres de ces cultures ont dû être délocalisés en Chine et en Inde. A l'heure actuelle, les méthodes manuelles ont tendance à s'avérer trop coûteuses même en Chine. De ce fait, actuellement, seule l'Inde demeure un centre de développement des cultures de plantes à parfum [41].

Chapitre IV

Matériel et méthode

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

Notre travail est porté sur l'extraction et la caractérisation physico-chimique de l'huile essentielles de la menthe poivrée récolté dans la région d'Ain-Defla durant les mois de mais et juin.

L'ensemble de ce travail a été réalisé au laboratoire de génie des procédés de la faculté des sciences et technologie et laboratoire de recherche de l'Université Djilali BOUNAAMA de Khemis Miliana (Wilaya de Ain Defla).

IV.1. Matériels

IV.1.1. Préparation du matériel végétal

L'extraction de l'huile essentielle est réalisée à partir des feuilles de menthe fraîches et des feuilles séchées.

IV.1.2. Séchage de la plante

Les feuilles de menthe fraîches sont rincées plusieurs fois avec de l'eau de robinet puis à l'eau distillée, elles sont ensuite séchées pendant 5 jour à l'air libre et à l'ombre puis stockées à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.



Fig.IV.1 : Séchage des feuilles de menthe.

IV.2. Extraction par l'hydrodistillation

L'hydrodistillation est réalisée avec un extracteur de type cleverger.

IV.2.1. Montage de l'hydrodistillation

Le chauffe-ballon est placé sur un support élévateur en position haute. Le système refroidissant est fixé à un support à l'aide d'une pince et d'une noix et à son extrémité est placée une allonge de distillation. On utilise des clips pour maintenir assemblées les deux pièces en verre (**Fig.IV.2**).



Fig.IV.2 : Montage d'hydrodistillation.

IV.2.2. Protocole d'extraction

On pèse 30g de feuilles de menthe séchées et écrasées dans un ballon de 1L, on ajoute 750 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition à l'aide du chauffe ballon pendant 3 h.

Les vapeurs chargées d'huile essentielle traversent le serpentin de refroidissement et se condensent. Puis elles sont récupérées dans une ampoule à décanter. Deux phases se forment :

- Une phase organique : elle est huileuse et très parfumée, c'est l'huile essentielle.
- Une phase aqueuse : l'hydrolat ou l'eau aromatique, elle est légèrement parfumée et contient les mêmes composés que l'EH mais en très petite quantité.

IV.2.3. Conservation de l'huile essentielle

Les HE sont sensibles à la température et à la lumière. C'est pour cela qu'on a conservé notre huile à une température voisine de 4°C et à l'abri de la lumière, enveloppée de papier d'aluminium, jusqu'à son usage pour éviter toute dégradation.

IV.3. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses de l'huile essentielle et de la matière végétale séchée. Il est exprimé en pourcentage (%).

$$R_{HE} = \frac{MHE}{MVS} * 100 \dots \dots \dots (eq.IV.1)$$

Où :

R_{HE} : Rendement en huile essentielle (%) ;

MHE : Masse de l'huile essentielle (g) ;

MVS : Masse de la matière végétale sèche (g).

IV.4. Détermination du taux d'humidité

L'humidité relative d'un solide appelé aussi le titre en eau, ou bien la teneur en eau à base humide s'exprime par la masse de liquide contenue dans le produit par rapport à sa masse humide selon la formule suivante :

$$H (\%) = \frac{mef - mes}{mef} * 100 \dots \dots \dots (eq.IV.2)$$

Où :

H (%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage ;

mef : Poids de l'échantillon frais (g) ;

mes : Poids de l'échantillon sec(g).

IV.5. Etude de la cinétique d'extraction

L'étude de la cinétique d'extraction a pour but de déterminer le temps nécessaire au bout duquel il n'est plus rentable de poursuivre l'extraction, qualifié par le rendement maximum. Donc, la cinétique est le suivi de l'évolution de la quantité d'huile essentielle extraite en fonction du temps. Pour cela et afin d'illustrer la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de la menthe poivrée par hydrodistillation on a suivi la variation de la masse d'huile essentielle en fonction du temps jusqu'à l'extraction de la quasi-totalité d'huile essentielle.

IV.6. Caractérisation de l'huile essentielle

Afin de caractériser l'huile essentielle de menthe obtenue, nous avons vérifié plusieurs paramètres :

- Paramètres organoleptiques tels que l'odeur, l'aspect et la couleur.
- Paramètre physico-chimique : l'indice de réfraction, la densité, l'indice d'acide, l'indice d'ester et le pH
- Détermination de la composition chimique de l'HE par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).

IV.6.1. Analyse physique

IV.6.1.1. L'indice de réfraction

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses. Plus la lumière est ralentie, plus la matière a un indice de réfraction élevé. L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement élevé. Il est supérieur à ceux de l'eau à 20°C = 1.3356, et de l'huile d'olive à 20°C = 1.4684. Ceci montre leur richesse en composants qui dévient la lumière polarisée.

L'appareil employé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre (**Fig.IV.3**) qui est un instrument optique servant à déterminer l'indice de réfraction d'une substance c'est-à-dire la mesure dans laquelle la lumière est déviée en traversant la substance.

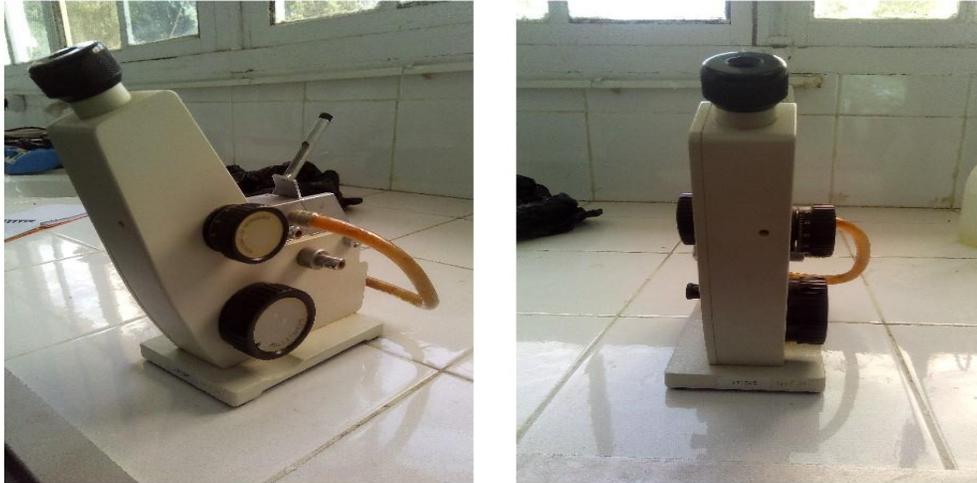


Fig.IV.3 : Le réfractomètre

IV.6.1.2. Mesure de pH

Le pH exprimé par une valeur numérique, indique si une solution est acide ou basique, il représente aussi la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse [42]. La détermination du pH est effectuée à l'aide d'un papier pH au lieu d'un pH mètre en raison de l'insuffisance du produit (huile essentielle). Nous mesurons le pH de l'HE de la plante par papier pH.



Fig.IV.4 : Mesure de pH.

IV.6.1.3. Mesure de la densité

La densité est le rapport entre la masse d'un volume d'un liquide ou d'un solide et la masse d'un même volume d'eau.

$$d = \frac{m_h}{m_e} \dots\dots\dots (eq.IV.3)$$

Où :

m_h : masse d'huile(g) ;

m_e : masse d'eau distillé (g) ;

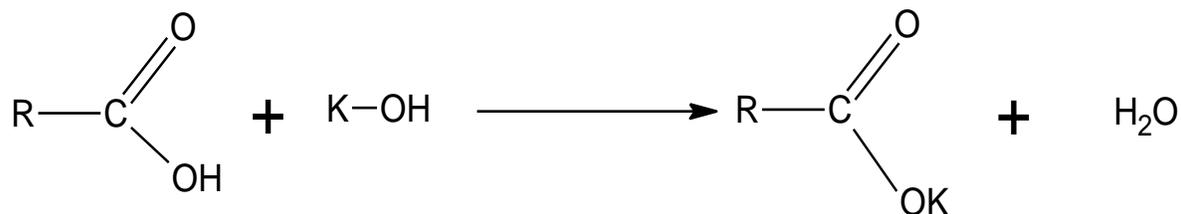
d : densité relative.

IV.6.2. Analyse chimique

IV.6.2.1. L'indice d'acide

L'indice d'acide (IA) est la masse d'hydroxyde de potassium (KOH), exprimée en milligrammes, nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenue dans un gramme de substance.

Le principe consiste à neutraliser des acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.



Mode opératoire

Le mode opératoire consiste à peser avec précision 0,5 g d'HE que l'on dissout dans 5 ml d'éthanol puis on ajoute 5 gouttes de phénol phtaléine, en suite on neutralise le liquide avec la solution de KOH éthanolique (0,1N) contenu dans une burette. Nous poursuivons l'addition jusqu'à l'obtention du virage persistant de la solution (rose) (**Fig.IV.5**), nous notons ensuite le volume de la solution de KOH utilisé.

Calcul de l'indice d'acide :

$$\mathbf{Ia} = M_{\text{KOH}} * \mathbf{N} * (\mathbf{V}_{\text{eq}} / \mathbf{m}_h) \dots \dots \dots (\text{eq.IV.4})$$

Ia : l'indice d'acide ;

M_{KOH} : la masse moléculaire de KOH ;

N : la normalité de KOH ;

V_{eq} : le volume de KOH ;

m_h : la masse d'huile essentielle.



Fig.IV.5 : Analyse de l'indice d'acide.

IV.6.2.2. L'indice d'ester

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile.

Le principe consiste en l'hydrolyse des esters par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium, et puis le dosage de l'excès par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

Mode opératoire

Le mode opératoire consiste à introduire dans un ballon 0,5g de HE et 10ml de KOH éthanolique de (0,1N) ; Adapter le réfrigérant et placer le ballon sur un bain marie pendant une heure. Après refroidissement, on ajoute 10 ml d'eau distillé. L'excès du KOH est neutralisé par l'acide chloridrique HCl 0,5N en présence de phénol phtaléine.

L'indice d'ester (I_E) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_e = \left(\frac{2}{m}\right) * (V_0 - V_1) - I_A \dots \dots \dots (eq.IV.5)$$

I_E : l'indice d'ester ;

V_0 : volume en ml de la solution d'HCl (0.1N) mesure pour l'essai de blanc ;

V_1 : volume en ml de la solution d'HCl (0.1N) mesuré pour le calcul de I_E ;

m : masse en g de la prise d'essai ;

I_A : valeur d'indice d'acide.

