

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية و الشعبية

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 de Khemis Miliana



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Technologie.

Mémoire du Projet de Fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master

En

Génie des Procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Thème

**Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de
Rosmarinus officinalis .Application dans la formulation
d'une pommade dermatologique**

Présenté par :

M^{elle} Boukera Abbaci Hamida

M^{elle} Bouheraoua Rahma

Devant le Jury :

Dr .Z. ALICHE

Dr .F.Rahmani

Dr .T. Hamade

Présidente

Examinatrice

Promotrice

Année universitaire : 2022/2023

REMERCIEMENTS

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à «**ALLAH**» de nous avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Tout d'abord, nous tenons à exprimer notre respectueux remerciement à **M^{me} Aliche Zahia**, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant la présidence de jury de notre soutenance.

Nous remercions **M^{me} Rahmani Fethia** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail et participer au jury.

Nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre promotrice **M^{me}. HAMAD TAOUS** d'avoir accepté de diriger ce travail ainsi que pour l'aide qu'elles nous ont apporté et pour leur rigueur scientifique et leur intérêt constant qu'elles ne cessent d'accorder à l'orientation et à la réalisation de ce travail.

Nous désirons encore remercier les enseignants de **l'université de Khemis Miliana**, qui ont fourni tous les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Notre remerciement s'adresse à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvez ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.



Dédicace :

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que je dédie ce mémoire de

Master à :

A Mon très cher Père Hadi : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.

A Ma tendre Mère Lila : Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

A mes sœurs : Fatma Zohra, Ahlam, Aya ,amira

A mes très chère amis : Soumia, Nessrin, ilhem , Houria , Asma

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

A tous ceux qui me sens chers et que i'ai omis de citer.

Hamida

Dédicace :

A l'aide d'ALLAH Tous Puissant, j'ai pu réaliser Ce travail que je dédie spécialement à ma mère et à mon très cher père

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

À mes frères : Mohamed, Ibrahim, Younes

Merci, pour l'encouragement et le soutien moral, merci de m'avoir aidé lorsque j'avais besoin. Vous êtes un cadeau dans ma vie.

À mon Grand-père et grand-mère

À mes très charmantes sœurs : Khayra, Fatiha, Soraya, Zahia et Zakia.

À la source du bonheur pour mon cœur : Abd el-haq

À mon fiancé Mohamed qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance pour toute l'aide lorsqu'on avait besoin et qui m'a beaucoup soutenu et encouragé, Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

À MES CHERS COUSINS et COUSINES

À ma chère amie Sara, pour toutes ces années passées ensemble, pour ton amitié et pour ton soutien. Tu auras toujours une place spéciale dans mon cœur.

Une dédicace particulière à mon amie khawla.

Et bien sûr avec des sincères appréciations à mon partenaire dans la lutte, A ma magnifique

Binôme: Hamida.

Rahma

Table de matière

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations et symboles

Résumé

Introduction Générale	1
I.1 Les huiles essentielles :	3
I.1.1 Bref Histoire :	3
I.1.2 Généralités sur les huiles essentielles :	4
I.1.2.1 Définition selon la norme française AFNOR NT 75-006 :	4
I.1.2.2 Selon la Pharmacopée Européenne :	4
I.1.3 Localisation des huiles essentielles :	5
I.1.4 Composition chimique:	5
I.1.4.1 Terpènes et terpénoïdes:	6
I.1.4.2 Les composés aromatiques:	7
I.1.5.Méthodes d'extraction des HE:	8
I.1.5.1 Entraînement à la vapeur d'eau :	8
I.1.5.3.Hydro-diffusion :	10
I.1.5.4.Expression à froid :	10
I.1.5.5 Extraction par les solvants :	11
I.1.5.6 Extraction assistée par micro- ondes :	11
I.1.5.7.L'extraction au CO2 supercritique :	12
I.1.5.8 Enfleurage:	13
I.1.6 Propriétés physico-chimiques Les huiles essentielles :	13
I.1.7.Méthodes d'analyse:	14
I.1.8 Activité biologique des huiles essentielles :	15
I.1.8.1 Activité antimicrobiennes :	15
I.1.8.2 Activité antioxydant :	16
I.1.8.3 Activité anti-inflammatoire des substances naturelles :	16
I.1.9 Contrôle qualité des huiles essentielles:	16
I.1.10 La toxicité des huiles essentielles:	17
I.1.11 Précautions d'emploi des huiles essentielles :	18
I.1.12 Conservation des huiles essentielles :	19
I.1.13.Applications des huiles essentielles :	19
I.1.13.1 En pharmacie :	19
I.1.13.2 En cosmétique:	20

I.1.13.3.En Parfumerie :	20
I.1.13.4.En dentisterie :	20
I.1.13.5.En diverses industries :	20
I.1.13.6.En agroalimentaire :	21
I.2.Présentation de la plante Rosmarinus officinalis :	21
I.2.1.Historique :	21
I.2.2.Définition :	22
I.2.3.Dénominations internationales :	22
I.2.4 Le romarin porte les dénominations suivantes:.....	22
I.2.5 Classification :	22
I.2.6 Détermination botanique :	23
I.2.7 croissance et le développement de la plante :	24
I.2.7.1 Régions de culture :	24
I.2.7.2 Environnement de culture :	24
I.2.8 Récolte du Romarin :	25
I.2.9 Composition chimique de Rosmarinus officinalis L :	26
I.2.10 L’huile essentielle du Romarin :	27
I.2.11 Propriétés du Romarin:	27
I.2.11.1 Activité antibactérienne :	27
I.2.11.2 Activité Antioxydante :	28
I.2.11.3 Activité anti-inflammatoires :	28
I.2.12 Utilisation traditionnelle et propriétés pharmaceutiques du romarin	28
« Rosmarinus officinalis » :	28
I.3.Formulation de la pommade :	29
I.3.1.Définition de la formulation :	29
I.3.2.Définition des pommades :	29
I.3.3.Types des pommades:	29
I.3.4.Composition :	30
I.3.4.1 Le principe actif :	30
I.3.4.2 Excipients :	30
I.3.4.3 Additifs :	32
I.3.5.Préparation :	32
I.3.6.Contrôle de qualité des pommades :	32
I.3.7.La peau :	33
I.3.8.Structure de la peau :	33
I.3.9 Pénétration à travers la peau:	34
I.4.Conclusion :	35

Chapitre II. Matériels et méthodes	36
II.1 Introduction :	36
II.2 Matériels et méthode :	39
II.2.1 Matériel utilisé :	39
II.2.1.1 Matériel végétal :	40
II.2.2 Méthodes :	40
II.2.2.1 Extraction de l'huile essentielle des feuilles fraîches et sèches de Romarin :	40
II.2.2.1.1 Séchage et conservation :	40
II.2.2.1.2 Teneur en l'eau :	41
II.2.2.1.3 Extraction de l'huile essentielle par hydro- distillation :	42
II.2.2.1.4 Détermination de la cinétique et du rendement d'extraction :	43
II.3 Caractéristiques de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i> :	43
II.3.1 Propriétés Organoleptiques :	43
II.3.2 Propriétés physique de l'HE de <i>Rosemarinus officinalis</i> :	44
II.3.2.1 Potentiel hydrogène (PH) :	44
II.3.2.2 La masse volumique :	44
II.3.2.3 La densité relative :	44
II.3.2.4 L'indice de réfraction :	45
II.3.3 Mesure des indices chimiques :	46
II.3.3.1 Indice d'acide :	46
II.3.3.2 Indice de saponification :	47
II.3.3.3 Indice d'ester :	48
II.3.4 Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie demasse (CPG/SM) :	49
II.4 Activités biologiques :	50
II.4.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE :	50
II.4.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire :	55
II.4.2.1 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par inhibition de la dénaturation thermique des protéines (ovalbumine).	55
II.4.2.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par inhibition de la.....	56
dénaturation thermique des protéines (Albumine sérique bovine BSA) :	56
II.4.3 Activité antioxydante :	57
II.5 Formulation de la pommade :	61
II.5.1 Technique de préparation :	61
II.5.1.2 Matières Premières :	61
II.5.2 Contrôles de qualité réalisée sur la pommade :	63
II.6.Conclusion :	67
Conclusion générale :	87

Références

Liste des figures :

Figure I. 1.Structures histologiques des plantes	5
Figure I. 2.Structures de quelques composés aromatiques.	7
Figure I. 3.Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles.	8
Figure I. 4.Extraction par distillation à la vapeur.	9
Figure I. 5.Principe schématisé de l'hydro-distillation (HD).	10
Figure I. 6.Schéma du procédé d'hydro-diffusion.....	10
Figure I. 7.Dispositif d'extraction assistée par micro-ondes	12
Figure I. 8.Schéma simplifié d'un extracteur au co2 supercritique.	13
Figure I. 9.Rosmarinus officinalis (variété cultivée)	23
Figure I. 10.Optimum écologique: Caractéristique du sol d'après.....	25
Figure I. 11.Optimum écologique : Caractéristiques climatiques d'après.	25
Figure I. 12.Schéma représentant la structure de la peau humaine	33
Figure II. 1.Diagramme général de la procédure expérimentale	37
Figure II. 2.Localisation de la zone étudiée.....	38
Figure II. 3.Photo représentant la partie aérienne de Rosmarinus officinalis.....	41
Figure II. 4.Photo représentant l'extraction de l'HE par hydro-distillation.....	42
Figure II. 5.Photo représentant la détermination de l'indice d'acide.....	47
Figure II. 6.Photo représentant le montage CPG/SM utilisé	50
Figure II. 7.Principe de la diffusion sur disque	51
Figure II. 8.Préparation des différentes dilutions	52
Figure II. 9.Photo représentant les préparations des suspensions microbiennes	53
Figure II. 10.Photo représentant l'étape de l'ensemencement sur la surface gélose d'une boîte.....	54
Figure II. 11. Photo représentant les préparations des solutions.....	55
Figure II. 12. Solution éthanolique de DPPH.....	59
Figure II. 13.Aspect de la phase huileuse	Figure II. 14.Aspect de la phase aqueuse
Figure II. 15.Photo du rhéomètre utilisé.....	66
Figure II. 16.Photographie d'un rhéomètre.....	67
Figure III. 1.Teneur en l'eau du Romarin	68
Figure III. 2.Evolution du rendement d'extraction de l'HE du Romarin sec	69

Liste des figures

Figure III. 3. Influence de la durée d'extraction sur le rendement en HE de Romarin frais	70
Figure III. 4. Rendement des HEs des feuilles sèches et fraîches du Romarin	70
Figure III. 5. Chromatogramme de l'huile essentielle de Romarin	75
Figure III. 6. Distribution en pourcentage des classes chimique de l'HE de Romarin	76
Figure III. 7. Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de Romarin sur les souches : a) Staph. Aureus, b) E. coli, c) Pseudo. Aeruginosa	77
Figure III. 8. Pourcentage d'inhibition de la dénaturation d'ovalbumine	79
Figure III. 9. Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de BSA	80
Figure III. 10. Pourcentage d'inhibition de l'HE de Romarin par méthode du DPPH	81
Figure III. 11. Aspect de la pommade élaboré	83
Figure III. 12. La pommade formulée après centrifugations	83
Figure III. 13. Photo représentant la lecture par papier PH	84
Figure III. 14. Viscosité de la pommade en fonction du gradient de cisaillement	84
Figure III. 15. Méthode d'obtention des puits sur le milieu de culture	85

Liste des tableaux :

Tableau I. 1.Les constituants chimiques de Romarin	26
Tableau I. 2.Classification des excipients pour la préparation des pommade	31
Tableau II. 1.Les lieux des parties expérimentales réalisées	38
Tableau II. 2.Liste des appareillages , des verrerie et des produits utilisées dans notre étude expérimentale	40
Tableau II. 3.Composition chimique et rôle des constituants de la pommade	62
Tableau III. 1.Propriétés organoleptique de l'huile essentielle de Romarin	71
Tableau III. 2.Propriétés physico-chimiques de l'HE du Rosmarinus officinalis	72
Tableau III. 3.Constituants chimique de l'huile essentielle de de Romarin analysée par CG/MS.....	73
Tableau III. 4.La règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition	77
Tableau III. 5. Valeur des diamètres en millimètre de la zone d'inhibition de l'HE du Romarin vis-à-vis des trois bactéries	78
Tableau III. 6.Résultats d'IC50 de l'HE étudiée et l'acide ascorbique	82
Tableau III. 7.Caractéristiques organoleptique de la pommade	82
Tableau III. 8.Mesure de l'activité inhibitrice de la pommade sur différents type de souche	85

Liste des abréviations :

Ab	Absorbance
ADA	Association dentaire américaine
AFNOR	Association Française de Normalisation
ATCC	American type culture collection
C	Concentration
CCM	Chromatographie sur couche mince
CO₂	Dioxyde de carbone
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse
D	Densité
DCFNa	Diclofenal
DI	Diamètre d'inhibition
DMSO	Diméthyle Sulfoxide
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
E.coli	Escherichia coli
HEC	hydroxyéthylcellulose
HE RO	Huile essentielle de Rosmarinus officinalis
IA	L'indice d'acide
IC₅₀	Concentration équivalente requise pour réduire 50% des radicaux libres Initialement présents en solution
Ie	L'indice d'ester
Is	L'indice de saponification
ISO	International Standard Organization
KOH	Hydroxyde de potassium
M	Masse de l'huile
Mg	milligramme
MH	Milieu Mueller Hilton
Min	Minute
ml	millilitre
Ms	Matière végétale sèche

Liste des abréviations

Mv	Matière végétale
PA	Poids de la plante sèche en g
PB	Poids de l'huile en g
PH	Potentiel d'hydrogène
PI	Pourcentage d'inhibition
P.aeruginosa	Pseudo monasaeruginosa
RHE	Rendement de l'huile essentielle
S. aureus	Staphylococcus aureus
SAB	Sabouraud agar
T	Température
UV	Ultra-violet
V	Volume d'huile
°C	Degré celcius
%	Pourcentage

Résumé

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو تحديد التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لكليل الجبل المحصود في منطقة عين الدفلى ، وكذلك تحديد أنشطته البيولوجية. أتاح استخراج الزيت العطري من الجزء العلوي عن طريق التقطير البخاري الحصول على مردود بنسبة 2.566% ، بما يتماشى مع المعايير الدولية. حدد التحليل الكيميائي للزيت العطري بواسطة كروماتوجرافيا الغاز والطيف الكتلي 36 مركب تربيين ، المكونات الرئيسية منها: الكافور (32.078%) ، ألفا بينين (19.2%) ، الكامفين (16.551%) والليمونين (15.128%).

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقة (DPPH) ، أظهرت النتائج أن الزيوت الأساسية لهذا النبات لها نشاط مضاد للأكسدة. تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات ضد ثلاث سلالات بكتيرية (الزائفة الزنجارية ، العصيات القولونية ،المكورات العنقودية) ، وتم أيضا دراسة النشاط المضاد للالتهابات. أظهرت النتائج أن زيت إكليل الجبل العطري له فعالية جيدة لكلا النشاطين .

تم تقييم المرهم المضاد للميكروبات في نفس الدراسة مثل زيت إكليل الجبل العطري.

في الختام ، تؤكد نتائجنا صحة الاستخدام التقليدي لإكليل الجبل كمضاد للالتهابات وكمضاد للميكروبات ومضاد للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: زيت أساسي – مرهم - إكليل الجبل – نشاط مضاد للالتهابات .