IV.6.2.3. L'indice de saponification

L'indice de saponification (IS) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et la saponification des esters présents dans 1 gramme de substance.

L'indice de saponification est donné par la formule suivant :

$$I_S = I_A + I_E \dots \dots \dots \text{(eq.IV.6)}$$

I_S : l'indice de saponification ;

I_E : l'indice d'ester ;

I_A : l'indice d'acide.

IV.6.2.4. Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CG/SM est, aujourd'hui, la technique d'analyse de référence (**Fig.IV.6**).

L'analyse de notre huile essentielle a été effectuée au laboratoire de l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana. Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un Agilent 6890, suivi d'un spectromètre de masse type Agilent 5975B à quadripôle de tension d'ionisation de 70 eV. La colonne utilisée est une HP-5MS ; 5% Phenyl Methyl Siloxane d'une longueur de 30 m et d'un diamètre interne égale à 0,25mm. L'épaisseur du film étant de 0,25 μm .

Les conditions opératoires sont :

- La température de l'injecteur (mode split 1 :50) : 250°C

- La programmation de température : de 50 °C à 300 °C à raison de 2°C/min ;
- Le gaz vecteur utilisé est l'Hélium avec un débit de 0.8 ml/min.
- Les températures de la source du quadripôle sont fixées, respectivement, à 230 °C et à 150 °C.



Fig.IV.6 : Photo représente l'appareil CG/SM [43].

Principe de la méthode

Le principe de séparation repose sur une différence de répartition des composés d'un mélange entre deux phases, la phase mobile et la phase stationnaire (imprégné dans la colonne). Les composants du mélange injecté dans la colonne et poussé dans celle-ci par le gaz vecteur interagissent différemment avec la phase stationnaire et de ce fait leur progression dans la colonne ne se fera pas à la même vitesse. Ce phénomène d'interaction provoque ainsi la séparation des constituants du mélange. Un système de détection adéquate en sortie de colonne permet de créer un signal qui est enregistré sous forme de "pics chromatographiques" [44].

La combinaison de ces deux techniques d'analyses CG/MS permet de séparer les composants de l'échantillon et d'identifier chaque composant, donc de faire une analyse complète aussi bien qualitative que quantitative du produit à analyser. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (I_r) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres.

L'avantage d'un couplage en chaîne d'une interface chromatographique avec un spectromètre est la possibilité d'analyser le spectre individuel d'un composé. Il s'agit de la technique la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielle en raison en grande partie de la facilité de prise en main des systèmes de séparation.

IV.6.2.5. Activité anti-reflux

Le reflux gastro œsophagien (RGO) est un phénomène intermittent qui survient chez certain sujet. Il a été montré que l'apparition du RGO est influencée par des facteurs alimentaires, certaines hormones et certains médicaments, les graisses, le chocolat, la caféine et l'alcool [45]. Ces effets sont à la base de recommandations hygiéno-diététiques classiques dans le traitement du RGO mais dont l'utilité est de plus en plus contestée [46].

La propriété anti-reflux d'un médicament se traduit par sa capacité de formation d'un radeau sous forme d'un gel visqueux qui surnage au niveau du contenu gastrique et protège la muqueuse œsophagienne lors des épisodes de reflux.

En vue de déterminer la capacité de formation du radeau de notre huile essentielle, on introduit 7.5 ml d'acide chlorhydrique (HCl) 0.1M dans un bécher à une température de 36.5 à 37.5 °C dans un bain-marie, en prenant la précaution d'ajuster le volume d'eau du bain au même niveau que celui de l'acide dans le bécher. Mettre 1 ml d'HE au centre du bécher, après 30 min, un radeau flottant est observé au niveau du bécher.

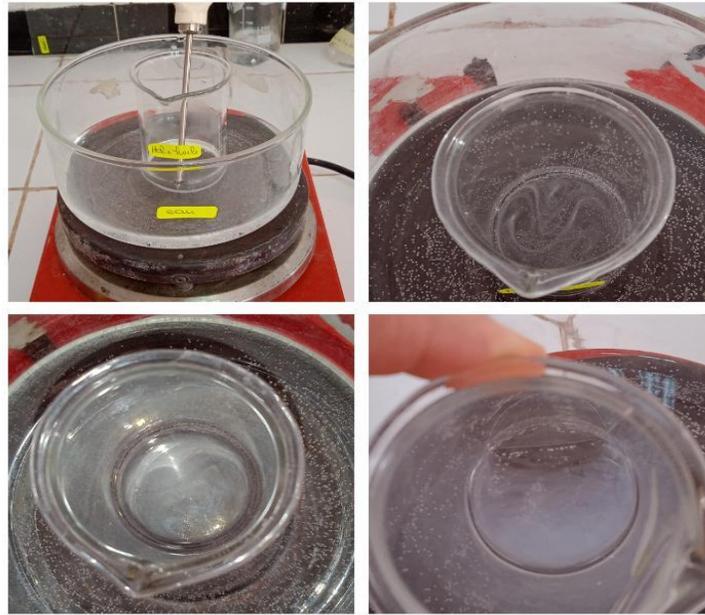


Fig.IV.7 : Photos de l'activité anti-reflux.

IV.6.2.6. Activité antiacide

L'activité antiacide est assurée par la neutralisation de l'acide gastrique. Pour cela, on a effectué une étude du profil de neutralisation du produit de référence.

Le test du profil de neutralisation in vitro simule l'effet de l'huile essentielle au niveau de l'estomac en présence de la sécrétion gastrique. Elle s'effectue en insérant une goutte d'huile essentielle chaque 5 minutes dans un bécher contenant 20 ml d'acide chlorhydrique (HCl ; 0.1M), avec une agitation continue. Le contrôle du pH est effectué en fonction du temps.

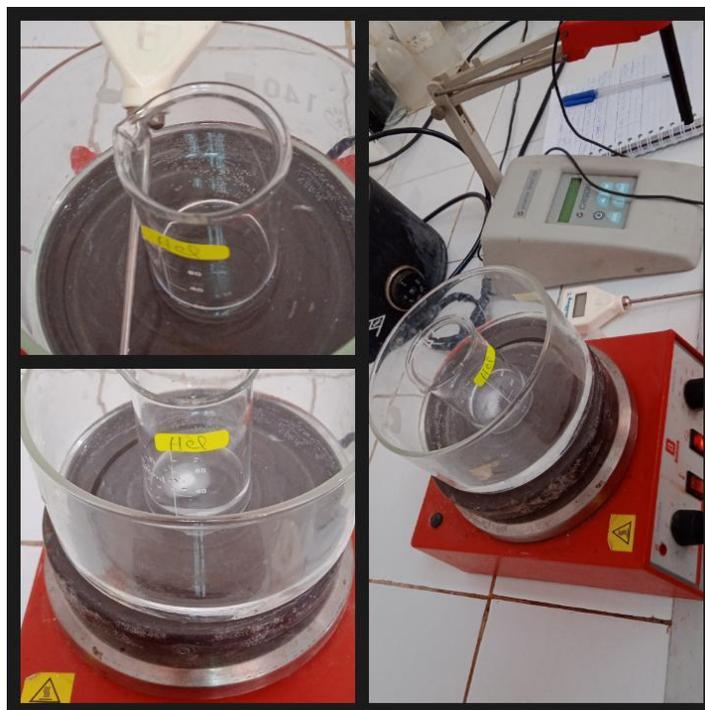


Fig.IV.8 : Photos de l'activité antiacide.

IV.6.3. Analyse biologique

IV.6.3.1. Evaluation de l'activité antioxydant (méthode de DPPH)

Les antioxydants sont définis comme « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ».

Le test de DPPH est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles très riches en composés phénoliques [47].

Principe

Le composé chimique DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. La réduction du radical DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de composés phénoliques. Le radical synthétique DPPH initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie à l'antioxydant. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres

indépendamment de toutes activités enzymatiques. Ce test permet alors d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de différentes substances phénoliques des extraits [48].

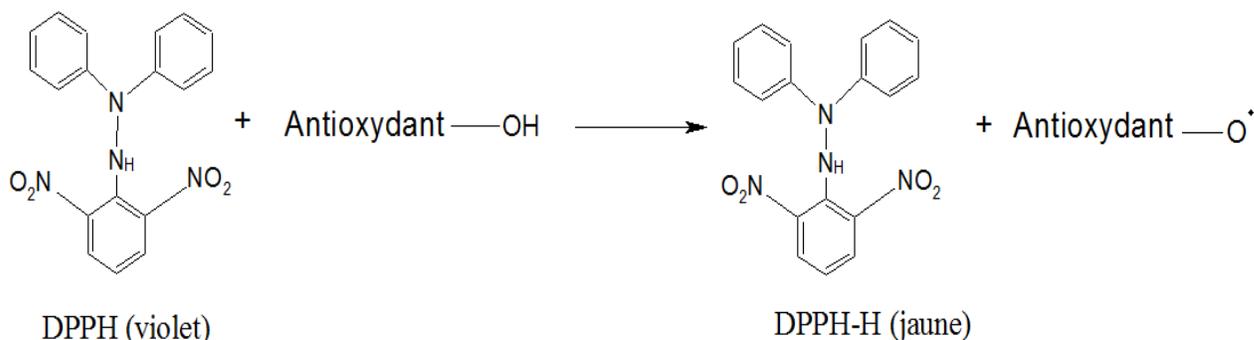


Fig.IV.9 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [48].

La mesure de la décroissance de la coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'IC₅₀, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue, généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH (IC₅₀). Le résultat est dépendant de la concentration en DPPH initiale. En ajoutant une référence connue, on pourrait standardiser la méthode, en ramenant par exemple les résultats à un équivalent Trolox ou vitamine C. Cette méthode est beaucoup utilisée pour étudier des extraits végétaux et alimentaires pour mesurer la capacité antioxydante totale.

Mode opératoire

a) Préparation des dilutions de HE

- Nous préparons une solution éthanolique de DPPH en solubilisant 0.002 g de DPPH dans 100 ml d'éthanol ;
- Introduire 0.1g de HE avec 10 ml d'éthanol dans un tube 1 pour avoir une concentration de 10mg/l en HE ;
- Introduire 7.5 ml de solution du tube 1 avec 2.5 ml de d'éthanol dans le tube 2 (7.5mg/ml) ;
- Introduire 5ml de tube 2 avec 5 ml de d'éthanol dans le tube 3 (5 mg/ml) ;
- Introduire 2.5ml de tube 3 avec 7.5 ml de d'éthanol dans le tube 4 (2.5 mg/ml).

50µl de chacune des solutions éthanoliques des HE testées à différentes concentrations est mélangée avec 2 ml d'une solution éthanolique de DPPH à 0,004%. Après une période d'incubation de 30 minutes à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517nm à l'aide de spectrophotométrie UV-visible.

Les échantillons de contrôle négatif sont composés de 50µl d'éthanol additionné de 2 ml de la solution éthanolique de DPPH.

L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif aux mêmes concentrations que l'HE. L'absorbance de la DPPH dans les solutions d'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'huile essentielle.

b) Détermination du pourcentage d'inhibition

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée selon la formule suivante :

$$\text{PI}\% = (\text{A}_{\text{blanc}} - \text{A}_{\text{échantillon}}) / \text{A}_{\text{blanc}} * 100 \text{ (eq.IV.7)}$$

PI : pourcentage d'inhibition (%) ;

A blanc : absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol)

A échantillon : absorbance du composé d'essai.

c) Détermination de la concentration inhibitrice 50 (IC₅₀)

IC₅₀ : C'est la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire de 50% le radical DPPH (qui correspond à une absorbance égale à 0,5).

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés : pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de l'échantillon [49].

IV.6.3.2. Activité antibactérienne

Nous avons choisi d'évaluer l'effet antibactérien de nos huiles essentielles par la méthode de diffusion en milieu solide, appelée aromagramme ; car elle est relativement rapide, peu coûteuse, facilement reproductible et ne nécessitent pas un équipement de laboratoire

sophistiqué, cette étude a été achevée au niveau du laboratoire d'analyses médicale de Zibouche à Ain defla.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *M. Piperita* est évaluée sur trois souches bactériennes :

- Gram négative : *Escherichia coli*.
- Gram positive : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml du milieu de culture incliné (gélose nutritive).

Principe

La technique de l'aromatogramme permet d'étudier d'une manière fiable et reproductible la sensibilité et la résistance des germes aux huiles essentielles en les mettant en contact sur un milieu de culture solide (dans notre cas milieu Mueller-Hinton) dans le but d'apprécier leur effet antibactérien.

Placé dans une étuve à 37°C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif. Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries (6 à 8 par boîte) de petits disques de papier filtre imprégné d'huiles essentielles à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 37.5°C le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des huiles essentielles utilisées [50].

Mode opératoire

a) Préparation du milieu de culture

Mettre 12 g de gélose avec 500 ml d'eau distillée dans un flacon en verre stérile ; bien mélanger la solution et placer le flacon dans un bain d'eau bouillante pendant 15 min.



Fig.IV.10 : Préparation du milieu de culture.

L'agar Muller-Hinton (MH) stérile est coulé dans des boîtes de pétri stériles de 9 cm puis mise au réfrigérateur pendant 24h (**Fig.IV.10**).

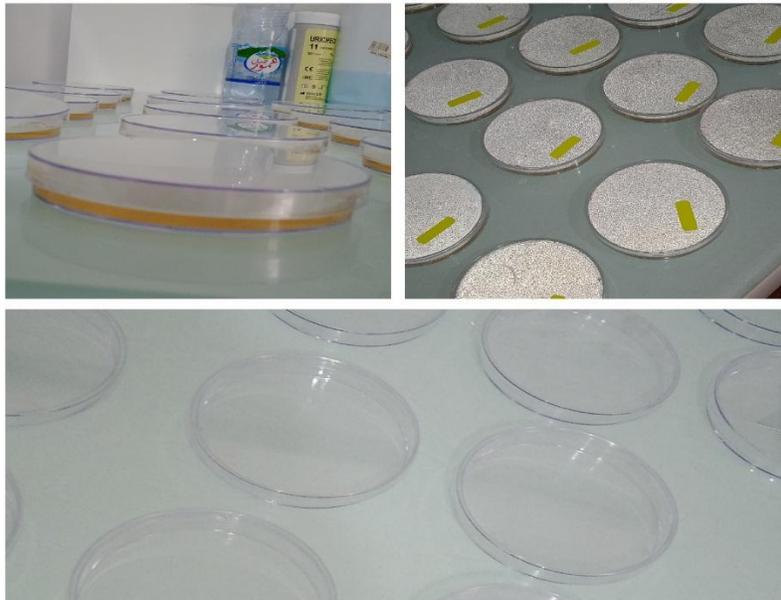


Fig.IV.11 : Préparation du milieu de culture.

b) Préparation de la série de dilution de l'HE

Nous préparons différentes concentrations de l'HE dans le Diméthyl sulfoxyde (DMSO) (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) comme suit :

- Mettre 0.5 ml de HE avec 0.5 ml de DMSO (solution mère) ;
- Mettre 0.5 ml de solution mère avec 0.5 de DMSO (solution 1/2) ;
- Mettre 0.5 ml de solution 1/2 avec 0.5 de DMSO (solution 1/4) ;
- Mettre 0.5 ml de solution 1/4 avec 0.5 de DMSO (solution 1/8) ;
- Mettre 0.5 ml de solution 1/8 avec 0.5 de DMSO (solution 1/16) ;
- Mettre 0.5 ml de solution 1/16 avec 0.5 de DMSO (solution 1/32) ;

c) Préparation de l'inoculum

Des suspensions microbiennes pour chaque espèce sont préparées à partir des boîtes contenant les germes pathogènes. On prélève deux ou trois colonies pures et bien isolées à l'aide d'une pipette pasteur puis on la décharge dans un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérilisée. Ensuite on agite vigoureusement et on laisse incuber pendant 18H-24H à 37°C.

Ensemencement

On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (elle ne doit pas dépasser les 24h après l'incubation). Puis on le frotte sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération doit se faire deux fois en tournant la boîte de pétrie d'un angle de 60 à chaque fois.

d) Préparation des disques d'aromatogramme

Les disques sont fabriqués à partir de papier Whatman stérile de 9 mm de diamètre. Une fois les géloses Muller Hinton sont ensemencées, 4 disques imbibés dans l'HE à différentes concentrations, un disque imbibé de l'HE pur et un disque imbibé de DMSO sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen.

On laisse les boîtes pétries à température ambiante pendant 20minute puis on incube à 37°C pendant 24h [50].

Lecture :

Après incubation, les résultats sont observés sur les boîtes pétries. Il y'aura apparition ou non de halos clairs tout autour des disques, ou zones d'inhibition.

La présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'ya pas de croissance de micro-organisme dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition mesurée est grande, plus le germe est sensible.

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée [50].

Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (D_{\text{test}} / D_{\text{contrôle}}) * 100 \text{ (eq.IV.8)}$$

D_{test} : diamètre de la zone d'inhibition.

$D_{\text{contrôle}}$: diamètre de la boîte de pétri.

Chapitre V

Résultats et discussions

Chapitre V : Résultats et Discussions

Cette partie est consacrée à la discussion des résultats de l'extraction de l'huile essentielle de la M. Piperita, de sa caractérisation organoleptique, sa cinétique de rendement ainsi que son activité antibactérienne et antioxydante.

V.1. Détermination du taux d'humidité

Afin de calculer le taux d'humidité de la M. Piperita, nous avons pesé les feuilles fraîches et suivi leur poids jusqu'à sa stabilité (**Tableau. V.1**).

Tableau.V.1 : suivie du taux d'humidité de la plante.

t (j)	01	02	03	04	05
m (g)	70	13	11	11	10
H %	-	81.42	84.28	84.28	85.71

Les résultats de l'étude montrent que la M. Piperita est riche en eau. En effet, la partie aérienne de cette espèce renferme un taux d'humidité important de 86% et la matière sèche ne représente que 14% ; cela signifie que plus de la moitié de la partie fraîche est constituée par l'eau, ceci influe négativement sur leur bonne conservation, sur la durée d'extraction et donc sur le rendement.

Les résultats obtenus dans l'évaluation du taux de la matière sèche, et la proportion d'eau contenue dans la partie aérienne de la M. Piperita sont représentés dans la figure.V.1.

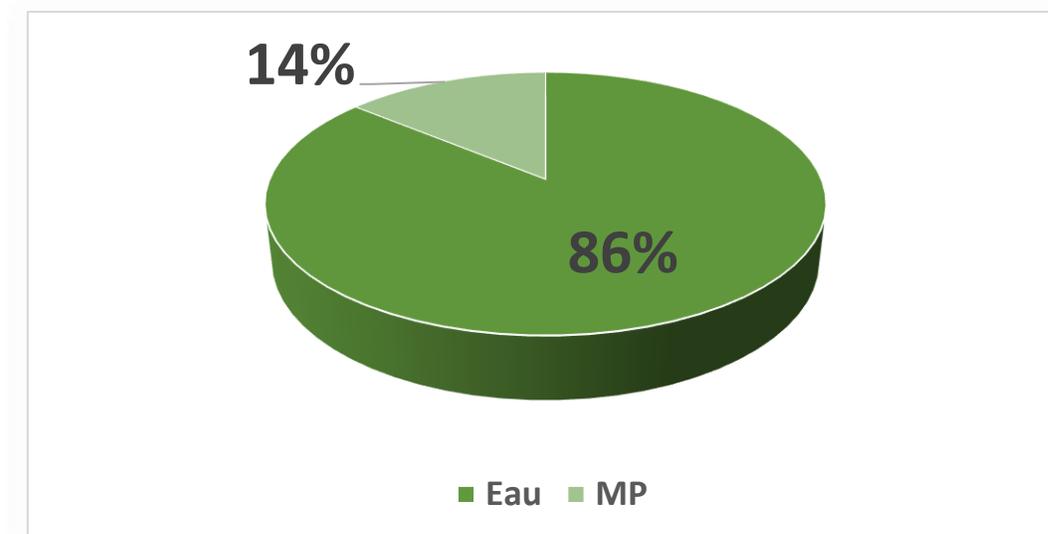


Fig.V.1 : Taux d'humidité et pourcentage de la matière sèche de la partie aérienne de la M. Piperita.

V.2. Détermination du rendement d'extraction

L'extraction par hydrodistillation de l'HE de M. Piperita est faite à partir des feuilles fraîches et sèches. Les rendements en huile essentielle obtenus sont mentionnés dans le tableau V.2.

Tableau.V.2 : les résultats du rendement en HE de M. Piperita.

M. Piperita	Sèche	Humide
R%	1.93	0.07

D'après le tableau V.2 ; nous pouvons dire que le rendement en HE de M. Piperita sèche est meilleur que celui de la M. Piperita humide.