Résumé :

L'objectif de ce travail est la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle (HE) de romarin récolté dans la région d'Ain defla. Ainsi que la détermination de ses activités biologiques. L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne de l'espèce par hydro-distillation a permis d'obtenir un rendement de 2,566%, conforme aux standards internationaux. L'analyse chimique de l'huile essentielle par CG/SM a permis d'identifier 36 composés terpéniques, dont les constituants majoritaires sont : l-Camphre (32.078%), α -pinéne (19.2%), le camphène (16.551%) et Limonène (15.128%). En utilisant la méthode (DPPH), nous avons pu montré que l'huile essentielle de Romarin présente une activité antioxydante . L'activité antimicrobienne contre trois souches bactériennes a été étudiée (Pseudomonas aeruginosa, Esherichia coli, Staphylococcus aureus), ainsi que l'activité anti-inflammatoire. Ces analyses ont montré que l'huile essentielle de romarin avait une bonne efficacité. Le pouvoir antimicrobien de la pommade élaboré a également été évalué dans la même étude que l'huile essentielle de romarin.

En conclusion, nos résultats confirment le bien-fondé de l'utilisation ethnopharmacologique de l'huile essentielle de romarin comme anti-inflammatoire, antimicrobienne et antioxydant.

Mots clés : huile essentielle – romarin - pommade – activité anti-inflammatoire

Abstract:

The objective of this work is the determination of the chemical composition of the essential oil (EO) of rosemary harvested in the region of Ain defla. As well as the determination of its biological activities. The extraction of the essential oil from the aerial part of the species by hydro-distillation made it possible to obtain a yield of 2.566%, in line with international standards. Chemical analysis of the essential oil by CG/MS has identified 36 terpene compounds, the main constituents of which are: 1-Camphor (32.078%), α -pinene (19.2%), camphene (16.551%) and Limonene (15.128%).

Using the (DPPH) method, the results showed that the essential oils of this plant have antioxidant activity. Antimicrobial activity against three bacterial strains was studied (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*), and anti-inflammatory activity. The results showed that rosemary essential oil had good efficacy

The ointment's antimicrobial powers were also evaluated in the same study as rosemary essential oil.

In conclusion, our results confirm the validity of the ethnopharmacological use of rosemary as an anti-inflammatory and as an antimicrobial and antioxidant.

Key words: essential oil – rosemary - ointment – anti-inflammatory activity

Introduction Générale

Introduction Générale

Les huiles sont des substances grasses, hydrophobes, onctueuses et inflammables, d'origine végétale, animale ou minérale, généralement liquides. Elles se différencient des graisses qui sont pâteuses dans les conditions normales [1].

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues. [2]

Les plantes médicinales et aromatiques furent utilisées par l'homme depuis l'Antiquité. De nos jours leur utilisation a pris un essor considérable dans les industries de parfum, produits cosmétiques et pharmaceutiques. Les plantes sont la source principale de substances actives où au moins 35 000 espèces sont utilisées dans le monde. [3]

En Algérie, les plantes ont une importance dans la médecine traditionnelle (phytothérapie). Les remèdes utilisant les plantes sont moins chers et sans effets indésirables. La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, saharienne et paléotropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. [4]

Le Romarin, considéré comme ayant des usages condimentaires et/ou alimentaires, se retrouve dans la cuisine méditerranéenne ; c'est aussi une plante mellifère. Le Romarin fait également partie de la liste A (« Plantes médicinales utilisées traditionnellement en allopathie et, pour certaines d'entre elles, en homéopathie ») des plantes médicinales inscrites à la pharmacopée Française. [3]

Dans l'industrie pharmaceutique, les pommades sont fabriquées en faisant fondre l'huile et les phases aqueuses dans deux récipients chemisés séparés avec des agitateurs pour un mélange correct. Les deux phases sont transférées au récipient principal d'onguent par des vannes et des tuyaux. Les agitateurs supplémentaires dans la cuve principale assurent l'agitation. Pendant tout le déroulement de l'opération, un mélange homogène de tous les composants (base + médicament) est crucial. [5]

Ce travail vise à examiner la composition chimique et les propriétés biologiques des huiles essentielles de romarin dans le but de développer une pommade principalement anti-inflammatoire. De plus, il inclut la vérification de la qualité des pommades obtenues.

La première partie de ce travail comprendra une revue bibliographique détaillant la description utilisée, les huiles essentielles et les aspects généraux de la pommade.

La deuxième partie du document présentera le matériel et les méthodes utilisés, y compris l'extraction

des huiles essentielles et l'analyse de leur composition chimique. L'étude de l'activité biologique des huiles essentielles et de la pommade sera également incluse dans cette deuxième partie.

Les résultats obtenus seront suivis d'une discussion, puis d'une conclusion et de perspectives qui constitueront respectivement la deuxième et la troisième partie. Finalement, les références bibliographiques seront fournies dans la dernière partie du document.

Partie Bibliographique

Chapitre I:
Chapitre I:
Recherche bibliographique
Recherche bibliographique

Chapitre I. Recherche bibliographique

Les huiles essentielles jouent un rôle important dans de nombreux domaines en raison de leurs propriétés thérapeutiques, de leur parfum agréable et de leur utilité dans diverses applications.

Dans la thérapeutique, les huiles essentielles sont utilisées sous plusieurs formes, surtout dans les médicaments destinés à être appliqués sur la peau.

Les pommades, crèmes et gels à base d'huiles essentielles offrent plusieurs avantages. Ils permettent une application locale ciblée, concentrant ainsi l'action thérapeutique des huiles essentielles sur une zone spécifique du corps. Ces formulations sont souvent utilisées pour soulager les douleurs musculaires et articulaires, les maux de tête, les problèmes de peau et d'autres affections. Des généralités sur les huiles essentielles et les pommades sont présentées dans ce chapitre.

I.1 Les huiles essentielles :

I.1.1 Bref Histoire :

Les gens ont longtemps cherché des moyens de séparer les composants huileux des produits parfumés. Ils l'ont fait en soumettant la matière à la chaleur. Les substances aromatiques se transforment en vapeurs, il suffit de les collecter et de les refroidir pour obtenir une forme liquide. Le processus se fait sur une flamme nue, d'où le nom de distillation. Les propriétés médicinales et aromatiques des plantes sont connues des Chinois et des Indiens depuis le 20e siècle avant J.-C. : Égyptiens et Arabes l'ont emporté : conservation des momies, aromatisation des bains, utilisation d'onguents, parfum pour la désinfection des plaies et production de boissons aromatiques. Au plus fort de leur conquête de l'Afrique du Nord et de l'Espagne, les Arabes ont fait connaître la culture aux Espagnols, qui à leur tour l'ont propagée en Europe à travers les territoires du Royaume d'Aragon, sur toute la côte nord de la mer méditerranée. [6]

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, Avicenne, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques. Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique.

Parallèlement, leur utilisation a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice GATTEFOSSE a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il amenait de nombreux travaux concernant les

huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses Autres recherches. [7]

C'est Geber (721-815), qui mentionna le premier de façon écrite, la description de la distillation « sèche » et celle par intermédiaire de l'eau, mais l'alambic reste incontestablement associé à Avicenne (930-1037). Giovanni Baptistadella Porta (1540-1615), dans son célèbre ouvrage "Dedestillatione" parut en 1567, mentionne les connaissances avancées des Arabes dans le domaine de la distillation. Ensuite, les huiles essentielles vont bénéficier des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. En 1866, le terme " terpène " fut utilisé pour la première fois par Kekule désignant la classe des composés les plus répandus des huiles essentielles. En 1953, le chimiste Léopold Ruzika proposa une nomenclature pour les dérivés isopréniques. Depuis, l'ère industrielle a pris peu à peu le pas sur un certain empirisme et développèrent ainsi de nouvelles techniques de distillation.

Dans les années 1960-1970, le docteur Jean Valnet, médecin militaire français, utilisa avec grand succès les HE sur les champs de bataille lors de la guerre d'Indochine. La publication de son ouvrage aromathérapie, lança une nouvelle vague d'intérêt, tant chez le grand public que dans le corps médical et paramédical intéressé par le fait d'intégrer cette thérapeutique à leur arsenal de soins. En 1975, Pierre Franchomme, fondateur de l'École internationale d'aromathérapie, aromatology et pharmacologue reconnu, responsable. D'enseignement et chargé de cours, écrivit un livre de référence : L'aromathérapie exactement. [8]

I.1.2 Généralités sur les huiles essentielles :

Le terme « huile essentielle » est défini à la fois par l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) pour les usages pharmaceutiques et cosmétiques et par l'AFNOR/ISO pour les usages aromatiques et alimentaires.

I.1.2.1 Définition selon la norme française AFNOR NT 75-006 :

L'AFNOR donne la définition suivante (Norme NF T 75-006) : « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation «sèche». L'huileessentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques». [9]

I.1.2.2 Selon la Pharmacopée Européenne :

Selon la Pharmacopée Européenne : Une huile essentielle est définie comme étant un produit odorant,

généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. [10]

I.1.3 Localisation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont largement distribuées dans le règne végétal, et les familles les plus aromatiques sont les conifères, les rutacées, les myrtacées, les ombellifères, les lamiacées, les Yaksacées...etc. Ces essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétoires isolées (comme dans le cas des Lauracées et des magnoliacées), mais elles se trouvent le plus souvent dans des organes sécrétoires spécialisés et variables selon les familles de plantes. On peut citer par exemple les trichomes sécrétoires des Lamiacées, les poches sécrétoires des Rutacées et les conduits sécrétoires des conifères. L'appareil de sécrétion peut être externe, comme chez de nombreuses plantes de la famille des labiatae, ou interne, comme chez divers eucalyptus (myrtaceae). [11]

Dans les plantes, les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles peuvent être stockées dans divers organes: fleurs, feuilles, fruits, tiges, Rhizomes, racines, bois ou écorces.

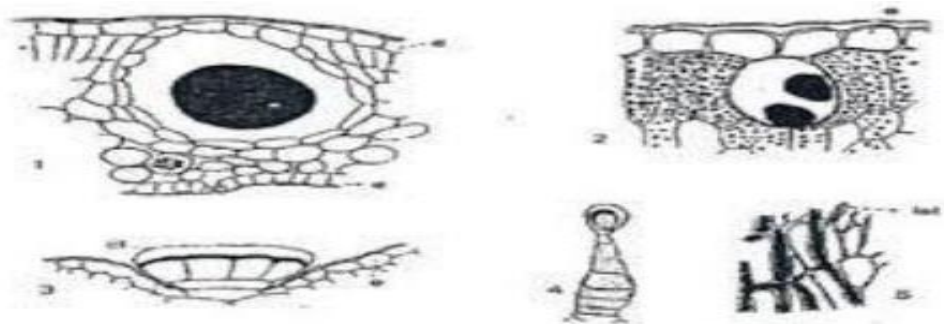


Figure I. 1. Structures histologiques des plantes [12]

I.1.4 Composition chimique:

Les huiles essentielles sont des mélanges variables et complexes de différents composés qui se dissolvent

les uns dans les autres pour former une solution homogène. Les principaux constituants des huiles essentielles appartiennent presque exclusivement à deux groupes aux caractéristiques d'origine biologique différentes : d'une part les terpénoïdes et d'autre part les composés aromatiques dérivés du phényl-propane. [13]

I.1.4.1 Terpènes et terpénoïdes:

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base : isoprène, Hémiterpène (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20). Ils représentent le groupe le plus important. [14]

• **Monoterpènes:**

Plus de 900 monoterpènes connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales : les monoterpènes acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90 % d'HE. Dans cette catégorie de composés, il existe de nombreuses molécules fonctionnalisées, à savoir, par exemple:

- Alcools: acyclique (géraniol, citronellol), monocycliques (menthol), bicycliques (bornéol).
- Aldéhydes : le plus souvent acycliques (géraniol, néral, citronellal)
- Cétones : acycliques (tagétone), monocyclique (menthone, isomenthone, carvone, pulégone), bicycliques (camphre, fenchone).
- Esters : acycliques (acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle), monocycliques (acétate de menthyle), bicycliques (acétate d'isobomyle)
- Ethers : 1,8-cinéole eucalyptol) mais aussi les éthers cycliques tétrahydrofuriques ou di- et tétrahydropyraniques qui pour certains jouent un rôle majeur dans l'arôme des fruits (oxyde de linalol ou de Rose).
- Peroxydes : ascaridole.
- Phénols : thymol, carvacrol. [15]

▪ **Sesquiterpènes:**

C'est la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules. Les variations structurales dans cette série ne sont de même nature que dans le cas précédent, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents. [16]

I.1.4.2 Les composés aromatiques:

Les composés aromatiques sont des dérivés du phényl-propane. Ils sont moins abondants que les terpènes. Deux classes de composés aromatiques peuvent être distinguées: les composés substitués sur le noyau de benzène et les dérivés dans lesquels le substituant est directement attaché au cycle benzénique de la chaîne latérale des composés substitués. [11]

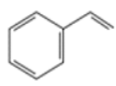
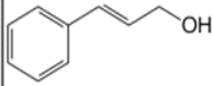
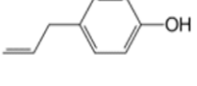
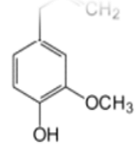
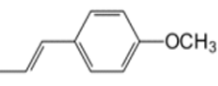
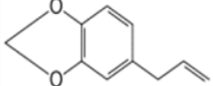
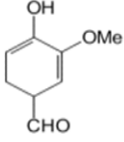
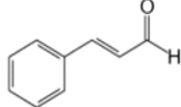
Composés Aromatiques				
	Styrene benzene	Cinnamyl alcohol alcohol	Charvicol phenol	Eugenol phenol
				
Anethol Methoxy derivative	Safrol Methylene dioxy compound	Vaniline Phenol	Cinnamaldehyde phenol	

Figure I. 2. Structures de quelques composés aromatiques.