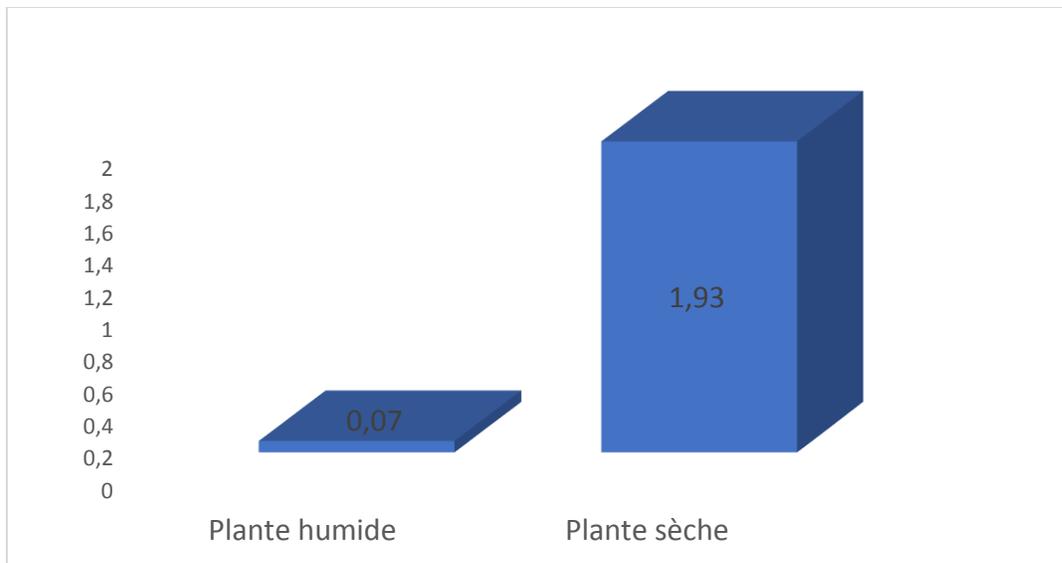


Fig.V.2 : Représentation graphique des rendements en HE de M. Piperita sèche et humide.

V.3. Etude de la cinétique d'extraction de l'HE de la M. Piperita

Cette étude a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie.

Lors des expériences servant à établir la cinétique d'extraction, les volumes de l'huile essentielle extraite sont pris à des intervalles de temps de 15minutes et on en calcule le rendement de chaque prise à partir de ces mesures du volume de l'huile essentielle. Et ainsi on construit la courbe de la cinétique d'extraction en fonction du temps. Le résultat est illustré dans les figure.V.3 et figure.V.4.

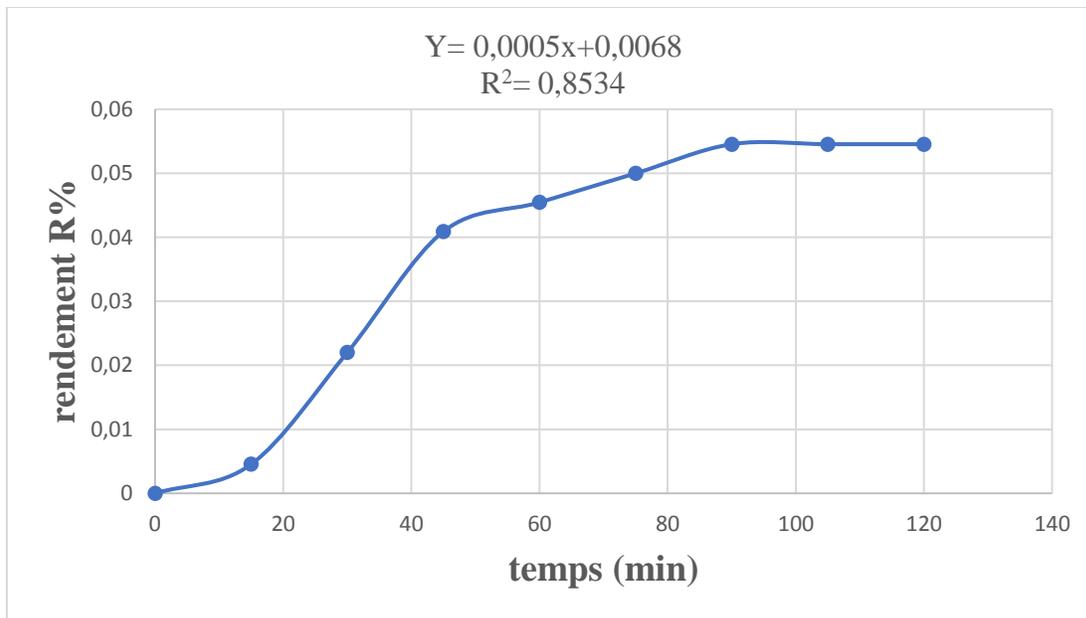


Fig.V.3 : Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de la M. Piperita humide.

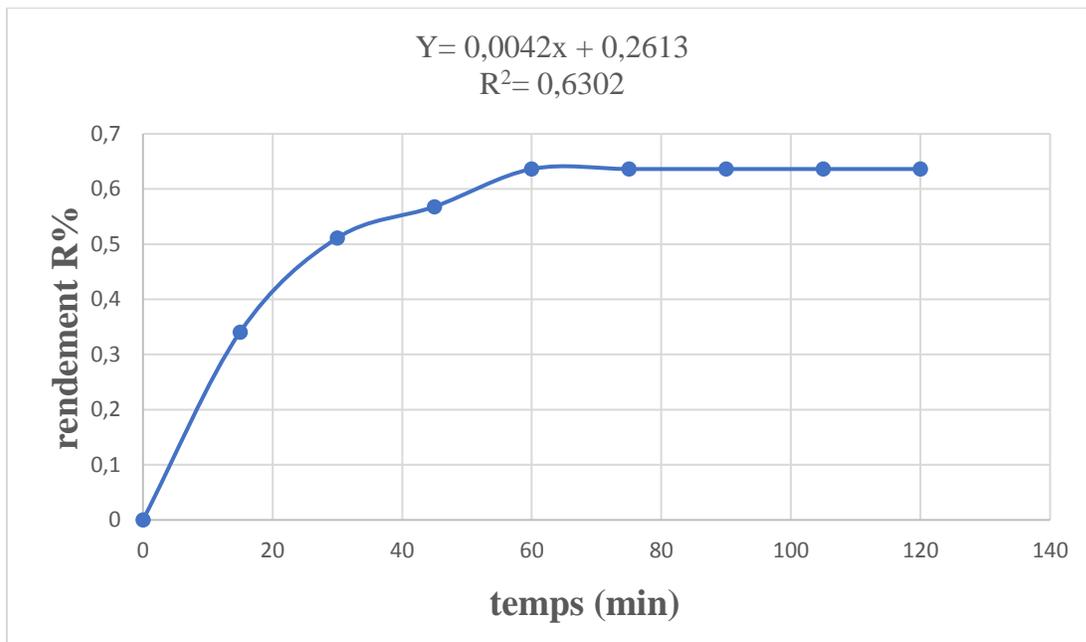


Fig.V.4 : Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de la M. Piperita sèche.

Les figure.V.3 et figure.V.4, montrent que le rendement d'extraction de l'HE à partir de la M. Piperita fraîche et sèche augmente en fonction du temps d'extraction. En effet, les courbes croissent puis tendent vers un palier qui correspond au rendement maximum

atteint, et cela à partir de 90min pour la M. Piperita fraîche et 60min pour la M. Piperita sèche.

On remarque que l'extraction à partir de la M. Piperita sèche est plus rapide et offre un rendement plus important que l'extraction à partir de la M. Piperita fraîche ; c'est pour cela que nous avons choisi d'utiliser la M. Piperita sèche pour le reste de notre travail.

V.4. Analyse physique

V.4.1. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle

L'hydrodistillation des feuilles de M. Piperita séchées nous a permis d'extraire des huiles essentielles dont les caractéristiques organoleptiques observées figurent dans le tableau.V.3 :

Tableau.V.3 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de la M. Piperita.

Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Couleur	Odeur
La M. Piperita	Liquide, Mobile, Limpide.	Transparent.	Odeur très forte et caractéristique de la M. Piperita.
Norme AFNOR (2008)	Liquide, Mobile, Limpide.	Presque incolore à jaune pale.	Caractéristique fraîche, plus ou moins mentholée selon l'origine.



Fig.V.5 : Aspect des huiles essentielles de la M. Piperita.

On remarque que notre huile essentielle est un liquide incolore avec une très forte odeur mentholée caractéristique de la M. Piperita

V.4.2. Les propriétés physico-chimiques

Les paramètres essentiels concernant la qualité de l'HE sont bien évidemment les caractères physico-chimiques. Nous avons effectué ces analyses afin de confirmer la qualité de l'HE de M. Piperita en déterminant le pH, la densité, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'aster, et l'indice de saponification.

Les valeurs obtenues sont représentées dans le tableau.

Tableau.V.4 : résultats des propriétés physico-chimiques.

Caractéristiques	pH	Densité	Ir	Ia	Ie	Is
Résultats	4.5	0.909	1.490	1.122	75.75	73.15
Norme AFNOR (2008)	4-6	0.906-0.925	1.46-1.476	0.84-3.74	53-76	-

Les valeurs des indices physico-chimiques de l'huile essentielle de la M. Piperita comparés à ceux de l'AFNOR (2008), indiquent que notre huile essentielle est de bonne qualité et conforme aux normes.

V.4.2.1. L'indice d'acide : donne une idée sur le taux d'acides libres dans l'huile, ce paramètre peut nous aider à savoir la qualité de notre produit ; en effet, plus l'Ia est faible et plus l'huile essentielle est de bonne qualité. L'Ia de notre HE extraite de M. Piperita est de 1.12, ce qui veut dire qu'elle présente une faible concentration en acide gras libre donc notre HE est fraîche et de bonne qualité.

V.4.2.2. L'indice d'ester : renseigne sur la longueur des chaînes d'acide gras. Pour un poids donné d'huile essentielle, l'indice d'ester augmente avec la diminution de la longueur des chaînes. L'Ie de notre HE est de 75.75, cette valeur est conforme à la norme AFNOR (2008).

V.4.2.3. L'indice de réfraction : dépend la composition chimique de l'HE ; il varie essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygénés, une forte teneur en mono terpènes donnera un indice élevé. L'Ir de notre HE est élevé il est au-dessus de la norme AFNOR (2008) ce qui indique que l'HE de M. Piperita est riche en composants qui dévient la lumière polarisée.

V.4.2.4. L'indice de saponification : l'Is de notre HE est de 73,15.

V.4.2.5. La densité : la densité de notre HE est de 0.909, elle est inférieure à celle de l'eau.

V.4.2.6. Le pH : le pH est un paramètre qui mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+), donc permet de définir si un milieu est acide ou basique. La valeur du pH de l'huile essentielle de la M. Piperita est $pH=4.5$, donc notre HE est acide et de ce fait est conforme aux normes internationales des huiles essentielles.