Figure I. 2. Structures de quelques composés aromatiques . [11]

- **Composés d'origine diverse:**

En général, ils sont de faibles poids moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation, sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée porteurs de différentes fonctions par exemple : l'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille. [17]

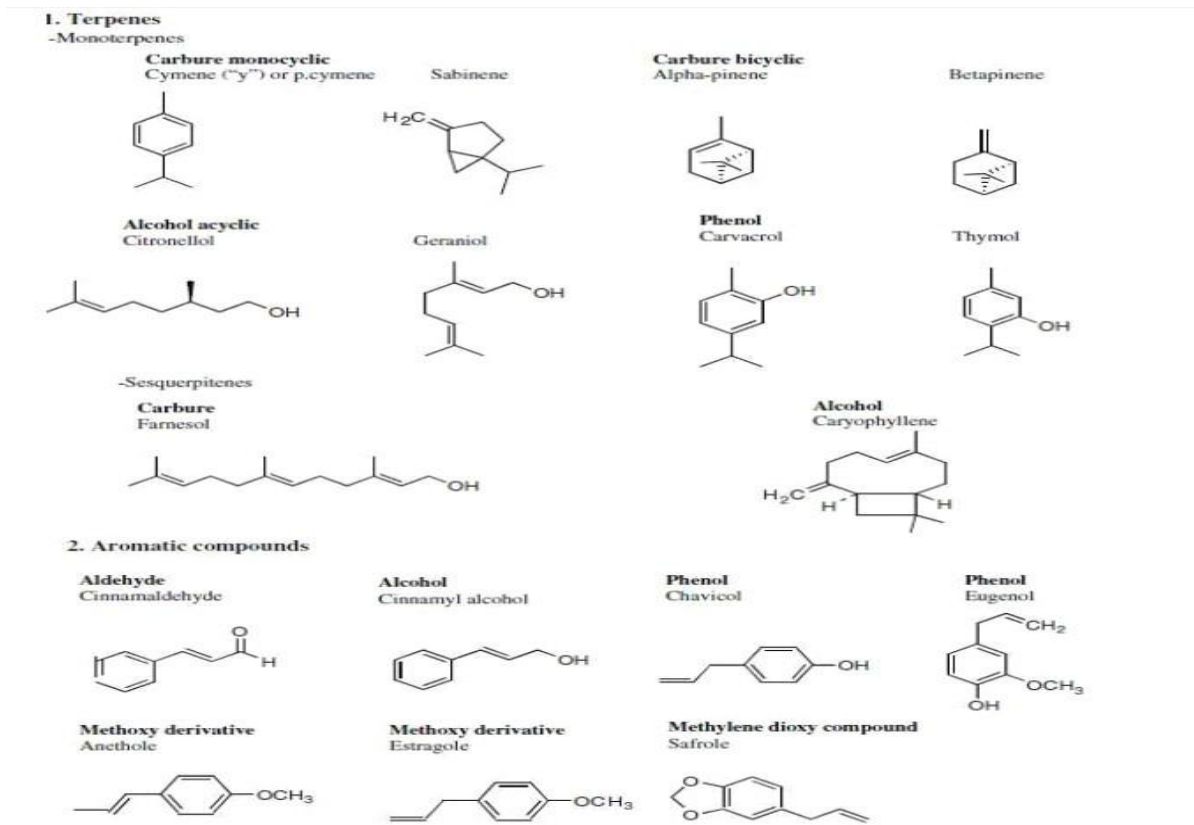


Figure I. 3. Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles. [18]

I.1.5.Méthodes d'extraction des HE:

Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction des HE :

I.1.5.1 Entraînement à la vapeur d'eau :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. À la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la

qualité de l'huile. [19]

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. [20]

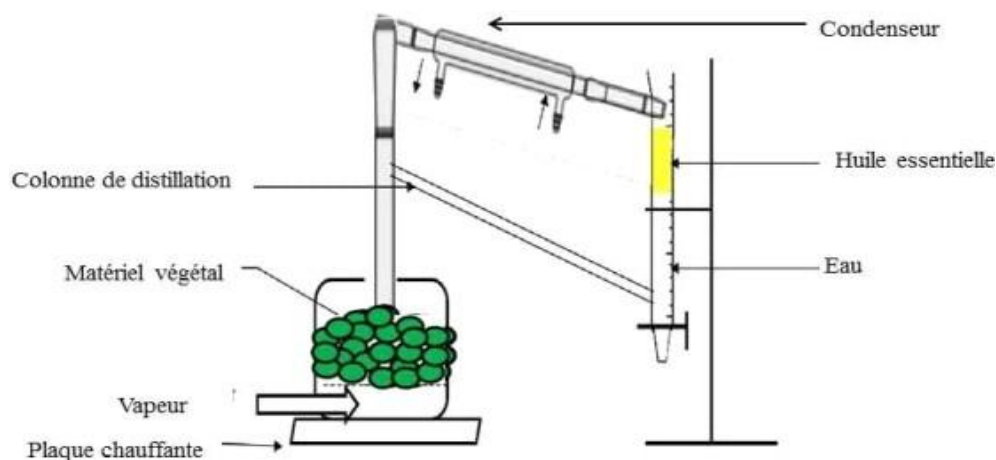


Figure I. 4.Extraction par distillation à la vapeur. [21]

I.1.5.2.Extraction par Hydro-distillation :

Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. L'hydrodistillation peut s'effectuer sans ou avec retour d'eau dans le ballon. Ce recyclage est dit cohobage et le système conçu pour l'opération est appelé Clevenger. Son intérêt majeur réside dans l'utilisation du système de cohobation permettant une distillation en continu sans modifier la quantité en eau du ballon. [22]

En laboratoire le système équipé d'une cohobe qui est généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. [20]

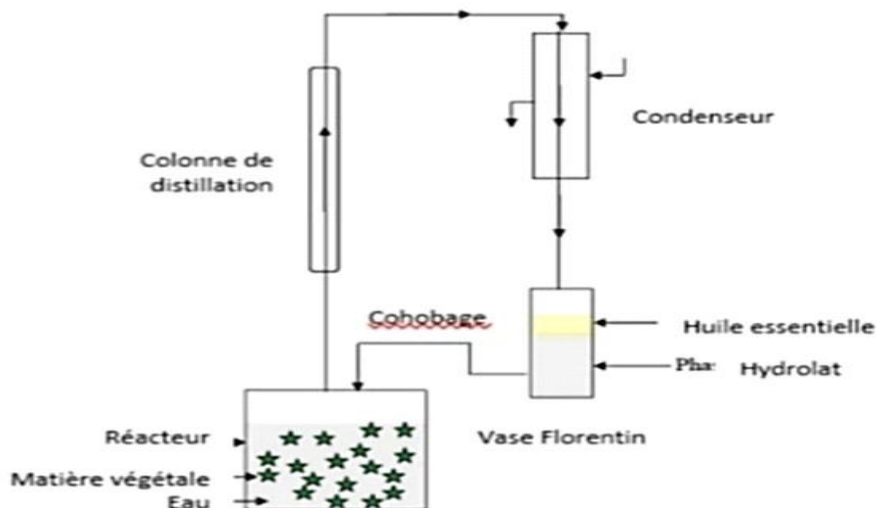


Figure I. 5.Principe schématisé de l'hydro-distillation (HD). [23]

I.1.5.3.Hydro-diffusion :

L'hydro-diffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydro-diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur. [10]

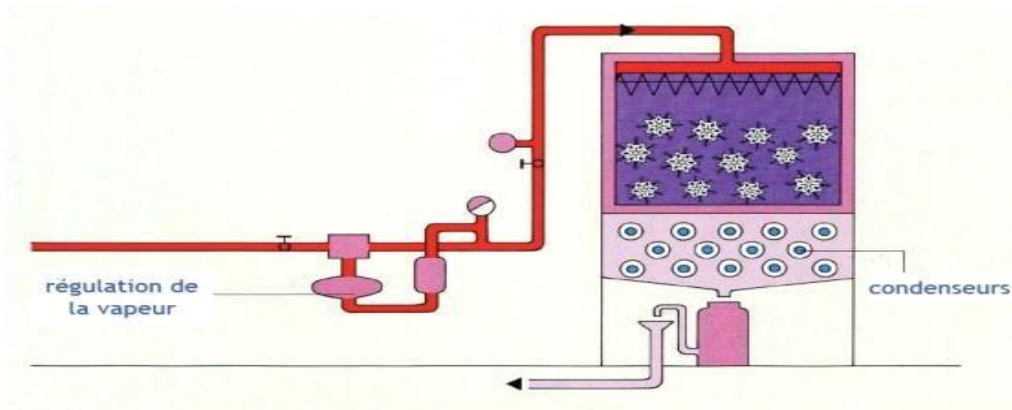


Figure I. 6.Schéma du procédé d'hydro-diffusion. [6]

I.1.5.4.Expression à froid :

Cette technique est dédiée à l'extraction des arômes volatils contenus dans l'écorce des agrumes en les

déchirant mécaniquement. Il s'agit de briser ou de déchirer la paroi du sac contenant de l'huile contenue dans le mésocarpe, l'exocarpe, situé juste en dessous de la Peau externe du fruit, pour recueillir le contenu non altéré. [23]

I.1.5.5 Extraction par les solvants :

L'extraction par les solvants est un procédé inspiré de l'enfleurage qui utilise des solvants non aqueux. Il peut s'agir de l'hexane, d'éthers de pétrole, d'huiles, de gaz... Le solvant idéal devant répondre aux critères suivants :

- Être sélectif : extraire les molécules aromatiques mais pas les molécules indésirables comme les pigments.
- Avoir une température d'ébullition basse, pour permettre une élimination simple.
- Être chimiquement inerte vis-à-vis des substances à extraire.
- Ne pas être miscible à l'eau, qui rendrait la purification de l'extrait plus délicate.
- Être peu coûteux.
- Ne pas présenter de contre-indication dans les domaines d'application de l'extrait obtenu.
- Ne pas être inflammable.
- Présenter la plus faible toxicité possible.

Aucun solvant ne remplit la totalité de ces conditions, mais le plus utilisé est l'hexane.

L'aspect intrigant de ces solvants est leur capacité exceptionnelle à extraire les parfums dans une plus grande mesure que celle de l'eau. Néanmoins, leur fonction ne se limite pas à l'évacuation des seules substances volatiles. L'inconvénient des solvants organiques est leur potentiel de toxicité, ce qui réduit l'utilisation des extraits résultants (appelés «concrets»), en particulier dans les domaines de l'agriculture et de la médecine. [24]

I.1.5.6 Extraction assistée par micro-ondes :

Cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Les parties du végétal le plus riche en eau, comme les vacuoles, absorbent les ondes puis les convertissent en chaleur, engendrant une augmentation rapide et soudaine de la température au sein de ces structures. Ces dernières éclatent sous la pression régnant dans l'extracteur, libérant ainsi les molécules olfactives. Puis les vapeurs d'eau entraînent l'HE. 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.

Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction, les rendements en huiles essentielles obtenus sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation. [25]

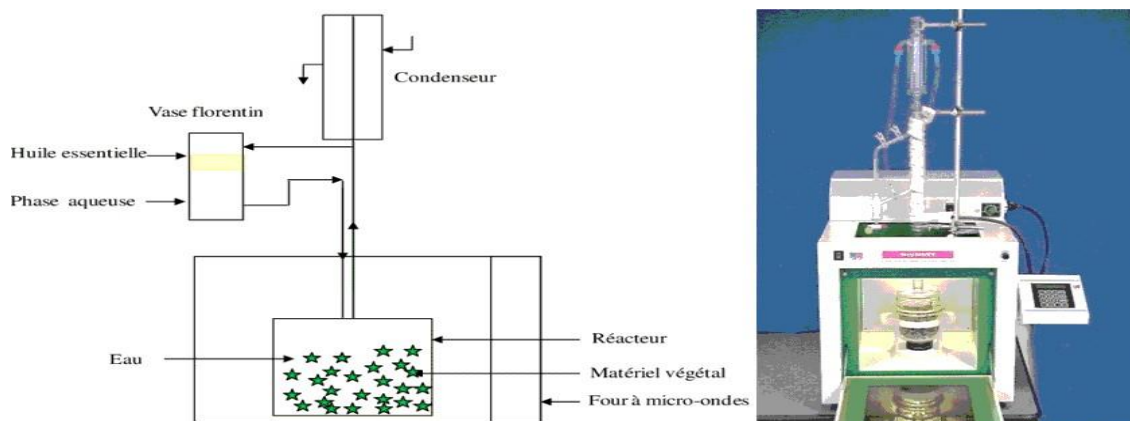


Figure I. 7. Dispositif d'extraction assistée par micro-ondes. [25]

I.1.5.7.L'extraction au CO₂ supercritique :

Cette technique, parmi les plus modernes mais aussi très coûteuse, utilise du CO₂ à l'état supercritique, obtenu sous certaines conditions (compression à 70 bars et chauffage à 30°C environ). L'état supercritique est un état particulier de la matière dont les propriétés physiques se situent entre celles d'un liquide et d'un gaz.

Le principe repose sur le passage d'un courant de CO₂ supercritique à travers des fragments de végétaux, ce qui va faire éclater les poches à essence. Puis le CO₂ chargé en éléments volatils est décomprimé, se retrouvant sous forme gazeuse et les substances aromatiques sont récupérées sous forme liquide.

Cette méthode innovante permet d'obtenir une composition en HE de laurier noble comparable à celle de la distillation. Les avantages sont multiples : préservation des molécules de l'HE (basses températures, non-utilisation d'eau), procédé écologique (recyclage du CO₂), sécurité d'utilisation du gaz extracteur pour la santé. Le coût élevé reste cependant un frein pour une utilisation plus fréquente dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique. [26]

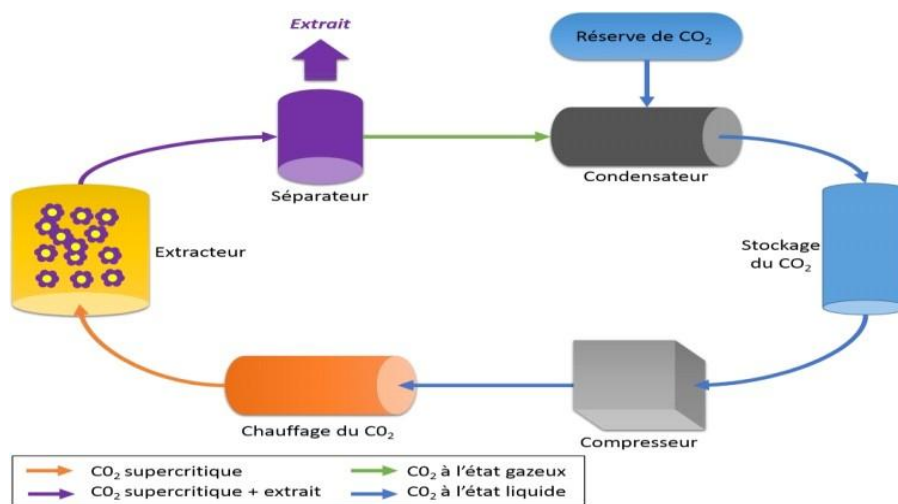


Figure I. 8. Schéma simplifié d'un extracteur au CO₂ supercritique. [24]

I.1.5.8 Enfleurage:

L'enfleurage est une ancienne méthode utilisée pour l'extraction des plantes aromatiques destinées surtout à la parfumerie. Le principe consiste à placer les fleurs odorantes dans la graisse, afin de laisser les arômes y pénétrer. Une fois saturée, celle-ci est ensuite lavée à l'alcool pour extraire les composés odorants. L'alcool obtenu est ensuite évaporé pour donner l'absolue. Cette méthode est peu utilisée de nos jours à cause de l'utilisation de la graisse animale et du coût de production élevé. Elle a été remplacée par l'extraction aux solvants. [21]

I.1.6 Propriétés physico-chimiques Les huiles essentielles :

Sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraîna- bles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau [27]. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau [8].

Leur densité est le plus souvent inférieure à 1, seules trois huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffran. [28]

I.1.7.Méthodes d'analyse:

Les méthodes d'analyses des huiles essentielles peuvent être classées en deux groupes distincts:

- les analyses qui ont pour but de définir les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, indice d'acide, indice d'ester, etc.).

Ses caractéristiques propres à chaque essence servent de critère de qualité dans les transactions commerciales entre producteurs et acheteurs. Les méthodes de détermination à utiliser sont décrites dans le recueil de normes françaises "huiles essentielles" édité par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et dans le recueil de normes de l'International Standard Organisation (ISO).

- celles qui ont pour objet l'identification qualitative et quantitative, des différents constituants d'une huile essentielle (CPG, CG/SM, CG/FTIR, HPLC, RMN, IR, etc.).

La chromatographie en phase gazeuse est la technique la plus utilisée pour ce type d'analyse. Le chromatographe peut être couplé à différents types de détecteurs, les plus utilisés sont: le détecteur à ionisation de flamme (FID), le détecteur de masse (SM) et de plus en plus le détecteur infrarouge à transformateur de Fourier (FTIR). [13]

➤ **Analyse par chromatographie:**

- **Chromatographie en phase gazeuse (CPG):** Il s'agit d'une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilissables sans dégradation (non thermolabiles). Son pouvoir de séparation dépasse celui de tous les autres techniques, du moins pour les huiles essentielles.

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent plus son intérêt. [29]

- **La spectrométrie de masse:**

Est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. [30]

- **CPG couplée avec spectromètre de masse (GC-MS) :**

L'analyse des échantillons a été faite avec l'appareil GC-MS du type AGILENT 6890 (GC/CMSD 5973), équipé d'un HP5 MS, de colonne capillaire (30 m × 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25µm). Le détecteur est Quadripôle de 70-eV EI. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml / min. La température de l'injecteur est de 250°C avec une ligne de transfert MS de 220°C. La température de la colonne est maintenu à 50 °C, pendant 2 min, puis augmentée progressivement (à une vitesse de 3°C/min), pour atteindre 250 °C, après 10 min. Les échantillons sont dilués dans n-pentane (1/100 (v/v)) et 1µL a été injecté, manuellement, en utilisant un mode splitless. [31]

- **Chromatographie sur couche mince (CCM):**

Cette technique est intéressante pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements, on peut la coupler également à un analyseur de masse. [32]

I.1.8 Activité biologique des huiles essentielles :

Les HE possèdent de nombreuses activités. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine fongique, contre les dermatophytes, celles d'origine bactériennes, par exemple contre les bactéries endocanaliaires.

Elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique.

Les HE possèdent des profils de composition chimique différents, elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. [11]

I.1.8.1 Activité antimicrobiennes :

C'est en 1875 que Buchholtz avait mis en évidence pour le premier foie que les HEs sont doués d'une activité biocide envers les microorganismes.

Cette activité biologique est généralement attribuée à certaines molécules communes dans les HEs. Les molécules oxygénées des HEs sont parmi les plus actives envers les microorganismes, notamment les

alcools, et en moindre degré, les aldéhydes et les cétones.

Selon la bibliographie, les HEs sont parmi les métabolites secondaires les plus actifs vis-à-vis des microorganismes. Ces substances volatiles possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne contre non seulement les bactéries, y compris les espèces multi résistantes, mais aussi vis-à-vis des champignons et les virus. Toutefois, il existe une disparité dans l'activité antimicrobienne des HEs, car elle est plus dirigée envers les champignons que les bactéries et beaucoup plus active contre les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. [33]

I.1.8.2 Activité antioxydant :

Les cellules et tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dues à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène. [34]

I.1.8.3 Activité anti-inflammatoire des substances naturelles :

Sur le marché, la plupart des médicaments anti-inflammatoires sont chimiquement fabriqués, bien que ces médicaments soient assez puissants, l'administration à long terme entraîne des effets secondaires comme l'intolérance gastrique. C'est dans cette lumière qu'on s'est intéressé aux remèdes naturels à partir des végétaux, tel que certains composés d'huiles essentielles qui ont un effet anti-inflammatoire similaire à celui des médicaments de synthèses avec très peu d'effets secondaires. Parmi les molécules ayant un pouvoir anti-inflammatoire, nous pouvons citer les coumarines, les ester monoterpéniques, les aldéhydes monoterpéniques et les sesquiterpènes. [35]

I.1.9 Contrôle qualité des huiles essentielles:

À l'officine, il est nécessaire de s'assurer que les HE portent mention de critères qualitatifs réglementaires qui sont les suivants :

- la dénomination de l'HE selon sa nomenclature binomiale internationale : nom de genre et d'espèce, suivis de la variété de la plante si elle existe. Cette dénomination se fait en latin.

- l'organe producteur : la composition biochimique de l'HE peut varier en fonction de la partie de la plante qui est distillée.
- la spécificité biochimique ou chémotype : la même plante aromatique peut produire des HE de spécificités différentes en fonction de leur origine géographique, de leur biotope et de leur équipement génétique.
- l'origine géographique de la plante aromatique : le pays d'origine du végétal ainsi que son biotope permettent à la plante d'élaborer son essence.
- le mode de culture et de récolte de la plante : il s'agit de préciser l'environnement dans lequel s'est développée la plante : sauvage, semi-sauvage, culture biologique ou non.
- les analyses et contrôles réalisés en laboratoires : tous les lots d'HE doivent subir avant commercialisation un examen organoleptique (demandé par les normes ISO et la Pharmacopée), des analyses physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol à 80 %), des analyses chimiques (indice d'acide, durée de saponification), une chromatographie en phase gazeuse et sur couche mince pour avoir la composition qualitative et quantitative de l'HE.
- HE garantie « 100 % pure et naturelle » : elle doit être non modifiée, non diluée, non déterpénée, non rectifiée et non reconstituée. En effet, après extraction, l'HE doit être simplement décantée et filtrée.

Quant à ces critères de qualité qui demandent des compétences, il faut rester vigilant et alerter sur le fait que de nombreux circuits de distribution autres que le circuit pharmaceutique se met en place face à une demande en hausse. [36]

I.1.10 La toxicité des huiles essentielles:

Les huiles essentielles ne sont pas des produits sans risque ; ce qui est, généralement, le cas de tous les produits naturels certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leurs pouvoirs irritants (huiles riches en thymol ou en carvacrol) et/ou allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde).

D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique (huiles riches en α -thujone). Il existe, aussi des huiles essentielles dont certains composés sont capables de provoquer le cancer. C'est le cas de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes tels que le saffrole (Sassafras), l'éstragole (*Artemisiadracunculus*), la

β -asarone (Acaruscalamus) et le méthyle-eugénol. Par ailleurs, certaines recherches ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés, chez les rongeurs. [31]

I.1.11 Précautions d'emploi des huiles essentielles :

Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires.

- Il ne faut jamais injecter d'huiles essentielles par voie intramusculaire ou veineuse.
- Les personnes présentant un terrain allergique doivent systématiquement procéder à un test allergique de tolérance : en mettant par exemple deux gouttes d'huile essentielle dans le pli du coude et en observant toute réaction cutanée.
- Certaines huiles essentielles pures sont dermocaustiques (agressives pour la peau), comme l'huile essentielle de thym vulgaire. Il faudra donc les diluer dans une huile végétale (amande douce, olive...).
- Il faut toujours respecter les voies d'absorption indiquées ainsi que la posologie.
- Il faut appliquer une fenêtre thérapeutique lors d'une utilisation prolongée d'huile essentielle.
- Il faut se laver les mains après toute application cutanée.
- Il ne faut jamais appliquer d'huile essentielle pure sur les yeux, le nez, le conduit auditif, les muqueuses ano-génitales. Il existe des exceptions avec l'huile essentielle de Géranium bourbon utilisée dans les saignements de nez ou par exemple, l'huile essentielle de Giroflier utilisée pour soigner les aphtes. En cas de contact ou d'ingestion accidentel, il ne faut pas utiliser de l'eau mais diluer avec une huile végétale de qualité. En effet, les huiles essentielles ne sont pas solubles dans l'eau.
- Il faut s'adresser au centre antipoison pour de plus amples renseignements en cas de doute.
 - Il ne faut pas mettre sur la peau des huiles essentielles avant toute exposition au soleil. Certaines sont photosensibles ou peuvent provoquer des taches sur la peau comme les essences de zestes (Mandarine, Citron...).
 - Il est interdit de faire des aérosols d'huiles essentielles aux patients allergiques et asthmatiques sans contrôle médical, ainsi que chez les personnes ayant des antécédents épileptiques ou convulsifs.
- Il faut faire attention aux interactions avec les traitements des patients. Les huiles essentielles peuvent

interagir avec un médicament. Par exemple, l'huile essentielle d'ail stimule la thyroïde alors que celle de fenouil diminue son activité.

-Il faut éviter d'utiliser l'huile essentielle de *Mentha piperata* sur une zone trop étendue du corps car elle peut provoquer des convulsions, un effet vasoconstricteur et anesthésiant. Elle est fortement contre-indiquée chez la femme enceinte, et chez le nourrisson jusqu'aux enfants âgés de moins de sept ans.

-Il faut éviter de laisser les flacons à la portée des enfants. [37]

I.1.12 Conservation des huiles essentielles :

La relative instabilité des molécules constitutives des HE implique des précautions particulières pour leur conservation.

Il faudra donc les conserver dans des flacons secs et propres qui peuvent être en aluminium vernissé, en acier inoxydable ou en verre teinté anti-actinique, fermés de façon étanche et presque intégralement remplis (la petite fraction du volume restant devant être remplie d'azote ou d'un autre gaz inerte).

Le flacon doit par ailleurs être conservé à l'abri de la chaleur et de la lumière. Une fois ouvert, on peut rajouter des petites billes de verre dans le flacon pour limiter l'oxydation. Les normes AFNOR NF T 75-001 et 75-002 définissent les conditions de conservation en matière d'emballage des HE.

L'étiquetage doit comporter la désignation commerciale de l'HE, le nom (latin) de la plante et de la partie de la plante dont elle est extraite, la technique de production, l'éventuel traitement qu'elle a subi, la date de péremption et le numéro de lot. [27]

I.1.13. Applications des huiles essentielles :

I.1.13.1 En pharmacie :

L'objectif de la Pharmacopée européenne est de participer à la protection de la santé publique, en élaborant des spécifications communes destinées à tous les professionnels de la santé, et principalement, de veiller à la qualité des médicaments, garantissant ainsi leur qualité pharmaceutique. Il y a 7 huiles essentielles inscrites à la pharmacopée européenne : huile essentielle d'anis, eucalyptus, clou de girofle, fleur d'oranger amer, lavande, menthe poivrée et de thym. Les huiles essentielles ont en effet:

- **Un pouvoir antiseptique :** Contre des bactéries variées ainsi que des champignons et levures. s. Citons les huiles essentielles de thym, girofle, lavande, eucalyptus. Le thymol, constituant principal de l'huile essentielle de thym, est 20 fois plus antiseptique que le phénol.
- **Des propriétés spasmolytiques et sédatives :** Certaines drogues à huiles essentielles (menthe, verveine) sont réputés efficaces pour diminuer les spasmes gastro-intestinaux. L'amélioration de certaines insomnies et de troubles psychosomatiques divers.
- **Des propriétés irritantes :** De nombreuses crèmes, pommades à base d'huiles essentielles, sont destinées à soulager entorses, courbatures ou claquages musculaires. En effet, par voie externe, certaines huiles essentielles (ex: oléorésine dans la térébenthine) augmentent la microcirculation. [38]

I.1.13.2 En cosmétique:

Les huiles essentielles ont été largement exploitées en industrie cosmétique grâce à leurs caractères.

Organoleptiques, principalement leurs odeurs agréables et persistantes. Cette propriété aromatique est attribuée à l'ensemble de molécules volatiles issues des plantes aromatiques.

L'utilisation des huiles essentielles dans des produits cosmétiques, telles que les crèmes et les gels, est non seulement dans le but de les parfumer, mais aussi pour la conservation de ces produits. [33]

I.1.13.3. En Parfumerie :

Dans le domaine des parfums, les huiles essentielles sont employées en tant qu'agents conservateurs grâce à leurs propriétés antimicrobiennes qui permettent d'augmenter la durée de conservation du produit. Cependant, c'est surtout pour leurs caractéristiques odorantes qu'elles sont utilisées, notamment dans la formulation de parfums, de produits d'entretien personnels ou ménagers. [39]

I.1.13.4. En dentisterie :

Grâce à leurs propriétés aromatisantes et antiseptiques, les HEs ont été largement utilisées dans les bains de bouche conçus pour l'hygiène buccodentaire. Les préparations à base de Thymol, d'Eucalyptol et de Menthol sont parmi les plus utilisées depuis longtemps dans le monde, surtout aux États-Unis. Cependant, c'est juste en 1987 que les bains de bouche préparés à base d'HEs ont été approuvés par l'association dentaire américaine (ADA), attribuer à leur efficacité antimicrobienne et leur sûreté. [33]

I.1.13.5. En diverses industries :

Ce sont surtout des industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des huiles

essentielles) comme matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes.

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

L'huile de Melaleuca, elle est intégrée à des produits de lavage et utilisée comme ingrédients pour des préparations à but thérapeutique. Traitement d'allergies, piqûres d'insectes, boutons, irritations. Elle est incorporée à des désodorisants et des antiparasitaires externes. Elle a démontré des propriétés antibactériennes et antifongiques. Elle est également incorporée à des vaporisateurs pour inhalation et à des produits d'hygiène buccale. [38]

I.1.13.6. En agroalimentaire :

En industrie alimentaire, la conservation des aliments sans toucher leurs qualités organoleptiques est un objectif clé. Les HEs sont actuellement valorisées en industrie agroalimentaire due à leur activité antimicrobienne vis-à-vis des microorganismes d'altération et les principaux pathogènes, notamment *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. D'un autre côté, les HEs sont également utilisés en agroalimentaire comme des exhausteurs de saveurs. [33]

I.2. Présentation de la plante *Rosmarinus officinalis* :

I.2.1. Historique :

Le romarin est connu depuis la plus lointaine Antiquité et l'on a trouvé des rameaux de cette plante dans les tombes égyptiennes des premières dynasties. À Athènes, comme à Rome, le romarin passait pour une plante sacrée et Horace (65-8 av. J.-C), poète et tribun célèbre, lui consacre quelques vers, eu égard à ses très estimables qualités magiques. [40]

D'abord cultivé pour ses propriétés thérapeutiques, le Romarin est apparu dans les livres des recettes à partir du XV^e siècle. [41]

Dans l'arsenal arabe (de Najm, Cohen el Attar, Gerber, Mesué, Avicenne), figurait l'encensier. Ce sont les Arabes qui, les premiers, extraient l'essence d'encensier, mais c'est Arnaud de Villeneuve qui, en 1330, trouva le moyen de la conserver en solution alcoolique [42]. Puis Raymond Lulle continua les

recherches de son professeur (Arnaud de Villeneuve) et donna des indications sérieuses sur la distillation du romarin. L'huile essentielle a été employée au Moyen âge et elle figure dans quantité de formules diverses. Le romarin acquit une grande célébrité et on le retrouve dans de multiples compositions préparées chez les apothicaires, du XVIe jusqu'au XVIIIe siècle. [40]

I.2.2.Définition :

C'est une plante aromatique et médicinale qui appartient à la famille des Lamiacées, c'est un arbrisseau poussant à l'état sauvage dans les régions ayant un bioclimat semi-aride et subhumide. Il occupe des surfaces très importantes dans tout le bassin méditerranéen [43]. Depuis l'Antiquité, il est employé pour améliorer et stimuler la mémoire de l'être humain. Le romarin est considéré comme une plante revigorante avec autant de vertus qui reflète sa saveur aromatique bien particulière. [44]

I.2.3.Dénominations internationales :

Le nom latin Rosmarinus est généralement associé à la rosée et à la mer, bien que le romarin pousse loin de la mer. Certains chercheurs proposent une origine grecque alternative, liée à "rhops" (arbuste) et "myron" (baume/parfum). L'interprétation traditionnelle est basée sur la rosée et la mer, tandis que l'origine grecque alternative est une théorie intéressante avancée par certains chercheurs.

I.2.4 Le romarin porte les dénominations suivantes: [45]

Français : encensier, herbe aux couronnes, romarin, romarin officinal.

Anglais : rosemary.

Allemand : Rosmarin.

Espagnol : romaní, romero, romé, romero comun, rosmario.

Italien : osmarino, ramerino, rosmarino, usmarino.

Arabe : eklil. الاكليل

I.2.5 Classification :

La classification botanique du romarin est comme suit. [45]

Embranchement: Spermaphytes

Classe: Dicotylédones **Ordre :** Lamiales (labiales)**Famille:** Lamiaceae

Genre : *Rosmarinus*

Espèce: *Rosmarinus officinalis* L.

I.2.6 Détermination botanique :

Le romarin est un arbrisseau aromatique touffu, rameux, d'environ 1 m de hauteur, à tiges ligneuses. Ces feuilles pouvant atteindre 3 cm de long et 4 mm de large, sont étroitement lancéolées, acaules, et friables. Il porte de petites fleurs bleues pâle ou lilas à la fin du printemps/début de l'été. [46]

La plante de romarin possède plusieurs utilisations telles que, Augmenter la sécrétion de la bile, régulation du système digestif et la guérison des blessures. Et pour ces raisons, il est également utilisé dans les domaines tels que, la médecine, la production pharmaceutique et l'agriculture. Les produits chimiques composants de la plante de romarin sont 20% α -pinène, 20% cineol, 18% camphre, 6% β -pinène 1borneol, 5% mirsen, 3% acétate de bornicyle, 2% terpineol, limonène, terpineol et cariphillène. [47]

Elle possède des fleurs groupées par trois ou quatre qui sont positionnées au niveau de l'aisselle des feuilles jusqu'aux rameaux en courtes grappes auxiliaires et terminales formant un ensemble spiciforme. Elles ont des bractées lancéolées, plus courtes et caduques. [48]



Figure I. 9. *Rosmarinus officinalis* (variété cultivée) [48]

I.2.7 croissance et le développement de la plante :

Le romarin est une plante diploïde et allogame qui se multiplie aussi bien par propagation végétative que par voie sexuée. La floraison du romarin dépend essentiellement de la pluviométrie automnale, une absence totale de floraison peut être observée durant plusieurs années de sécheresse. L'espèce produit en conditions favorables de nombreuses inflorescences en grappes axillaires, à nombre de fleurs variables (3 à 8). Les fleurs entomogames sont fréquemment visités par les abeilles et les bourdons, ces derniers en tant que pollinisateurs restent longtemps sur l'individu et butinent beaucoup de fleurs sur chaque inflorescence. La fécondation conduit à la formation de quatre nucules qui renferment chacun un embryon bien structuré après la fécondation. [49]

I.2.7.1 Régions de culture :

Le Romarin pousse naturellement dans le sud de l'Europe mais il est cultivé dans le monde entier.

Les principales régions de culture sont : les pays méditerranéens (sud de la France, Espagne, Portugal, nord de l'Afrique), l'Inde, les Antilles, le Mexique, l'Afrique du Sud, le groupement des Etats Indépendants (Crimée), les Etats-Unis, les Philippines et l'Australie.

En Corse, le Romarin (ainsi que la lavande stoechas, la germandrée marum, l'Hélichryse corse et l'Epiaire poisseeuse) s'installe sur des sols très dégradés soit par des incendies soit par du surpâturage, du bord de mer jusqu'à 900 mètres d'altitude aux adrets (Sud) et 600-700 mètres auxubacs (Nord). [48]

I.2.7.2 Environnement de culture :

Le Romarin peut croître même sur des terrains non adaptés à une exploitation agricole, il a donc peu d'exigences vis-à-vis du sol. Il a une préférence pour des sols argileux ou sablonneux, étant situé dans des endroits secs, chauds, (c'est ainsi qu'il produit le plus d'huiles essentielles et qu'il dégage les parfums les plus puissants).

Lorsque les gels sont fréquents, les plants de Romarin devront être mis sous abri, repotés dans une bonne terre, placés à l'intérieur dans une serre ou près d'une fenêtre et arrosés ponctuellement en profondeur, uniquement quand la terre est sèche. Quand tout danger de gel est passé, les plants sont ressortis au printemps et taillés à l'extrémité des rameaux avant la floraison

Puis il faut rabattre la plante et lui donner de l'engrais organique et du compost. [48]



Figure I. 10. Optimum écologique: Caractéristique du sol d’après [48]

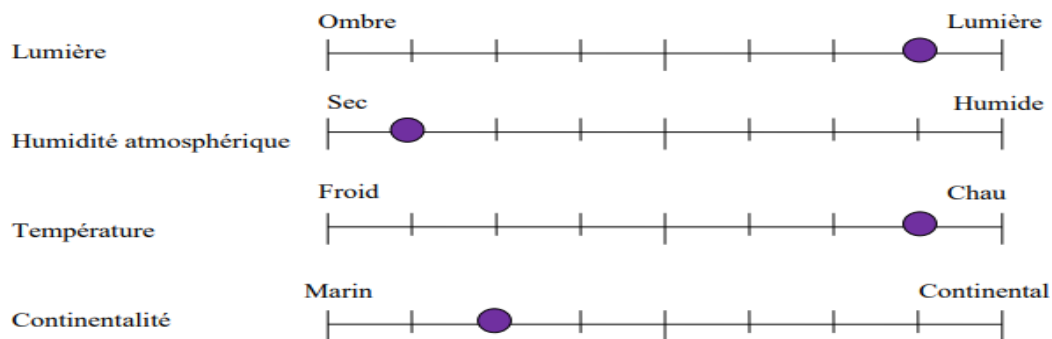


Figure I. 11. Optimum écologique : Caractéristiques climatiques d'après. [48]

I.2.8 Récolte du Romarin :

De manière générale, la récolte d'une plante (Romarin) est réalisée quand les principes actifs sont à leur maximum. Les feuilles et tiges herbacées sont récoltées lorsque la fleur commence à se développer, 12 à 18 mois après plantation. Quant aux fleurs et sommités fleuries (partie supérieure du végétal), elles sont récoltées au même moment de la journée que les feuilles quand les fleurs commencent à s'épanouir. L'odeur résidant principalement dans le calice, celui-ci doit être prise délicatement et séché. La récolte des sommités fleuries a lieu au mois de juillet.

Pour le séchage des feuilles et tiges herbacées : étalées sur des châssis de toile à larges mailles ou sur des de la paille bien sèche, et séchées dans une pièce exposée aux rayons du soleil. Il faut les brasser régulièrement afin que l'air pénètre uniformément. À conserver dans une pièce non humide. Fleurs et

sommités fleuries sont espacées sur des claies garnies de papier, remuées de temps en temps, dans une pièce ensoleillée ou à l'étuve. Une fois sec, conserver le Romarin environ une année dans des bocaux ou boîtes garnis de papier et boucher ou en petites bottes enveloppées dans du papier et gardées au sec. [50]

I.2.9 Composition chimique de *Rosmarinus officinalis* L :

La composition chimique de la plante dans son ensemble dépend du lieu de croissance et de récolte ainsi que du moment de la récolte dans le cycle végétatif (idéal quand le végétal au maximum d'essence).

Les feuilles séchées et l'HE (du type Espagne et du type Maroc-Tunisie) de *Rosmarinus officinalis* L. sont inscrits comme drogues végétales à la Pharmacopée Européenne 11^{ème} édition.

D'après la Pharmacopée Européenne, la feuille entière séchée de *Rosmarinus officinalis* L. doit avoir une teneur minimale de :

- 3% de dérivés hydroxycinnamiques totaux, exprimés en acide rosmarinique (C₁₈H₁₆O₈ ; Mt 360,3) (drogue anhydre)
- 12 mL/kg d'HE (drogue anhydre). [48]

Tableau I. 1. Les constituants chimiques de Romarin [48]

Familles des constituants	Constituants
acides phénols :	<ul style="list-style-type: none"> ➤ acide rosmarinique : 1,7-2,83% en moyenne ➤ acide caféique : cité (= aucune valeur précisée) associé avec l'acide chlorogénique
diterpènes phénoliques tricycliques :	<ul style="list-style-type: none"> ➤ acide carnosolique ≈ 0,35% ➤ carnosol = picrosalvine : cité (valeur variable, jusqu'à 4,6% ou majoritaire) <ul style="list-style-type: none"> ➤ rosmanol : cité ➤ rosmadial : cité

triterpènes :	<ul style="list-style-type: none"> ➤ acide ursolique : 2-4% en moyenne et 5% de dérivés de l'acide ursolique ➤ acide oléanolique : ≈ 10% ➤ α- et β-amyrines : citées
flavones méthylées :	<ul style="list-style-type: none"> ➤ lutéoline : citée ➤ genkwanine : citée
huile essentielle (monoterpènes) :	<ul style="list-style-type: none"> ➤ α-pinène : 3,48-27,1% en moyenne ➤ 1,8-cinéole : 12,84-42,9% en moyenne ➤ camphre : 10,22-31,4% en moyenne ➤ bornéol libre et estérifié : cités ➤ camphène : 3,53-9,8% en moyenne

I.2.10 L'huile essentielle du Romarin :

Le Romarin est relativement riche en l'HE (1 à 5%). L'HE de romarin est un liquide incolore ou jaunâtre dont l'odeur est fortement camphrée, pénétrante de saveur très aromatique. Le type Algérien renferme plus que: 0,74% dans la plante sèche, 0,1 % dans les feuilles et 1,4 % dans les fleurs et rameux. [45]

I.2.11 Propriétés du Romarin:

I.2.11.1 Activité antibactérienne :

Les effets des extraits aqueux et méthanoliques de romarin, sur la croissance du *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyl transferase ont été étudiés. Les résultats ont montré que les extraits du Romarin peuvent empêcher la lésion de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* et peuvent aussi éliminer les plaques dentaires par suppression de l'activité de la glucosyl transférase. [51]

Afin de chercher de nouveaux antibiotiques et des agents antimicrobiens, une autre étude a été élaborée par examiner les effets antimicrobiens des extraits des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures.

L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone (CO₂) supercritique du romarin, a présenté un large spectre antimicrobien. La croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait d'acide carnosique. [52]

I.2.11.2 Activité Antioxydante :

L'activité antioxydante du Romarin est connue depuis environ 30 années. [53]

En raison de ses propriétés antioxydantes, le Romarin est largement utilisé en tant qu'épices dont l'activité antioxydante la plus élevée. [18]

I.2.11.3 Activité anti-inflammatoires :

L'acide rosmarinique est un agent anti-inflammatoire non stéroïdien naturel. Il inhibe le facteur C3 du complément, un médiateur du processus inflammatoire [54]. L'acide rosmarinique a un effet piégeant les radicaux libres d'oxygène actif. [55]

I.2.12 Utilisation traditionnelle et propriétés pharmaceutiques du romarin

« Rosmarinus officinalis » :

Depuis l'antiquité, le Romarin est employé pour améliorer et stimuler la mémoire. Encore aujourd'hui, en Grèce, les étudiants en font brûler dans leurs chambres en période d'examens. Le Romarin est en effet considéré comme une plante tonique, revigorante, stimulante: autant de vertus que reflète sa saveur aromatique bien particulière. Il agit sur le système nerveux central comme stimulant et pour usage trisant.

L'infusion des feuilles à plusieurs actions physiologiques: stimulant générale, cholagogue, antiseptique, diurétique, emménagogue. Le Romarin stimule la circulation cérébrale, améliore mémoire. Il soulage également céphalées et migraines. Il favorise la pousse des cheveux en stimulant l'irrigation du cuir chevelu [44] le Romarin est une plante médicinale aromatique très exploitée à cause de sa teneur en huiles essentielles qui sont très recherchées [43]. Ces huiles essentielles ont fait l'objet de plusieurs études qui montrent leurs propriétés antimicrobiennes, leurs activités anti oxydantes et anti- inflammatoires. Elles sont employées en aromathérapie et dans l'industrie pharmaceutique et thérapeutique, utilisées également dans l'industrie cosmétique ainsi que par l'industrie agro- alimentaire. [56]

I.3. Formulation de la pommade :

I.3.1. Définition de la formulation :

La formulation est « la connaissance de la science des matériaux et de la chimie physique, jointe à l'art d'arriver à la meilleure combinaison de constituants. Alors que la chimie traite de la réaction chimique entre substances, la formulation traite de la coexistence de substances sans réactions chimiques ». [57]

Elle est aussi « l'ensemble des connaissances et des opérations mises en œuvre lors du mélange, de l'association ou de la mise en forme d'ingrédients d'origine naturelle ou synthétique, souvent incompatibles entre eux, de façon à obtenir un produit commercial caractérisé par sa fonction d'usage et en aptitude à satisfaire un cahier des charges préétabli ». [58]

I.3.2. Définition des pommades :

Les pommades sont des préparations de consistance semi-solide destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses en vue, le plus souvent, de réaliser une action locale, rarement pour permettre une pénétration percutanée de principes actifs. [59]

Les pommades qui contiennent des résines sont appelées des onguents et celles renfermant une forte proportion de poudre sont des pâtes dermiques. Les baumes sont des pommades douées d'une propriété antalgique et anti-inflammatoire. [60]

I.3.3. Types des pommades: [61]

- **Les pommades hydrophobes :**

Les pommades hydrophobes (lipophiles) ne peuvent absorber normalement que de petites quantités d'eau. Les substances les plus communément employées pour la formulation de telles pommades sont la vaseline, la paraffine, la paraffine liquide, les huiles végétales ou les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.

- **Les pommades absorbant de l'eau :**

Ces pommades peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau. Leurs excipients sont ceux d'une pommade hydrophobe dans lesquels sont incorporés des émulsifiants du type eau dans huile telle que la graisse de laine, des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitane, des mono-glycérides, des

alcools gras.

- **Les pommades hydrophiles :**

Les pommades hydrophiles sont des préparations dont les excipients sont miscibles à l'eau. Ces derniers sont constitués habituellement par des mélanges de polyéthylène glycols (macrogols) liquides et solides. Ils peuvent contenir des quantités appropriées d'eau.

I.3.4.Composition :

I.3.4.1 Le principe actif :

Le principe actif est la molécule qui possède un effet thérapeutique, cette substance est la plupart du temps en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. [62]

I.3.4.2 Excipients :

Les excipients sont des auxiliaires inertes sur le plan pharmacologique et servant à la formulation de la forme galénique et facilitent l'administration du médicament. Ce sont par exemple les diluants permettant d'augmenter le volume et faciliter la prise par le patient ; les lubrifiants, les liants, les édulcorants, les délitants...etc. Bien que n'étant pas des principes actifs, les excipients peuvent avoir un effet qu'il ne faut pas négliger. Certains sont même classés comme « excipients à effet notoire » et doivent figurer expressément dans la composition déclarée du médicament, tant en qualité qu'en quantité. [63]

- **Critères de choix des Excipients : [61]**

Les excipients pour pommades peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Selon la nature de l'excipient, la préparation peut avoir des propriétés hydrophiles ou hydrophobes **tableau I.2** Un bon excipient doit contribuer à donner à la préparation pour application cutanée une consistance qui permette un étalement facile :

- Il doit être bien toléré et son pouvoir allergisant doit être faible.
- Il doit présenter le moins d'incompatibilités possible avec les autres constituants et le conditionnement.
- Il doit en général faciliter la pénétration des principes actifs dans les tissus.
- Il doit être suffisamment stable pour permettre une bonne conservation.

- Si cela n'est pas incompatible avec d'autres propriétés, on lui demande de plus d'être lavable à l'eau et de ne pas tacher le linge.
- Enfin, on peut lui demander d'être stérilisable

Tableau I. 2. Classification des excipients pour la préparation de la pommade [61] [63]

Type d'excipient	Famille	Constituants
Excipients anhydres	Glycérides	Axonge Saindoux Huiles végétales Huiles hydrogénées
	Cires	Lanoline Cire d'abeille Palmilate de cetyle
	Hydrocarbure	Vaseline Perhydrosqualène Paraffine
	Polyéthylène glycol et Homologues	Silicones
Excipients hydratés ou Hydrogels	Gels de produits minéraux	Bentonite Clarsol Silice Alginates
	Gels de polymères organiques	Gélose Pectine Lanoline Kaogel
Excipients émulsionnés	Excipients émulsionnés eau dans huile (E/H) Excipients émulsionnés huile dans eau (H/E)	

I.3.4.3 Additifs :

Substance naturelle ou chimique ajoutée dans les aliments dans un but technique bien précis. Il existe 4 groupes des familles d'additifs alimentaires. Les arômes naturels ou artificiels ne sont pas considérés comme des additifs et doivent figurer en toutes lettres sur l'étiquette. [62]

- Colorant : Colorant alimentaire est une substance ou pigment, qui peut donner de la couleur quand elle est ajoutée ou appliquée à un aliment.
- Conservateur : Egalement appelé agent de conservation, empêche les fermentations, le développement des bactéries, des moisissures et des levures.
- Antioxydant : S'oppose au phénomène d'oxydation du principe actif ou des excipients ou des additifs.
- Agents de texture : C'est une opération ayant pour but d'améliorer les propriétés physiques des médicaments synthétisés.