V.5. Analyse chimique

V.5.1. Analyse par la Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse (GC/MS)

Afin de bien caractériser notre HE et déterminer sa composition chimique, nous avons analysé celle-ci par la chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC/MS). Cette analyse a été effectuée au laboratoire de

recherche de l'Université de Khmis Miliana dans des conditions opératoires pertinentes.

Les résultats de l'analyse de notre HE par la GC/MS sont présentés dans le Tableau. V.5.

Tableau.V.5 : composition chimique de l'huile essentielle de la M. Piperita.

N ^o	Composé	Temps de rétention	Area %
01	Hexenal	5.322	0.18
02	α -Thujene	7.0776	0.20
03	Bicyclo-heptene	7.260	1.72
04	Bicycloheptane	7.634	0.34
05	Sabinene	8.260	1.29
06	Bicyclo-heptanedimethyl-methylene	8.360	2.63
07	Myrcene	8.674	1.16
08	Hexanol	8.785	1.08
09	Methano-indene	9.056	0.33
10	Cyclohexadiene	9.373	0.96
11	Cyclohexene	9.855	13.60
12	P-menthenol	9.913	3.76
13	Octatriene	10.176	0.45
14	Cyclohexadiene	10.497	1.39
15	Isoprophyl	10.762	2.34
16	Cyclohexene-methylethyidene	11.272	0.56
17	Octadienol	11.534	0.65
18	Butanoic acide	11.622	0.19
19	Menthenol	12.143	0.22
20	Nealloocimene	12.299	0.37
21	Trans-lymonene oxide	12.571	0.19
22	Borneol	13.363	1.24
23	Cyclohexeneol	13.652	2.66
24	Carvone	14.132	2.81

25	Dihydrocarveol	14.342	1.47
26	Cic-cyclohexenol	15.129	0.57
27	Cyclohexenone	15.778	35.74
28	Cic-Carvone oxide	16.217	0.11
29	Bicycloheptanol	16.416	0.23
30	β -Benzopyran	16.680	0.16
31	α -Cyclohexenol	17.340	0.73
32	Bicycloelemene	17.623	0.22
33	Cyclohexenol	18.151	1.40
34	Copaene	18.566	0.14
35	Cyclobuta-dicyclopentene	18.817	3.45
36	α -Cyclopropazulene	19.368	0.21
37	Caryophyllene	19.634	2.37
38	Cyclopenta-benzene	19.802	0.37
39	γ -Cardinene	20.149	0.98
40	Cycloundecatriene	20.367	0.26
41	Bicyclosesquiphellandrene	20.563	0.75
42	Cyclodecadiene	21.012	4.20
43	Bicyclogermacrene	21.315	0.86
44	α -Naphtalene	21.647	0.18
45	Cis-Naphtalene	21.815	0.60
46	β -Naphtalene	22.155	0.10
47	Epoxyalvial	22.482	0.13
48	Dodecadien	22.753	0.13
49	γ-Cadinene	22.981	1.10
50	Naphtalenol	23.805	0.48
51	Cic- Naphtalene	24.282	0.64
52	α -cadinol	24.569	0.48
53	Spathulenol	24.905	0.11
54	α -azulenol	25.354	0.42

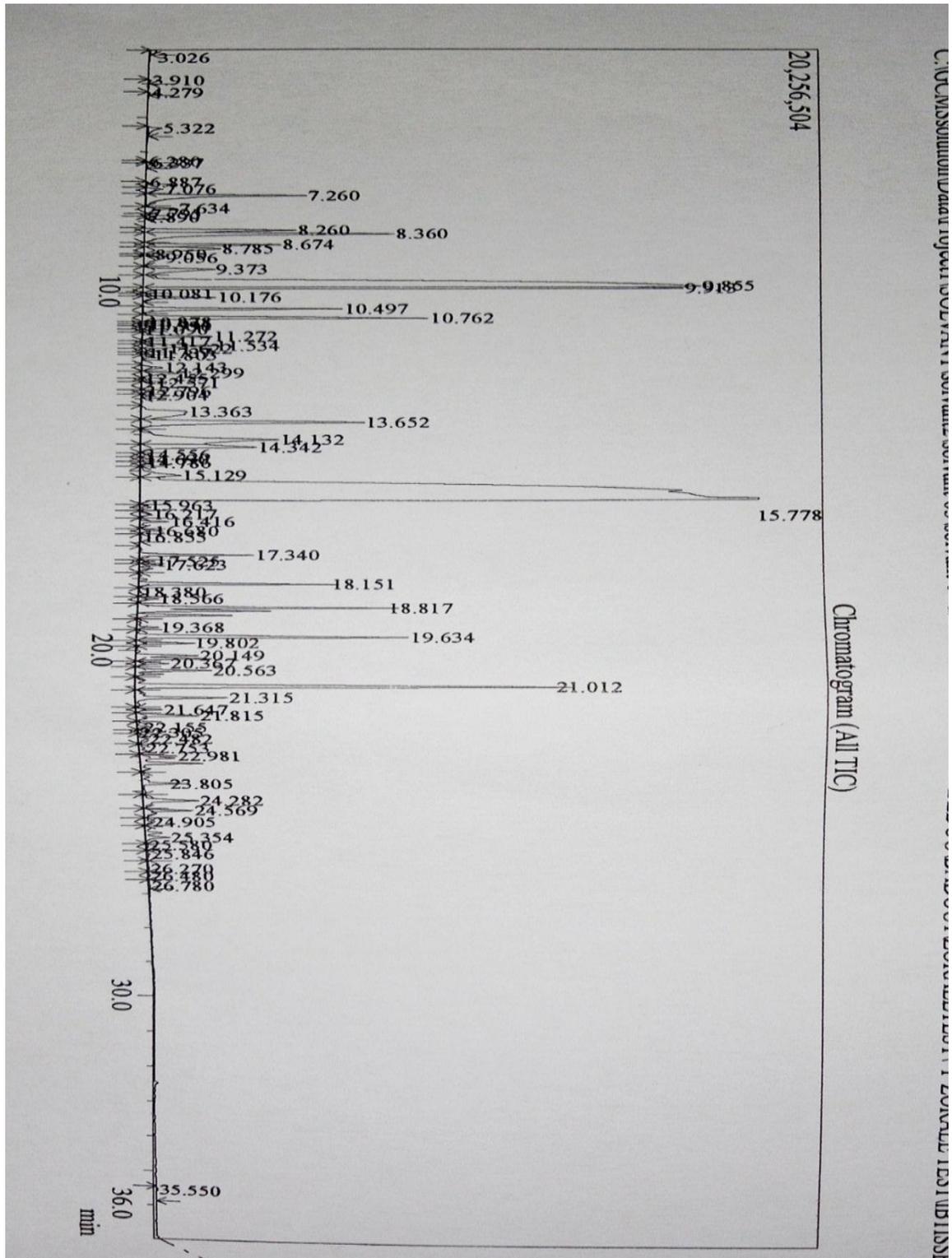


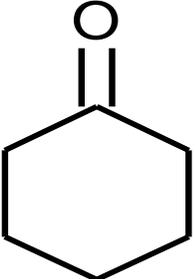
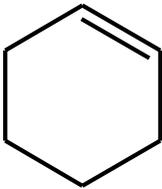
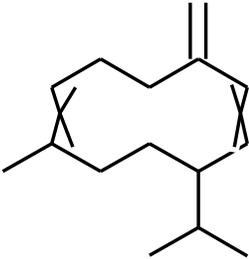
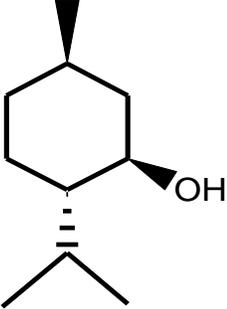
Fig. V.6 : Chromatogramme de l'huile essentielle de M. Piperita.

Les pics du chromatogramme de l'huile essentielle est comparé à ceux des composés de référence présents dans une bibliothèque de spectre avec une banque de données informatisées, l'appareil GC/MS nous a donné les différents chromatogrammes de masse et les indices de rétention des substances comparables qui peuvent constituer cet extrait.

Le chromatogramme de l'huile essentielle présente de nombreux pics et beaucoup d'entre eux se chevauchent. Le profil chromatographique de l'huile essentielle est illustré dans la Figure. V.6.

En plus, la GC/MS a permis de recenser cinquante-quatre composés à partir de l'essence de la *M. Piperita*. Sont identifiés, ceux qui correspondent à un pourcentage de 98.91 % de l'ensemble des constituants isolés tableau. V.5. Le cyclohexenone apparaît comme le constituant principal de l'huile essentielle (35.74%), suivi du cyclohexene (13.60%), du cyclodecadiène (4.20%) et du mentenole (3.76%).

Tableau.V.6 : Structure des composés organiques principales de M. Piperita.

N°	Composé	Structure des composés	Area %
01	Cyclohexenone		35.74
02	Cyclohexene		13.60
03	1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene-8-(1-methyl-ethyl)-, [S- (F, E)]		4.20
04	P-menthenol		3.76

V.5.2. Activité anti reflux

L'étude de l'activité anti reflux de l'HE de M. Piperita a montré qu'après 15 minutes de l'introduction de l'HE dans le contenu acide du bécher, le radeau a commencé à se former et au bout de 30 minutes la formation du radeau flottant à la surface du contenu acide est complète. De ce fait nous pouvons conclure que l'HE de M. Piperita a un effet anti reflux.

V.5.3. Activité antiacide

En raison de l'instabilité de la valeur du pH, nous concluons que l'HE de la M. Piperita n'a pas d'activité anti acide.

V.6. Analyse biologique

V.6.1. Activité antioxydante

Le test antioxydant sur l'HE de la M. Piperita est évalué par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et en le comparant avec l'acide ascorbique.

Calcul du pourcentage d'inhibition :

Le pourcentage d'inhibition de l'HE de la M. Piperita et de la vitamine C de l'absorbance du DPPH sont représentés dans le Tableau. V.7.

Tableau. V.7 : Pourcentage d'inhibition (I%) de l'HE de M. Piperita et de l'acide ascorbique.