I.3.5.Préparation :

Les pommades sont constituées par un excipient, simple ou composé, dans lequel sont dissous ou dispersés habituellement un ou plusieurs principes actifs. La composition de cet excipient peut avoir une influence sur les effets de la préparation et sur la libération du principe actif. Les excipients des pommades peuvent être des substances d'origine naturelle ou synthétique et être constitués par un système à une seule ou à plusieurs phases. La préparation proprement dite est réalisée par divers procédés qui aboutissent tous au mélange et à l'homogénéisation des différents produits. Dans le cas de formes contenant plusieurs phases, la phase aqueuse et la phase huileuse sont préparées au préalable chacun de leur côté avec les composés respectivement miscibles dans chacune d'elles. D'autres agents peuvent être ajoutés à la préparation comme des agents antimicrobiens, des antis oxygènes, des agents stabilisants, émulsifiants ou épaississants. [62]

I.3.6.Contrôle de qualité des pommades :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour le contrôle de qualité des pommades. Parmi celles-ci nous pouvons citer:

- L'observation des caractères macroscopiques des pommades surtout la consistance, la couleur, l'odeur et la stabilité ;
- Vérification de l'homogénéité;
- La mesure du potentiel d'hydrogène (PH); l'établissement du profil chromatographique par des

méthodes chromatographiques.

I.3.7. La peau :

La peau est assurément un organe vivant à l'interface entre les organismes vivants et l'environnement. Ses propriétés Quantitatives qui varient selon les sites anatomiques du corps humain et dépendent de l'âge et du sexe. La connaissance du comportement mécanique de la peau présente un intérêt pour le diagnostic des maladies cutanées et pour tester l'efficacité des produits cosmétiques sur la peau. [64]

La peau contient des structures qui confèrent la sensibilité au toucher (cellules de Merkel et nocirécepteurs), l'immunité (cellules de Langerhans), la protection contre les radiations UV (mélanocytes), la réparation et le métabolisme. Enfin, la peau est un organe vivant en continuellerégénération et réparation. Son renouvellement dure 28 jours. Il est continu et peut-être accéléré en cas de blessures. [65]

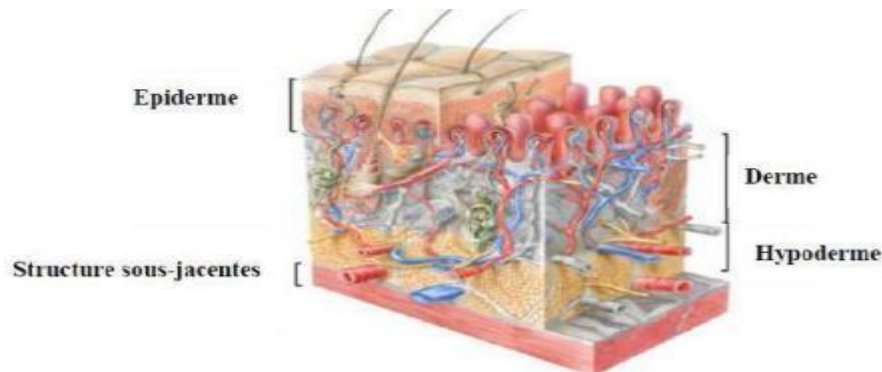


Figure I. 12. Schéma représentant la structure de la peau humaine [66]

I.3.8. Structure de la peau :

- **L'épiderme :**

L'épiderme est un épithélium pavimenteux pluristratifié et kératinisé en perpétuel renouvellement. Il se renouvelle en 28 jours. De sa surface au derme on retrouve 5 ou 6 couches, basées sur les propriétés des cellules. Le nombre de couches varie selon les localisations corporelles. La plupart des cellules épidermiques sont des kératinocytes qui sont formés par différenciation des cellules de la couche basale.

- **Le derme :**

Le derme est un tissu conjonctif constitué d'une substance fondamentale dans laquelle baignent des cellules, des fibres de collagène et des fibres élastiques. Son épaisseur est de 0,2– 0,3 cm. Contrairement à l'épiderme le derme contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des nerfs. Parmi les cellules du

derme, les fibroblastes sont les plus nombreux et ils sont responsables de la synthèse du matériel extracellulaire. Ils synthétisent le collagène, l'élastine, la substance fondamentale de la matrice extracellulaire et les glycoprotéines de structure. Leur activité est intense lors de la cicatrisation. Dans le derme on retrouve aussi des mastocytes, macrophages et leucocytes qui jouent un rôle dans les réponses inflammatoires et immunologiques.

- **L'hypoderme :**

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et constitue 15 à 20 % du poids corporel. C'est un réseau de cellules graisseuses (adipocytes) qui sont regroupés sous forme de lobules et attachés au derme par des fibres de collagène et d'élastine. On y trouve aussi des fibroblastes et des macrophages. Elle agit comme isolant thermique, protège contre les chocs et constitue aussi un réservoir énergétique.

- **Les annexes cutanées :**

Dans le derme et dans la partie supérieure de l'hypoderme se trouvent des annexes cutanées les follicules pilosébacés, les glandes sébacées, les glandes sudoripares et les phanères (ongles et cheveux). Les annexes sont présentes sur tout le corps mais leur nombre varie beaucoup selon l'endroit. [67]

I.3.9 Pénétration à travers la peau:

La pommade appliquée sur la peau se trouve au contact de l'épiderme. Celui-ci est formé de cellules qui, en progressant vers l'extérieur, subissent des modifications importantes de leur constitution chimique ; elles se chargent en kératine, scléroprotéine riche en ponts disulfures et difficilement attaquables par les agents d'hydrolyse : acides, alcalins dilués et enzymes.

La peau constitue une barrière très efficace mais elle peut cependant être traversée par de petites quantités de substances lipophiles capables de pénétrer dans les couches cornées. Si ces substances possèdent aussi une certaine hydrophilie, elles pourront avoir une diffusion plus profonde et même parfois une absorption systémique.

La couche cornée a la propriété de retenir dans sa structure des substances actives « effet réservoir ». La libération progressive de cette réserve conduit à des effets prolongés.

Les substances qui la traversent, peuvent se concentrer dans les parties profondes de la peau et les régions sous-cutanées, ce qui est favorable aux actions locales. [67]

I.4.Conclusion :

Les HEs, qui sont des mélanges de substances organiques complexes, sont récupérées à partir des différents organes de la végétation (feuilles, fruits, fleurs, graines, etc.) par diverses méthodes. Grâce à leur composition chimique (terpénoïdes, phénylpropanoïdes, etc.), elles sont pleines de nombreuses propriétés curatives d'une grande variété de domaines. De plus, elles possèdent une valeur économique importante par leur utilisation dans les domaines de la santé, de l'agriculture, de la beauté.

Partie

Expérimentale

Chapitre II: Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1 Introduction :

Cette étude menée sur l'huile essentielle de Romarin vise à valoriser cette plante médicinale et aromatique très répandue en Algérie et bien connue pour ses nombreuses vertus. Afin de bien mener cette étude, nous avons suivi le plan de travail illustré sur la **Figure II. 1** et qui représente les étapes suivantes:

- Extraction par hydrodistillation de l'huile essentielle du Romarin.
- Réalisation des analyses physico-chimiques et chromatographiques sur l'huile essentielle obtenue.
- Évaluation des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite par la méthode des disques.
- Évaluation des activités anti-inflammatoire de l'huile essentielle par la dénaturation de protéines.
- L'étude du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle par la méthode du DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil).
- Formulation d'une pommade à base de l'huile essentielle de romarin extraite.
- Évaluation de l'activité antimicrobienne de la pommade par la méthode de diffusion des puits.
- Enfin, l'étude du comportement rhéologique de notre pommade.

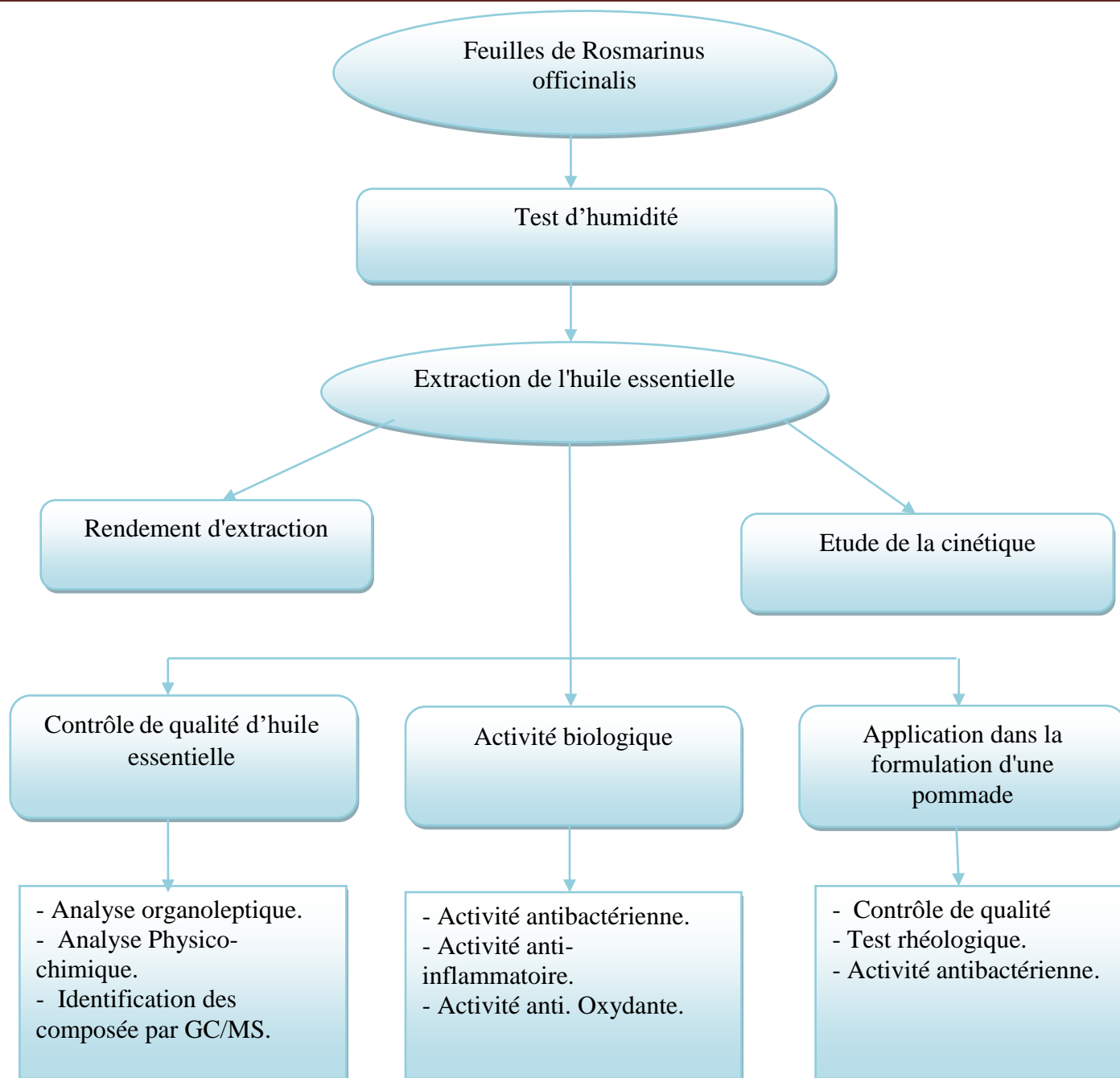


Figure II. 1. Diagramme général de la procédure expérimentale

• **Présentation de la zone d'étude :**

La plante de romarin utilisée pour l'extraction de notre huile essentielle a été cueillie dans la région de Khemis Miliana (**Figure II. 2**), qui est située à 20 km à l'est de la wilaya d'Aïn Defla et à 115 km à l'ouest d'Alger, à une altitude de 377 m.



Figure II. 2. Localisation de la zone étudiée

Cette étude expérimentale a été réalisée pendant trois mois (Mars, Avril, Mai 2023). Le **Tableau II. 1** illustre l’emplacement et les différentes tâches qui ont été réalisées au niveau de chaque laboratoire.

Tableau II. 1. Les lieux des parties expérimentales réalisées

Lieu de travail :		Laboratoire :	Travail expérimental :
Université Djilali Bounaama Khemis Miliana	Faculté ST	Laboratoire de génie des procédés	Extraction de l’HE et étude des propriétés physico-chimiques.
		Laboratoire d’analyse physico-chimique	Etude de l’effet antioxydant et anti-inflammatoire.

		Laboratoire de recherche FIMA	Etude rhéologique
Ain defla	Laboratoire des analyses médicales du Dr Zibouche	Laboratoire microbiologique	Etude de l'activité antibactérienne
Bous mail	Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC)		L'analyse GC/SM de l'HE

II.2 Matériels et méthode :

II.2.1 Matériel utilisé :

La liste des verreries, produits et appareils utilisés dans cette étude est donnée dans le **Tableau II. 2.**

Tableau II. 2. Liste des appareillages, des verreries et des produits utilisés dans notre étude expérimentale

Appareils :	Verreries :	Produits utilisés :
Autoclave	Ballon 1000ml	Huile essentielle de romarin
Bain marie	Béchers	Phénolphtaléine
Balance de précision	Boites de pétri disques d'ATB	Eau distillée
Chauffe ballon	Ecouvillons	Ethanol
Appareil GC/MS	Eppendorfs	Eau physiologique
Hydro distillateur de type	Eprouvettes	Vitamine C
Clevenger	Erlenmeyers	1,1-Diphényl-2 picrylhydrazyl (DPPH)
Incubateur	Fioles Flacon en verre	Hydroxyde de potassium(KOH)
Réfrigérateur	Gants	Acide chlorhydrique (HCl)
Réfractomètre	Micropipette	Diméthyle sulfoxyde (DMSO)
pH mètre		
Agitateur magnétique		

II.2.1.1 Matériel végétal :

La plante du Romarin a été cueillie au mois d'avril dans la région de Khemis Miliana. L'extraction de l'huile essentielle est réalisée à partir des feuilles et tiges fraîches et sèches de Romarin.

II.2.2 Méthodes :

II.2.2.1 Extraction de l'huile essentielle des feuilles fraîches et sèches de Romarin :

II.2.2.1.1. Séchage et conservation :

L'extraction concerne la partie aérienne (sommités : feuilles et tiges) de la plante *Rosmarinus officinalis* (**Figure II. 3**). La plante fraîchement récoltée, est lavée puis laisser sécher pendant 14 jours, dans des conditions favorables à l'élimination de l'eau :

- à l'aire libre.
- à l'abri du soleil
- à température ambiante



Figure II. 3.Photo représentant la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis*

II.2.2.1.2 Teneur en l'eau :

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans le végétal frais [68].

Un échantillon de 300 g de la partie aérienne fraîche de *Rosmarinus officinalis* est disposé pour être séchée à l'air libre. Par la suite l'échantillon susmentionné est pesé de manière quotidienne jusqu'à atteindre une masse finale constante. La différence entre la masse finale et la masse initiale représente la quantité d'eau contenue initialement dans l'échantillon utilisé.

La teneur en l'eau est estimée par la **formule II.1** :

$$H\% = [(mf - ms) / mf] \times 100$$

Formule II.1

Avec :

mf : poids frais de l'échantillon (g).

ms : poids sec de l'échantillon (g).

H (%) : taux d'humidité exprimé en pourcentage.

II.2.2.1.3 Extraction de l'huile essentielle par hydro- distillation :

L'extraction de l'huile essentielle de Romarins a été réalisée avec un hydro- distillateur du type Clevenger. Il est constitué d'un chauffe-ballon, d'un ballon de capacité d'un litre (1 L) où l'on place le matériel végétal et l'eau, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement de ballon, une ampoule à décanter qui reçoit les extraits de la distillation et d'un thermomètre pour contrôler la température et éviter le sur chauffage.