Dilutions(mg/ml)	2.5	5	7.5	10
Abs (HE)	0.204	0.141	0.206	0.085
Inhibition (%)	9.73	37.67	38.69	62.38
Abs(Vitamine C)	0.008	0.007	0.005	0.003
Inhibition (%)	96.46	96.90	97.78	98.67

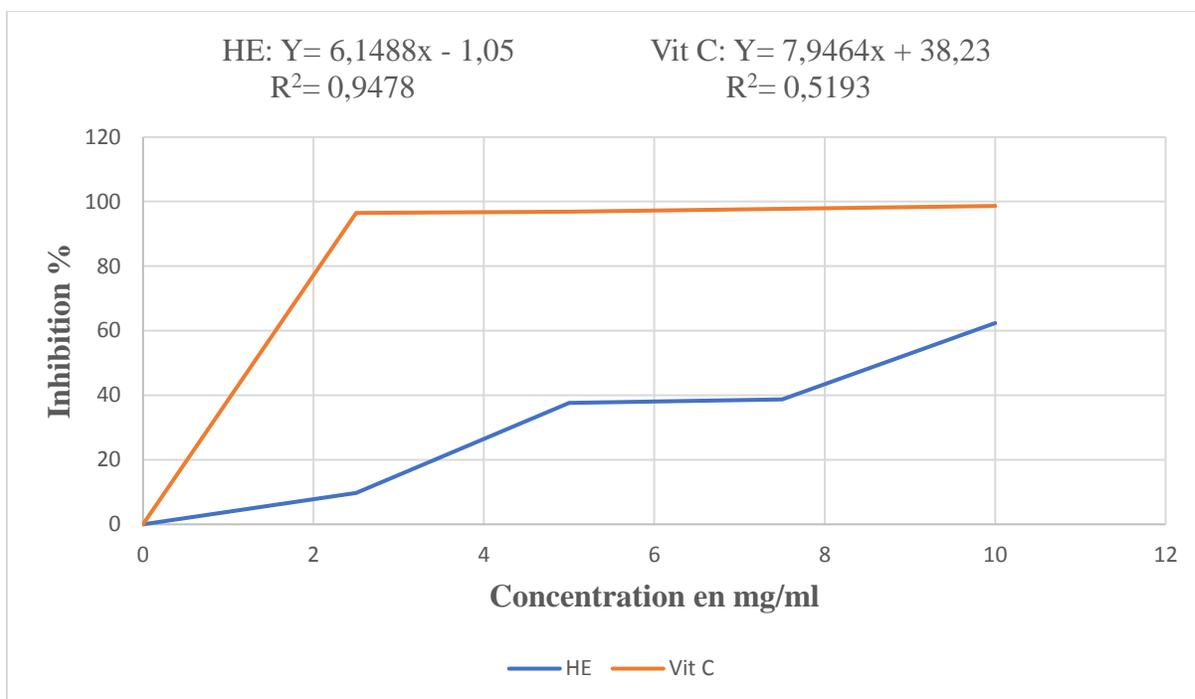


Fig. V.7: Les pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'HE et de l'acide ascorbique (VC).

La figure. V.7 montre que le pourcentage d'inhibition du radical de DPPH augmente en fonction de la concentration de l'HE et de l'acide ascorbique. Cependant, le pourcentage d'inhibition varie selon le produit examiné. En effet, l'HE de *M. Piperita* présente un pourcentage d'inhibition du radical DPPH inférieur à celui de la vitamine C, et cela pour toutes les concentrations étudiées. Pour une concentration de 10 mg/ml, un fort pourcentage d'inhibition est obtenu avec la vitamine C (99.56%) et un pourcentage de (62.38%) pour l'HE. Notre HE présente alors une bonne activité antioxydante.

Il semble que cette activité antioxydante est liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle de *M. Piperita* [51].

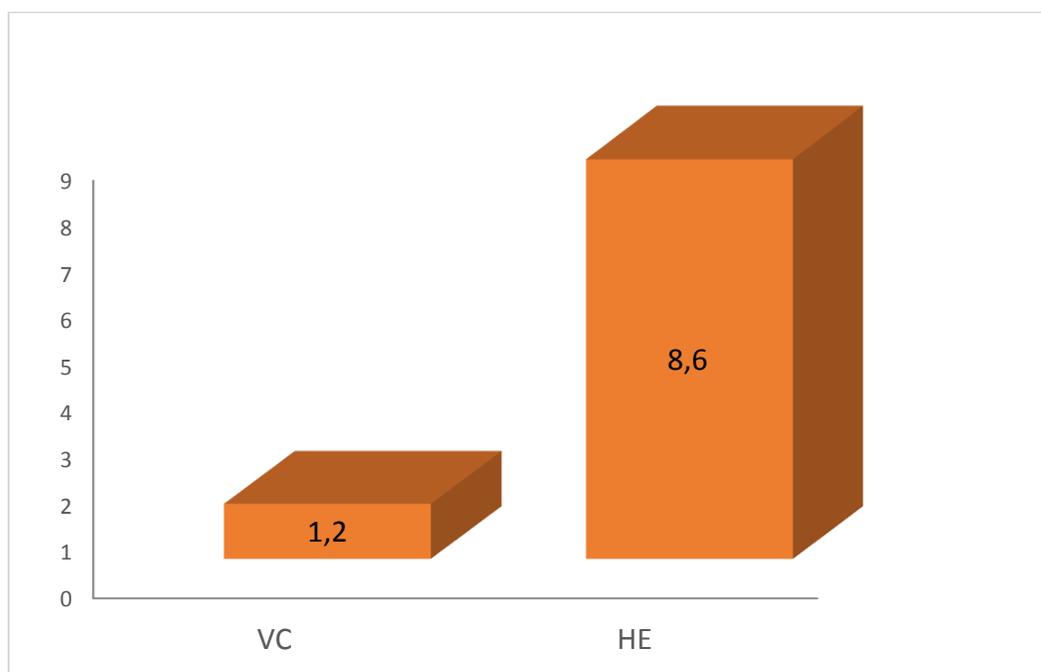
Détermination IC50 :

L'IC50 a été déterminée graphiquement à partir de la figure représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations.

Les valeurs d'IC50 de l'huile essentielle de la *M. Piperita* et de la vitamine C sont représentées par la figure. V.8 et le Tableau. V.8 :

Tableau. V.8 : IC₅₀ de l'HE et de la vitamine C par le test du DPPH.

Antioxydante	IC ₅₀ (mg/ml)
Vitamine C	1.2
HE	8.6

**Fig. V.8 :** Représentation schématique de l'IC₅₀ de l'HE et la vitamine C.

Les résultats montrent que la vitamine C présente le meilleur pouvoir antioxydant qui correspond à un IC₅₀ le plus faible (1.20 mg/ml). Par contre, l'HE de la *M. Piperita* présente pouvoir antioxydant plus faible avec un IC₅₀ le plus élevée (8.6 mg/ml). Il semble que l'HE de la *M. Piperita* à une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celle de la vitamine C.

V.6.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de notre huile essentielle de M. Piperita a été faite sur trois bactéries provenant de la collection du laboratoire d'analyse médicale de AIN DEFLA. Le pouvoir antimicrobien est déterminé par la méthode de l'aromatogramme en mesurant les diamètres des zones d'inhibition (mm).

Le diamètre de la zone d'inhibition observée autour des disques imprégnés d'HE pure et leurs dilutions après 24 heures d'incubation à 37°C, sont résumés dans le Tableau. V.9.

Tableau. V.9 : Valeur des diamètres moyens de la zone d'inhibition et le pourcentage d'inhibition de l'HE de M. Piperita pour les trois bactéries.

Bactérie Concentration de l'HE	Escherichia coli	Pseudomonas Aeruginosa	Staphylococcus aureu
	DMSO	-	-
Huile pure	60	-	51
1/2	35	-	15
1/4	21	-	14
1/8	16	-	13
1/16	15	-	9
1/32	15	-	9

La règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (DZI) :

Le résultat est exprimé par le DZI et peut être symbolisé par le Tableau. V. 10, [52].

Tableau. V.10 : La règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

Diamètre d'inhibition (mm)	Signe	Inhibition
D < 8	-	Non sensible
Entre 9 – 14	+	Sensible
Entre 15 – 19	++	Très sensible
D > 20	+++	Extrêmement sensible

Les résultats obtenus avec les souches testées sont résumés dans le Tableau. V.11.

Tableau. V.11 : Transcription des diamètres d'inhibition de l'HE

Bactérie	Escherichia coli	Pseudomonas Aeruginosa	Staphylococcus aureu
Concentration de l'HE			
DMSO	Non sensible	Non sensible	Non sensible
Huile pure	Extrêmement sensible	Non sensible	Extrêmement sensible
1/ 2	Extrêmement sensible	Non sensible	Très sensible
1/ 4	Extrêmement sensible	Non sensible	Sensible
1/8	Très sensible	Non sensible	Sensible
1/16	Très sensible	Non sensible	Sensible
1/32	Très sensible	Non sensible	Sensible

Selon l'échelle citée par Paun. G et Zrira. S [52], les résultats montrent que l'HE de M. Piperita possèdent une activité antibactérienne sur les souches bactériennes Escherichia Coli et Staphylococcus Aureu, par contre, la souche bactérienne Pseudomonas Aeruginosa n'est pas sensible aux différentes concentrations de notre huiles essentielles.

Cette sensibilité est différente selon les souches ; la souche Staphylococcus Aureu est moins sensible que la souche Escherichia Coli. En effet, on remarque que la souche Escherichia Coli est fortement sensible à l'HE pure de M. Piperita et à la concentration $\frac{1}{2}$, et est moyennement sensible pour les concentrations de $\frac{1}{4}$ et $\frac{1}{8}$ puis elle devient faiblement sensible pour la concentration de $\frac{1}{32}$. Tandis que la souche Staphylococcus est fortement sensible à l'HE pure, et faiblement sensible aux autres concentrations.

Conclusion

Notre étude a porté sur l'extraction et la caractérisation de l'huile essentielle de la Mentha Piperita (Menthe Poivrée) récoltée dans la région d'El-Attaf (W. Ain Defla). L'objectif principal était la détermination de la composition chimique et les activités antibactérienne et antioxydante de l'huile essentielle extraite.

L'étude montre que notre huile essentielle est un liquide incolore avec une très forte odeur mentholée caractéristique de la M. Piperita.

Les résultats de l'étude de taux d'humidité montrent que la M. Piperita est riche en eau. En effet, la partie aérienne de cette espèce renferme un taux d'humidité important de 86% et la matière sèche ne représente que 14%. L'extraction de l'HE de M. Piperita est réalisée par hydrodistillation ; le rendement obtenu est de 1.93%.

L'étude de la cinétique d'extraction de l'HE de la M. Piperita montre que l'extraction à partir de la M. Piperita sèche est plus rapide et offre un rendement plus important que l'extraction à partir de la M. Piperita fraîche, le rendement d'extraction de l'HE à partir de la menthe atteint son maximum à partir de 90 minutes pour la menthe fraîche et 60 minutes pour la menthe sèche.