Lors du chauffage, l'HE va être entraîné avec la vapeur d'eau, ce mélange monte alors dans le clevenger et passe ensuite dans le réfrigérant qui est en permanence refroidi par une circulation d'eau. Au contact des parois froides, les vapeurs sont refroidies et sont condensées dans l'ampoule à décanter. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans des eppendorfs couverts en aluminium et conservés au réfrigérateur jusqu'à l'analyse (Figure II. 4).



Figure II. 4. Photo représentant l'extraction de l'HE par hydro-distillation

 **Protocole opératoire :**

- 30 g de matière végétale sèche et plus 400 ml d'eau distillée sont introduits dans un ballon de 1 L.
- On chauffe le ballon rempli à 100°C.
- Après 30 min d'extraction, les deux phases non miscibles sont séparées.
- L'huile essentielle est récupérée dans des petits flacons en verre.
- Le volume d'essence obtenue est noté pour le calcul du rendement.

II.2.2.1.4 Détermination de la cinétique et du rendement d'extraction :

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes de Romarin à l'état sec, nous avons récupéré des quantités de l'huile essentielle correspondant à des intervalles de temps de 5 mn qui s'étalent de 0 à 30 minutes. Les quantités de l'huile essentielle obtenues vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps. Selon la norme **AFNOR** (1986), le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après l'extraction (m_{HE}) et la masse de la matière végétale utilisée (m_{MV}). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la **formule II.2** suivantes :

$$R (\%) = (m_{HE} / m_{MV}) \times 100$$

Formule II.2

Où :

R (%) : Rendement en huile essentielle exprimé en pourcent.

m_{HE} : La masse d'huile essentielle obtenue.

m_{MV} : La masse de la prise d'essai de matière végétale utilisée.

II.3 Caractéristiques de l'HE de *Rosmarinus officinalis* :**II.3.1 Propriétés Organoleptiques :**

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'essence ont été notées par observation de l'HE du Romarin, puis comparées à celles données par la littérature (ou les normes).

II.3.2 Propriétés physique de l'HE de *Rosemarinus officinalis* :

II.3.2.1 Potentiel hydrogène (PH) :

Cette mesure a été effectuée à l'aide du papier PH.

II.3.2.2 La masse volumique :

La masse volumique est le rapport entre la masse d'un échantillon de l'HE sur le volume de cet échantillon.

$$\rho = m / V$$

Formule II.3

ρ : masse volumique (g /ml)

m : masse de l'huile (g).

V : volume de l'huile (ml).

II.3.2.3 La densité relative :

La densité relative est le rapport de la masse d'un volume de liquide (HE pour notre cas) par la masse du même volume d'eau distillée, et son symbole est d. [69]

$$d = \rho_{\text{Huile}} / \rho_{\text{eau}}$$

Formule II.4

d : densité

ρ_{Huile} : masse volumique de l'HE.

ρ_{eau} : masse volumique de l'eau distillée

À une température de 20°C, on pèse à l'aide d'un pycnomètre, des volumes égaux d'HE et d'eau distillée : on pèse successivement le flacon vide, puis le flacon rempli d'eau distillée. Après essuyage, on le remplit avec l'HE et on note leurs poids exacts. La densité de l'huile essentielle est calculée par la **formule II.5**

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Formule II.5

Où :

d : densité.

m0 : est la masse en grammes du pycnomètre vide.

m1 : est la masse en grammes du pycnomètre rempli d'eau.

m2 : est la masse en grammes du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

II.3.2.4 L'indice de réfraction :

L'indice de réfraction d'HE est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée à une température constante.

La mesure de l'indice de réfraction des huiles essentielles a été effectuée à l'aide d'un réfractomètre de marque KRUSS.

Après nettoyage de l'appareil, on place 2 ou 3 gouttes d'huile essentielle au milieu du prisme. Puis on regarde dans l'oculaire et la mesure se fait en tournant les boutons de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule, finalement on note la valeur de l'indice et la température de mesure.

L'indice de réfraction de l'huile essentielle est donné par **la formule II.6** [70]

$$n_T = n_{T'} + 0.0004 \times (T' - 20^\circ\text{C})$$

Formule II.6

Où :

n_T : Indice de réfraction à 20°C.

n_{T'} : indice de réfraction à la température de mesure.

T' : Température de mesure.

0,00045 : Constante de variation de l'indice d'acide quand la température varie de 1°C.

II.3.3 Mesure des indices chimiques :

II.3.3.1 Indice d'acide :

C'est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres contenus dans un gramme de corps gras. [71]

➤ **Mode opératoire :**

On introduit 0.5 g de l'échantillon d'huile essentielle dans l'erlenmeyer propre et sec, puis on ajoute 5 ml d'éthanol 95% neutraliser avec la pipette et on ajoute 5 gouttes de phénolphtaléine, puis on neutralise la solution obtenue avec une solution éthanolique de KOH (0.1 N) introduit dans la burette et on agite, après quelques secondes si la couleur de la solution vire à la neutralisation vers une couleur rose on arrête le titrage. L'indice d'acide est calculé à l'aide de **laformule II.7** suivantes :

$$Ia = (M \times N \times V) / m$$

Formule II.7

$$Ia = (5,61 \cdot V_{KOH}) / m$$

Formule II.8

Ia : indice d'acide

V_{KOH} : volume de KOH versé (ml)

M : masse de KOH (g)

m : masse d'huile (g)

N : molarité de KOH

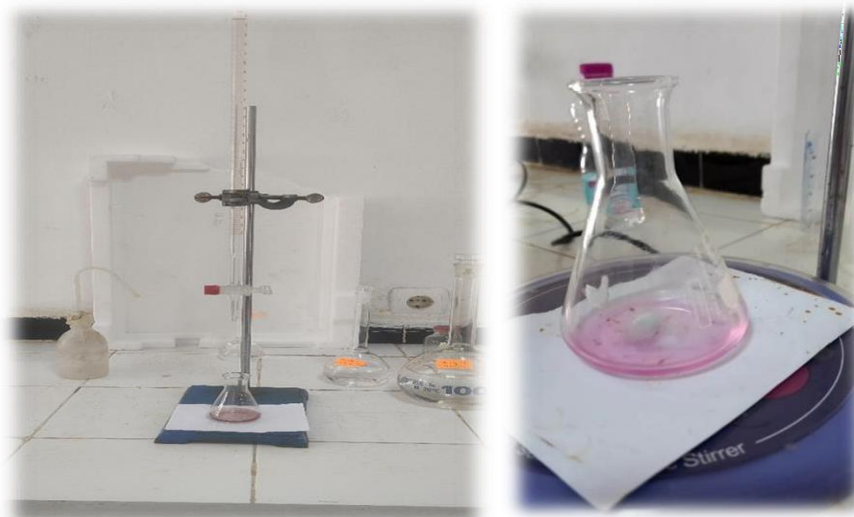


Figure II. 5. Photo représentant la détermination de l'indice d'acide

II.3.3.2 Indice de saponification :

- Principe :

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres et pour saponifier les acides gras combinés (les esters) présents dans les corps gras [68] . Le calcul de l'Is est donné par la formule II.9 :

$$Is = \frac{C_{HCl} \times M_{KOH} \times (V_0 - V_1)}{m}$$

Formule II.9

$$Is = \frac{28.05 \times (V_0 - V_1)}{m}$$

Formule II.10

Où :

I_s : indice de saponification en mg

C_{HCL} : concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/l

M_{KOH} : masse molaire du KOH en g/mol.

V_0 : Volume d'HCl verse à blanc en (ml).

V_1 : Volume d'HCl versé essai en (ml).

m : masse de la prise d'essai en (g).

➤ **Mode opératoire :**

Dans un ballon de 250 ml, on introduit 1 g d'HE de Romarin et 25 ml d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.5M à l'aide d'une burette. L'ensemble est porté au reflux pendant 90 min. Après refroidissement de la solution, on ajoute 5 gouttes de phénolphaléine. L'excès de KOH est titré par une solution d'acide chlorhydrique (HCL) 0.5 N. Le point d'équivalence a été mis en évidence de la même manière expliquée précédemment.

Une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

II.3.3.3 Indice d'ester :

- **Principe :**

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier les esters contenus dans un gramme de corps gras. [72]

- **Mode opératoire :**

Le calcul de l'indice d'ester (IE) se fait à partir de l'indice de saponification (IS) et de l'indice d'acide (IA) par la **Formule II.11** :

$$I_E = I_s - I_A$$

Formule II.11

II.3.4 Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) :

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, abrégé CPG-SM ou CPG-SM, est la technique la plus utilisée dans le domaine des HEs. C'est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. Donc, cette méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et leur identification par le biais de la SM. [22]

✓ **Conditions opératoires de la CPG/ SM :**

L'appareillage utilisé, ainsi que les conditions opératoires de la GPC/SM sont les suivantes :

• **Injecteur :**

- Température 250°C
- Mode d'injection : Split.1 : 80
- Volume injecté : 0,2 µl

• **Colonne :**

- Type : HP-5MS
- Dimensions : long 30 m * Dint 0.25 mm * épaisseur film 0.25 µm
- Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% diméthylpolysiloxane.
- Température du four : 60°C pendant 8min, 2°C/min jusqu'à 250°C. isotherme pendant 10 min.
- Durée d'analyse : 113 min
- Gaz vecteur : Hélium pureté avec un débit de 0.8 ml/min
- Débit GV : 0.5 ml/min

• **Détecteur de masse :**

- Mode d'analyse : Scan TIC (de 30 à 550)

- Délai du solvant : 3.5min
- Température de l'interface : 280 °c
- Type d'ionisation : Impact électronique
- Intensité du filament : 70 év
- Type de l'analyseur de masse : Quadripôles
- Température de la source : 230 °c à 150 °c

✓ **Equipement :**

Chromatographe : Hewlett Packard Agilent 6890 plus

Spectromètre de masse : Hewlett Packard Agilent 5973



Figure II. 6. Photo représentant le montage CPG/SM utilisé

II.4 Activités biologiques :

II.4.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE :

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE de Romarin est effectuée par la méthode de diffusion sur disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries.

Cette méthode a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI à partir d'une gamme de concentration dans des milieux de culture convenables. [73]

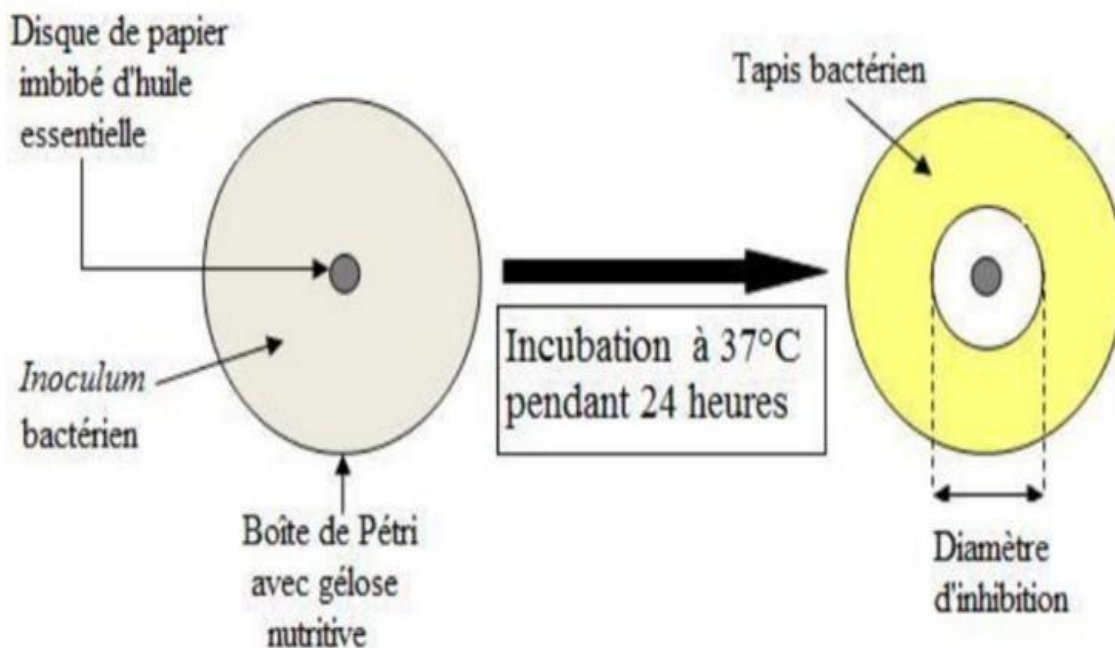


Figure II. 7. Principe de la diffusion sur disque [74]

➤ **Souches bactériennes testées:**

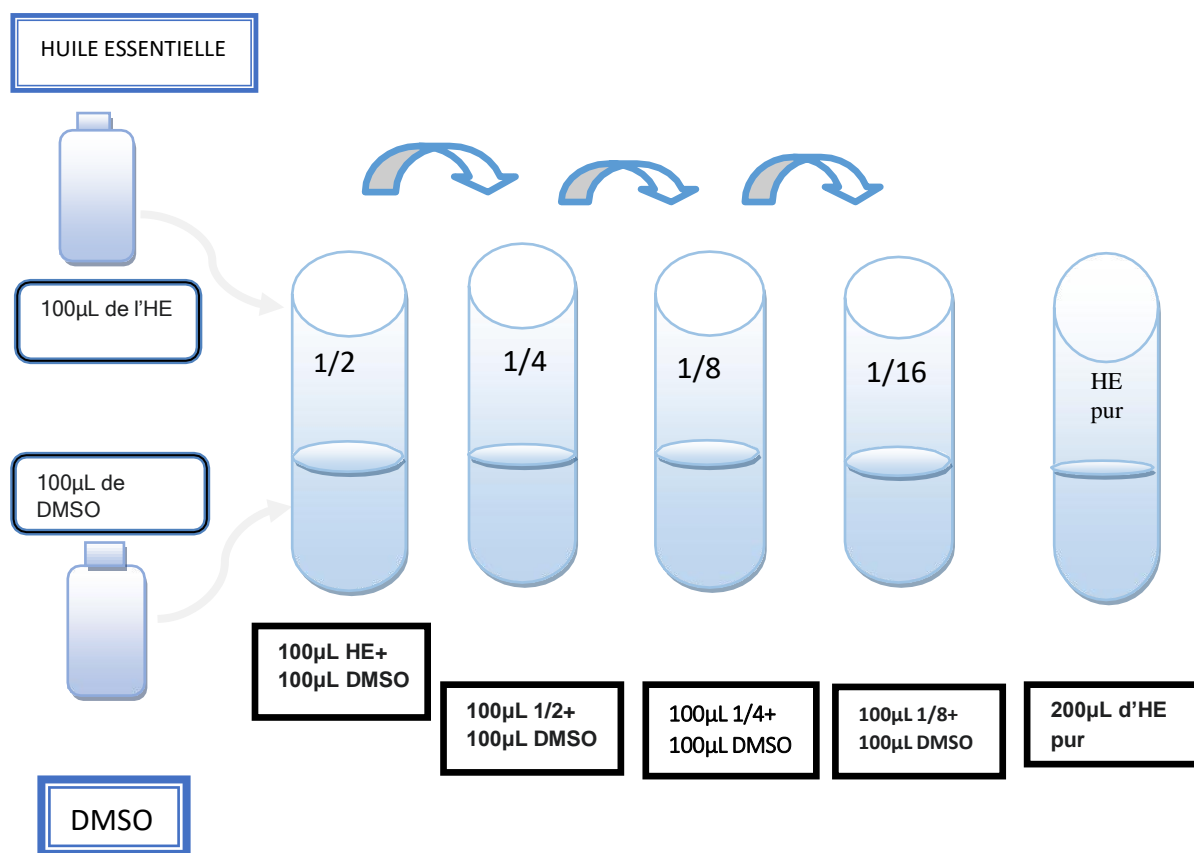
On a travaillé sur les souches de collection internationale ATCC (American type culture collection), ces souches ont toutes été fournies par le laboratoire microbiologique de Dr. Zibouchede la wilaya d'Ain defla.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Romarin est évaluée sur trois souches bactériennes qui ont été entretenues par repiquage sur gélose native (GN). Incubées pendant 24 h à 37 °C, puis conservées à 5 °C. Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de Romarin sont les suivantes :

- Staphylococcus aureus ATCC 25923
- Pseudomonas Aeruginosa ATCC 27853
- Escherichia coli ATCC 25922

Mode opératoire :**+ Préparation des dilutions de l'huile essentielle :**

- Réaliser une série de dilution de l'HE dans le DMSO préparé en laboratoire en débutant par une dilution à 1/2 (1 volume de l'HE/ 1 volume de DMSO) jusqu'à la dilution de 1/16 dans des tubes en verre stériles.
- Le 1er tube contient 100 µl d'huile essentielle et 100 µl de DMSO.
- 100 µl de la première dilution sont transférés dans le deuxième tube auquel on rajoute 100 µl de DMSO pour obtenir une dilution 1/4.
- Les dilutions à 1/8, 1/16 sont préparées de la même manière.
- Et on a aussi un tube de 200 µl d'huile essentielle pure.