Les valeurs des indices physico-chimiques de l'huile essentielle de la M. Piperita comparés à ceux de l'AFNOR (2008), indiquent que notre huile essentielle est de bonne qualité et conforme aux normes. L'Ia de notre HE extraite de M. Piperita est de 1.12, ce qui veut dire qu'elle présente une faible concentration en acide gras libre donc notre HE est fraîche et de bonne qualité, L'Ie de notre HE est de 75.75, L'Ir de notre HE est de 1.490, ce qui indique que l'HE de M. Piperita est riche en composants qui dévient la lumière polarisée, : l'Is de notre HE est de 73,15, la densité de notre HE est de 0.909, elle est inférieure à celle de l'eau, La valeur du pH de l'huile essentielle de la M. Piperita est pH=4.5, donc notre HE est acide et de ce fait est conforme aux normes internationales des huiles essentielles.

L'analyse de notre HE par CG/SM a permis d'identifier cinquante-quatre composés, les composés majoritaires sont le cyclohexenone (35.74%), cyclohexene (13.60%), P-menthenol (3.76%), Cyclodecadiene (4.20%) et le Bicyclo-heptanedimethyl-methylene (2.63%).

L'étude de l'activité anti reflux de l'HE de M. Piperita a montré qu'après 30 minutes la formation du radeau flottant à la surface du contenu acide est complète, de ce fait nous pouvons conclure que l'HE de M. Piperita a un effet anti reflux. En raison de l'instabilité de la valeur du pH, nous concluons que l'HE de la M. Piperita n'a pas d'activité anti acide.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'HE de M. poivrée par la méthode anti-radicalaire contre le DPPH, montre que l'extrait aqueux présente un bon effet antioxydant vis à vis du radicale DPPH avec un $IC_{50} = 8.6$ mg/ml.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la menthe poivrée a été déterminée selon la méthode de l'aromatogramme ; les résultats montrent que l'HE de menthe poivrée possède une activité antibactérienne sur les souches bactériennes *Escherichia Coli* et *Staphylococcus Aureu*, par contre, la souche bactérienne *Pseudomonas Aeruginosa* n'est pas sensible aux différentes concentrations de notre huiles essentielles.

Ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies, tel que :

- L'extraction des HEs par d'autres méthodes
- L'étude de leurs activités antifongiques, antivirales
- Effectuer des tests complémentaires sur d'autres bactéries
- Faire des analyses chimiques sur l'hydrolat et son potentiel antibactérien.

Références Bibliographiques

- [1] Fanchomme, P., Jollois, R., Pénoel, D., Mars, J., (1990). L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles : fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. R. Jollois.
- [2] Il Edrissi, A. (1982). Etude des huiles essentielles de quelques Espèces Salivia, Lavandula et Mentha du Maroc. 1982 (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de Rabat.
- [3] Piochon, M. (2008). Etude des huiles essentielles de espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémisynthèse. Université du Québec à Chicoutimi.
- [4] Mokaddem, H., Zeghib, A., Zeghib, F., Hioun, S., Fradj, K., Kabouche, Z., & Djabri, B. (2018). A medicinal plant from Algerian arid zone. *Phytothérapie*, 16(2), 91-95.
- [5] Bray, C. (2005). Huiles essentielles et parfum : aromathérapie et aromachologie (Doctoral dissertation).
- [6] Nyiramana Lunianga, M. (1991). Stratégies de mis en marché des huiles essentielles québécoises. Université du Québec à Chicoutimi.
- [7] Couci-Marinier, F., & Lobstien, A. (2013). Mode d'utilisation des huiles essentielles. *Actualités pharmaceutiques*, 52(525), 26-30.
- [8] El Kalamouni, C. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques. Diss. 2010.
- [9] Lalami, E., Fouad, E., Ouedrhiri, W., Chahdi, F., Guemmouh, R., & Greche, H. (2013). Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *Thymus vulagris* et *Thymus satureioidis*. *Les technologies de laboratoire*, 8(31).
- [10] Guitton, Y. (2010). Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre *Lavandula* : aspects évolutifs et physiologiques (Doctoral dissertation, Université Jean Monnet-Sait-Etienne).

- [11] Kano, C., Sawaliho, H., Koukoua, G., & N'Guessan, T. (2004). Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles. *Comptes Rendus Chimie*, 7(10-11), 1039-1042.
- [12] Djerrari, A. (1986). Influence du mode d'extraction et des conditions de conservation sur la composition des huiles essentielles de thym et de basilic (Doctoral dissertation, Montpellier 2).
- [13] Laurain-Mattar, D. (2018) Critères de qualité des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(580), 18-20.
- [14] Jean, B. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.).
- [15] Anouni, M., Pelen, F., & Soulimani, R. (2013). Etude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, 11(4), 225-236.
- [16] Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de L'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique.
- [17] Degnon, R., Adjou, S., Metome, G., & Dahouenon-Ahoussi, E. (2016). Efficacité des huiles essentielles de *Cymbopogon citatus* et de *Mentha piperita* dans la stabilisation du lait frais de vache au Sud de Bénin. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(4), 1894-1902.
- [18] Ilboudo, O., Bonzo, S., Tapsoba, I., Somda, I., & Bonzi-Coulibaly, L. (2016). In vitro antifungal activity of flavonoid diglycosides of *Mentha piperita* and their oxime derivatives against two cereals fungi. *Comptes Rendus Chimie*, 19(7), 857-862.
- [19] Quezel, P., Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et Méridionales.
- [20] Khireddine, H. (2014). Comprimés de poudre de dattes comme support universel des principes actifs de quelques plantes médicinales d'Algérie (Doctoral dissertation).
- [21] Gomes, S. (2011). Stratégie de maîtrise de la cloque du pecher par phytothérapie. *ARBOS BIO INFOS*, 160, 5-6.

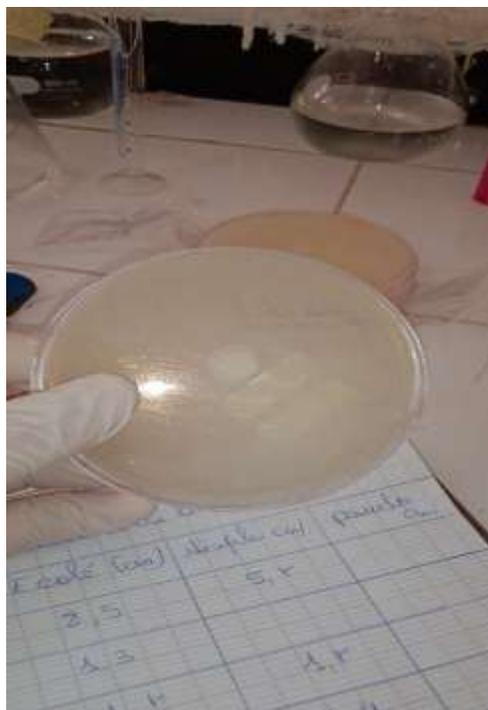
- [22] Fernandez, X., Clabrol-Bass, D. (2007). Techniques d'analyse. Analyse des arômes, 3-33.
- [23] Peyron, L. (1992). Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Les Arômes alimentaires, 216-241.
- [24] Sallé, J. L. (2004). Les huiles essentielles : synthèse d'aromathérapie. Editions Frison-Roche.
- [25] Moller, K. (2008). La distillation à l'alambic : un art à la portée de tous. Editorial Unico.
- [26] Leybros, J., & Frémeaux, P., (1990). Extraction solide-liquide. Aspects théoriques. Techniques de l'Ingénieur J, 1, 077.
- [27] CICILE, J. C. (2001). Distillation. Absorption. Etude pratique. Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés, 2(J2610), J2610-1.
- [28] Guenther, E., & Althausen, D. (1949). The essential oils (vol. 1, p. 774). New York: van Nostrand.
- [29] CROUZET, J. (1998). Aromes alimentaires. Ed. Techniques Ingénieur.
- [30] GARNERO, J. (1996). Huiles essentielles. Ed. Techniques Ingénieur.
- [31] Dugo, G., & Di Giacomo, A. (EDS.). (2002). Citrus: The genus citrus. CRC Press.
- [32] Wijesekara, R. O. B., Rantnatunga, C.M., & Durback. (1997). The distillation of essential oils. Manufacturing and Plant Construction Handbook Eschborn. Federal Republic of Germany: Protrade, Department of Foodstuffs and Agricultural Products.
- [33] Anklam, E., Berg, H., Mathiasson, L., Sharman, M., & Ulberth, F. (1998). Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review. Food Additives & Contaminants, 15(6), 729-750.
- [34] Brat, P. (2001). Application d'un nouveau procédé d'extraction (jus, pulpe, huile essentielle) : la Flash-Détente.
- [35] Allaf, K., Louka, N., Bouvier, J. M., Parent, F., & Forget, J. M. (1993). Procédé de traitement de produits biologiques en vue de la modification de leur texture, installations pour la mise en œuvre d'un tel procédé et produits ainsi réalisés. Brevet français FR, 93,09720.

- [36] Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 303-313.
- [37] Haswell, S. J., & Kingston, H. M., (1997). *Microwave – Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation, and applications*. American Chemical Society.
- [38] Paré, J. J., Sigouin, M., & Lapointe, J. (1991). U.S. Patent No. 5,002,784. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark office.
- [39] Craveiro, A.A., Matos, F. J., Alencar, J. W., & Plumel, M. M. (1989). Microwave oven extraction of an essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 4(1), 43-44.
- [40] Mengal, P., & Monpon, B. (1996). Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. Brevet Européen, EP, 698(076), B1.
- [41] Lawrence, B. M. (2009). A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries. *Perfumer & Flavorist*. 34(1), 38-44.
- [42] Tse, S. (2007). Lignes directrices pour la mesure du pH en conservation.
- [43] Ruiz-Matute, A. I., Hernandez, O., Rodriguez-Sanchez, S., Sanz, M.L., & Martinez-Castro, I. (2011). Derivatization of carbohydrates for GC and GC/MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 87(17-18), 1226-1240.
- [44] Messaoud, C., & Boussaid, M. (2011). *Myrtus communis* berry color morphs: A comparative analysis of essential oils, fatty acids, phenolic compounds, and antioxidant activities. *Chemistry and Biodiversity*, 8(2), 300-310.
- [45] Ducrotté, P. (1999). Traitement du reflux gastro-oesophagien : Règles hygiéno-diététiques et topiques. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 23(1BIS), S70-S77.
- [46] Meining, A., & Classen, M. (2000). The role of diet and lifestyle measures in the pathogenesis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *The American journal of gastroenterology*, 95(10), 2692-2697.
- [47] Pastre, J., & Priymenko, N. (2007). Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue de médecine vétérinaire*, 1(4), 180-189.

- [48] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
- [49] Burits, M., & Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14(5), 323-328.
- [50] Kakoustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M.F. (2008). Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160-164.
- [51] Villano, D., Fernandez-Pachon, M. S., Moya, M. L., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1),230-235.
- [52] Paun, G., & Zrira, S., Boutakiout, A., Ungureanu, O., Simion, D., Chelaru, C., & Radu, G. L. (2013). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of essential oils from Moroccan aromatic herbs. *Rev Roum Chim*, 58 (11-12), 891-7.

Annexe A

Effet antibactérienne des dilutions de l'HE sur souches bactériennes.



Annexe B

Les appareillages utilisés :

Appareillages
<ul style="list-style-type: none">• Balance de précision.
<ul style="list-style-type: none">• Chauffe ballon.
<ul style="list-style-type: none">• Clévenger.
<ul style="list-style-type: none">• Micropipettes.
<ul style="list-style-type: none">• Plaque chauffante.
<ul style="list-style-type: none">• CG/SM.
<ul style="list-style-type: none">• Les boites pitres.
<ul style="list-style-type: none">• Les disc (d=6mm).

Annexe C

RESULTATS DE LA CINETIQUE D'EXTRACTION DES HES.

Temps (min)	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Rendement %	0	0.0045 45	0.0 22	0.04 09	0.045 45	0.049 99	0.054 54	0.054 54	0.054 54

Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de la menthe poivrée humide.

Temps (min)	0	15	30	45	60	75	90	105	120
Rendement %	0	0.3408 75	0.5113 125	0.5681 25	0.63 63	0.63 63	0.63 63	0.63 63	0.63 63

Cinétique de l'extraction de l'huile essentielle de la menthe poivrée sèche.

Annexe D

Les essais d'extraction d'HE.

	La masse de plante (g)	La quantité d'eau (ml)	La durée d'extraction (min)	Le rendement %
Essai 01	30	500	90	0.23
Essai 02	30	600	55	0.6
Essai 03	30	700	70	1.3
Essai 04	30	750	80	1.93
Essai 05	30	700	90	1.33

Annexe E

Mode d'action et utilisation des huiles essentielles :

Pour qu'elles entrent en action, les huiles essentielles doivent pénétrer l'organisme (friction /massages, inhalation, absorption). Ensuite, c'est grâce à la circulation sanguine qu'elles atteignent les foyers à traiter.

Les HE contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie, l'industrie alimentaire (les arômes) et aussi de l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains tout en utilisant les HE.

Les HE agissent selon leur tropisme ; ce terme signifie que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone en particulier, ces substances volatiles pénètrent les tissus et l'organisme. Il est donc très important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des HE car leur usage peut comporter des inconvénients.

Annexe F

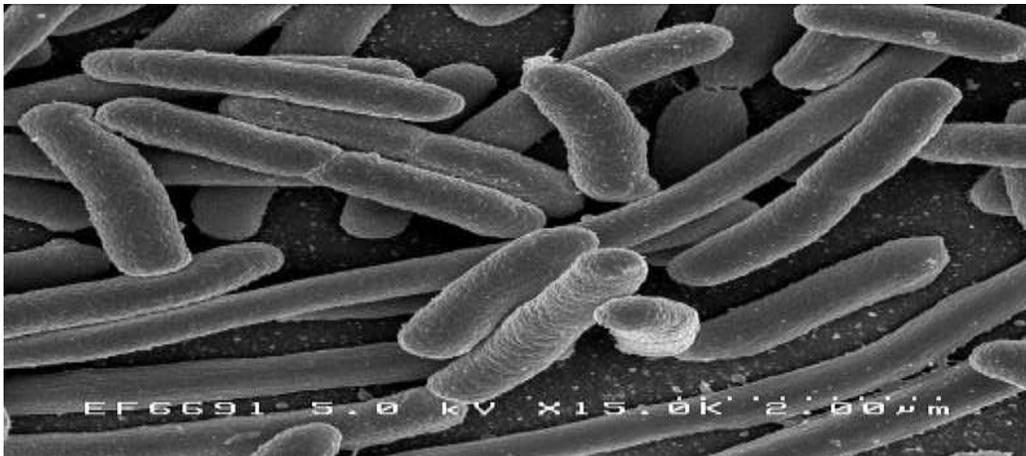
Les bactéries à Gram positif sont mises en évidence par une techniques de coloration appelée coloration de Gram. Cette technique de coloration, qui permet de classifier les bactéries dans deux catégories générales, repose sur les caractéristiques membranaires et de paroi de la bactérie.

Les bactéries à Gram négatif sont mises en évidence par une techniques de coloration appelée coloration de Gram. Les bactéries à Gram négatif apparaissent alors roses au microscope. La technique de coloration repose sur les caractéristiques membranaires et de paroi de la bactérie.

Cela permet de classifier les bactéries et de déterminer rapidement le traitement adapté.

Escherichia coli

Egalement appelée « colibacille » et abrégée en « E.coli », est une bactérie intestinale (Gram négatif) des mammifères, en forme de bâtonnet, très commune chez l'être humain. E. coli est une bactérie anaérobie facultative qui l'on trouve dans l'intestin des vertébrés. En effet, elle compose environ 80% de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'E.coli peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites ou sepsis.

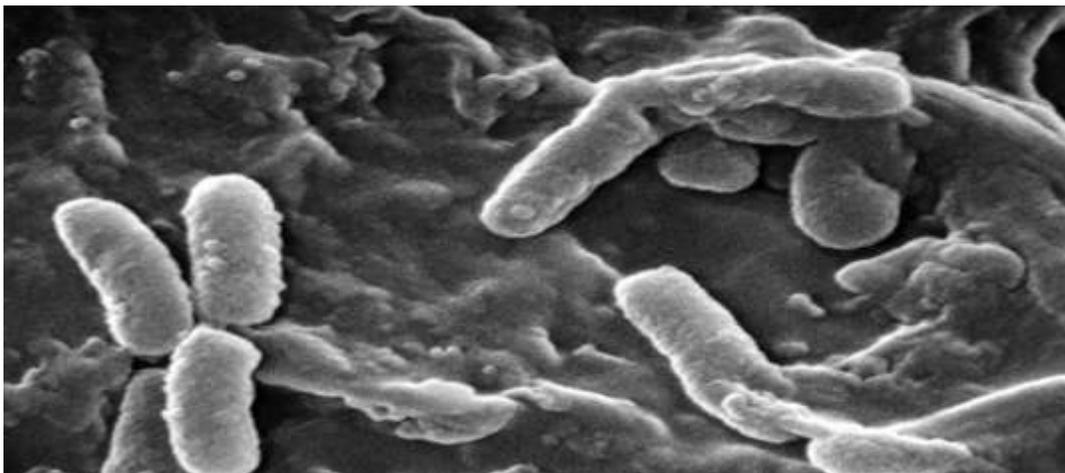


Escherichia Coli au microscope électronique à balayage.

Pseudomonas Aeruginosa

Pseudomonas Aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, bacille du pus bleu ou pyo1, est une bactérie gram-négative du genre *Pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles.

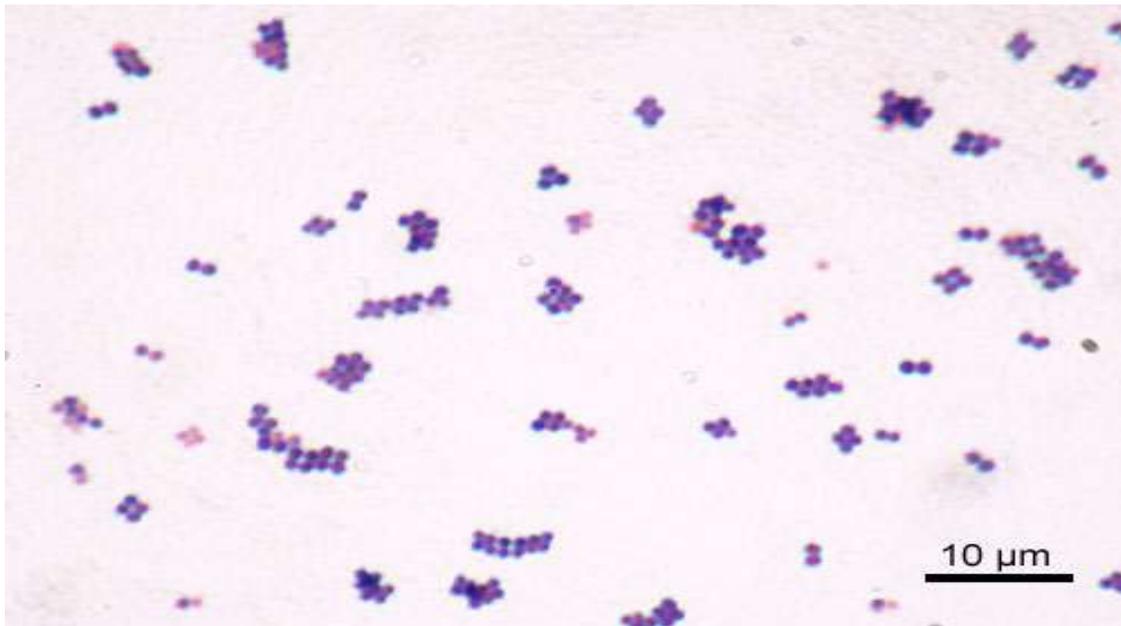
Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram-négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés).



Pseudomonas Aeruginosa au microscope électronique à balayage.

Staphylococcus Aureu

Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles (patient immunodéprimé, prothèses cardiaques). *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin), Gram positif et catalase positif. Sa teneur en caroténoïdes lui confère une couleur dorée à l'origine de son nom.



Microscopic image of *Staphylococcus aureus*.

Annexe G

Cyclohexenone

La cyclohexénone est un composé organique cyclique de formule C_6H_8O . C'est un intermédiaire usuel en synthèse organique pour un grand nombre de produits chimiques, composés pharmaceutiques ou parfums. Elle se présente sous la forme d'un liquide brun foncé de point d'ébullition de 171 à 173 °C.

Cyclohexene

Le cyclohexène est un hydrocarbure de formule brute C_6H_{10} . Il peut être synthétisé par la déshydratation du cyclohexanol, catalysée par un acide ou par la déshydrogénation du cyclohexane.

Menthenol

Le menthol est un composé organique covalent obtenu soit par synthèse, soit par extraction à partir de l'huile essentielle de menthe poivrée ou d'autres huiles essentielles de menthe. Il appartient à la famille des monoterpénols. À température ambiante (20 à 25 °C), il se trouve sous forme de cristaux, d'une couleur blanc cireux. Il fond si l'on augmente légèrement la température. Le menthol a des propriétés anti-inflammatoires et antivirales. Il est d'ailleurs utilisé pour soulager les irritations mineures de la gorge. C'est également un anesthésique local.