**Figure II. 8.** Préparation des différentes dilutions

✚ Préparation des suspensions microbiennes :

- à partir d'une culture pure des bactéries à tester sur le milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger la pipette pasteur dans 2 ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, l'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.



Figure II. 9. Photo représentant les préparations des suspensions microbiennes

➤ Protocole expérimental (aromatogramme des souches) :

❖ L'ensemencement :

- Le milieu de culture utilisé est Muller– Hinton (MH), qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.
- Tremper un écouvillon stérile dans le tube qui contient la suspension bactérienne (pour éviter la contamination du manipulateur et de la paillasse).
- Utilisez un écouvillon pour essayer toute la surface de la gélose sèche en bandes serrées de haut en bas.
- Répétez cette opération plusieurs fois, à chaque fois faites pivoter la boîte de Pétri de 60°, et faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Passer l'écouvillon à la périphérie de la gélose pour terminer l'inoculation. Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri, l'écouvillon doit être rechargé à chaque fois.

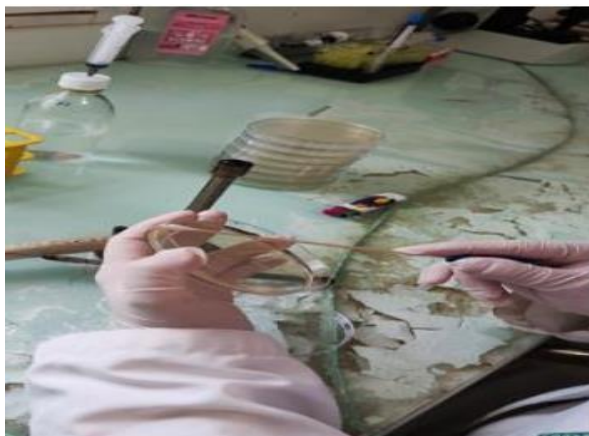


Figure II. 10. Photo représentant l'étape de l'ensemencement sur la surface gélose d'une boîte

❖ **Dépôt des disques d'aromatogramme :**

Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées. Des disques de papier Wattman de (6 mm) de diamètre imbibé dans l'huile essentielle diluée sont disposés sur la surface du milieu MH à l'aide d'une pince stérile. (Commençant par la solution la moins concentrée jusqu'à la plus concentrée pour chaque souche étudiée) la lecture des résultats se fait après de 24 h à 37 °C en mesurant les diamètres des halos clairs tout autour des disques ou zones d'inhibition.

Incubation :

Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les souches bactériennes. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un lecteur des zones d'inhibition, à l'extérieur de la boîte fermée.

❖ **La lecture :**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition, y compris le diamètre des disques, ou des halos clairs tout autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse ou d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut-être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HEs. La sensibilité est notée comme suit :

- Non sensible (-) pour les diamètres inférieurs à 6 mm
- Sensible (+) pour les diamètres de 8 à 14 mm
- Très sensible (++) pour les diamètres de 15 à 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm

II.4.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire :

II.4.2.1 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par inhibition de la dénaturation thermique des protéines (ovalbumine).

➤ Principe :

Le principe de cette technique est basé sur la capacité de l'HE à réduire la dénaturation thermique de l'ovalbumine (protéine de référence choisie pour sa stabilité lors du processus anti-inflammatoire).

➤ Protocole :

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée selon le protocole de CHANDRA et al (2012) [75] avec quelques modifications.



Figure II. 11. Photo représentant les préparations des solutions

➤ **Les différentes étapes sont résumées comme suit :**

- on prépare une solution d'ovalbumine à 2%. Pour cela, 2g d'ovalbumine est dissoute dans 100 ml d'eau distillé.

- on prépare une solution standard en dissolvant 100 mg de diclofenac de sodium dans 10 ml d'eau distillé.

- on prépare une deuxième solution standard en dissolvant 500 mg d'aspirine dans 10 ml d'eau distillé.

- on prépare une solution mère de l'HE de Romarin en dissolvant 500µl d'HE dans 1 ml d'éthanol.

- Le contrôle négatif est préparé avec 1ml d'eau distillée + 1 ml d'ovalbumine.

Dans des tubes contenant différents volume de l'HE (50, 100, 200, 300, 400, 500 µl), et dans des tubes contenant chacun 1ml de solutions standards, nous avons ajouté 1 ml de solution d'Ovalbumine 2%.

Ces tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 5 min. Puis à 72 °C pendant 5 min. À la fin de l'incubation et refroidissement des solutions, l'absorbance est mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre.

Dans ce test, le diclofenac sodique et l'aspirine ont été utilisés comme anti-inflammatoire de référence.

Les pourcentages d'inhibitions de la dénaturation ont été calculés selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = \frac{(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{test}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

Formule II.12

Avec :

Abs_{control} : Absorbance des échantillons contenant le diclofenac et l'aspirine

Abs_{test} : Absorbance des échantillons contenant l'HE de Romarin

II.4.2.2 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro par inhibition de la dénaturation thermique des protéines (Albumine sérique bovine BSA) :

Nous avons appliqué le test d'inhibition de la dénaturation du BSA provoquée par la chaleur (72°C) selon (Karthik et al. 2013) avec de légères modifications.

➤ **Mode opératoire :**

- 0.05 ml de chaque concentration d'extrait (HE) et de standards a été ajouté à 0.45 ml de solution de BSA 5 %.
- Préparé dans le Tris HCL (1N) à pH : 6,3. Les mélanges sont ensuite incubés à 37 °C pendant 20 min.
- Puis dans un bain marie à 57 °C pendant 3 min. À la fin de l'incubation, les mélanges sont refroidis rapidement.
- Puis leurs absorbances sont mesurée à 660 nm dans un spectrophotomètre à cuve.

Dans ce test, le diclofénac sodique (10mg/ml) et l'aspirine (50mg/ml) ont été utilisées comme Anti-inflammatoire de référence. La solution control test est composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 5 % et 0,05 ml d'eau distillé.

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

$$\%I = (\text{Abs}_{\text{extrait}} - \text{Abs}_{\text{Control}} / \text{Abs}_{\text{Control}}) * 100$$

Formule II.13

II.4.3 Activité antioxydante :

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH. Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle testée a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (l'acide ascorbique).

🚦 Méthode du DPPH :

La méthode de réduction du DPPH (2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle) a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante de l'huileessentielle de Romarin.

Le test aux DPPH, permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de l'IC50 des substances antioxydantes contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H+.



Où :

AH est un composé capable de céder un H⁺ au radical DPPH. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires. [76]

Détermination du pourcentage :

D'après Khodashenas l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (PI%) est calculée selon la **formule II.14** suivantes :

$$PI = \frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

Formule II.14

PI : pourcentage d'inhibition (%).

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans l'éthanol),

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Le pourcentage du DPPH inhibé en fonction des concentrations en HE et en vitamine C (Acide Ascorbique) a été tracé à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC₅₀. Ce paramètre est défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH* initiale de 50%. La concentration effectrice (EC₅₀) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piègeur du radical DPPH (concentration équivalente à 50% de DPPH perdu). Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance anti-radicalaire.

$$A = \frac{1}{EC50}$$

Formule II.15

A : Puissance anti radicalaire.

EC₅₀ : La concentration effectrice d'échantillon pour réduire 50% de DPPH.

✚ Pour l'acide ascorbique (protocole positif) :

On a utilisé l'acide ascorbique pour le test positif de l'effet antioxydant, on a suivi le même protocole que celui de l'HE, sauf qu'on a changé l'HE par l'acide ascorbique (vitamine C) et à la fin on a déterminé la valeur d'IC50 de l'acide ascorbique.

✚ Préparation de la solution DPPH :

Une quantité de 0.0024 mg de DPPH (1,1 Diphényl 2 PicrylHydrazil) est solubilisé dans 100 ml d'éthanol absolu pour avoir une solution éthanolique de DPPH. On laisse la solution reposer à une température ambiante pendant une heure.



Figure II. 12. Solution éthanolique de DPPH

✚ Préparation des solutions d'HE :

Dans un bécher sec stérile on introduit la solution mère qui contient 100 μ l d'huile essentielle, on ajoute 1 ml d'éthanol.

✚ Essais au DPPH :

Dans 9 tubes secs et stériles, on prépare :

1. 2 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH
2. 5 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH

3. 10 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH
4. 20 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH
5. 40 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH
6. 60 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH
7. 80 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH
8. 100 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH
9. 200 μ l de solution mère + 1 ml de DPPH

- **Préparation des dilutions de la vitamine c :**

Dans un bécher sec et stérile, on introduit 300 mg de l'acide ascorbique et 10 ml éthanol.

- ✚ **Essai au DPPH :**

Dans 9 tubes stériles on prépare comme suit :

1. 2 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
2. 5 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
3. 10 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
4. 20 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
5. 40 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
6. 60 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
7. 80 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
8. 100 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH
9. 200 μ l d'acide ascorbique + 1 ml de DPPH

Les solutions sont incubées pendant 30 min à température ambiante, L'absorbance est lue à 517 nm par

un spectrophotomètre.

II.5 Formulation de la pommade :

Les médicaments administrés par voie percutanée posent moins de problèmes que ceux des autres voies, c'est la raison qui nous a poussés à choisir la formulation la plus classique représentée par la pommade.

Dans cette partie nous sommes intéressés, en premier lieu, à la formulation d'une pommade antibactérienne à base de l'huile essentielle de Romarin. En effet, l'huile essentielle de Romarin est connue pour ces vertus antibactérienne et anti-inflammatoire, et c'est pour cette raison que nous l'avons incorporé comme principe actif dans la formulation de notre pommade dermatologique.

II.5.1 Technique de préparation :

II.5.1.1 Matériels :

- Agitateur magnétique, barreaux aimantés.
- Plaque chauffante.
- Homogénéisateur de type ULTRATURAX,
- Matériel courant de laboratoire : fioles Erlenmeyer, béchers, spatules, sondes de température, Cristalliseur, Balance de précision, Verre de montre.

II.5.1.2 Matières Premières :

Les matières premières utilisées lors de la formulation sont :

- Vaseline.
- Lécithine de soja ;
- HEC ;
- Glycérol ;
- Hydrolat de romarin ;
- Huile essentielle de romarin ;
- Parahydroxybenzoate de méthyle (méthyle parabène)

La formulation doit être effectuée en mélangeant deux phases une dite aqueuse ou polaire (phase A) et l'autre dite organique (huileuse) ou apolaire (phase B), les quantités en masse ainsi que les rapports de phase sont regroupés sur le **Tableau II. 3**

Tableau II. 3. Composition chimique et rôle des constituants de la pommade

Phases	Ingrédient	Variation en %(m/m)	Fonction
Phase A 40 %	Hydrolat	96	Base aqueuse de l'émulsion
	Lécithine de sauge	0.8	Tensioactif
	HEC	2.4	Stabilisant
	Glycérol	0.8	Agent humectant
Phase B 60%	Vaseline	98	Base huileuse de l'émulsion (gélifiant)
	HE de Romarain	1	Principe actif
	Méthyle parabène	1	Agent Conservateur

- Phase A: Phase aqueuse
- Phase B: Phase huileuse

Le balayage pour 30 g de pommade effectuée est représenté dans les tableaux appendice.

Nous commençons par la préparation de la phase aqueuse qui n'est autre que l'hydrolat du Romarin dans lequel on a dissout du tensioactif (TA) qui est la lécithine de soja en agitant pendant une heure.

Ensuite on incorpore le HEC et on continue l'agitation pendant six heures puis on termine par l'ajout du glycérol et en continuant l'agitation jusqu'à fusion complète des composants.

La phase huileuse est de la vaseline vierge, cette dernière a été mise dans un bain- marie ou directement sur la plaque chauffante à 40 °C, jusqu'à sa fusion complète (**figure II. 13 ,14**).

Ensuite la phase aqueuse est versée dans la phase grasse par petites fractions en mélangeant toujours par

agitation mécanique afin d'assurer une bonne homogénéisation des deux phases.

À température ambiante (25-30°C), nous introduisons dans le mélange l'HE du romarin à raison de 1%, sous une homogénéisation continue.

À la fin nous avons ajouté de l'extrait méthyle parabène comme conservateur.

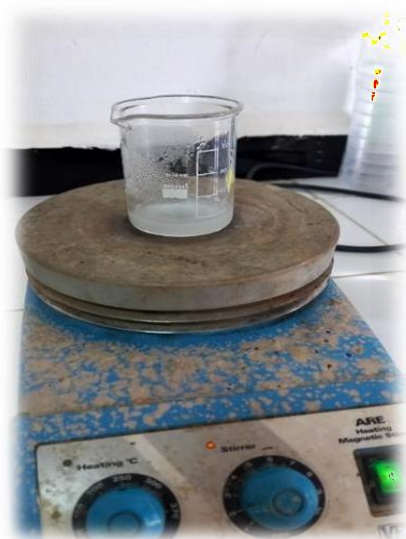


Figure II. 13. Aspect de la phase huileuse **Figure II. 14.** Aspect de la phase aqueuse

✚ Stockage et conservation :

L'emballage utilisé pour le conditionnement doit être inerte vis-à-vis du produit fini et doit assurer une bonne conservation. Ceci est particulièrement important lorsqu'il y a une phase aqueuse qui risque soit de s'évaporer, soit d'être contaminée.

II.5.2 Contrôles de qualité réalisée sur la pommade :

✚ Les analyses organoleptiques :

Les contrôles organoleptiques consistent à faire une évaluation sensorielle de la pommade (L'appréciation de l'odeur, la couleur et l'aspect de la pommade).

✚ Les analyses physico-chimiques :**➤ Essai d'homogénéité:****• Examen macroscopique:**

L'homogénéité est vérifiée par l'étalement de la pommade en couche mince. On vérifie visuellement l'absence d'agrégats et la bonne répartition des poudres.

• Examen microscopique :

Il permet de confirmer la bonne dispersion et de vérifier la taille des particules lorsque celle-ci a une influence sur l'activité thérapeutique. La pommade est déposée en fine couche entre deux.

Lamelles puis observées au microscope muni d'un vernier gradué. Une observation d'ensemble au grossissement est faite pour mettre en évidence l'homogénéité de la répartition des globules.

• Contrôles de stabilité(Centrifugation):

Cet essai a été effectué sur un ensemble d'échantillons dans une centrifugeuse type (5804 r eppendorf) pendant 10 minutes à une vitesse de 5000 tours/minute et à température ambiante. Si les essais montrent qu'il n'y a pas de séparation de phase, là on peut dire que notre émulsion est stable.

• Potentiel hydrogène:

Le PH de notre pommade est déterminé avec la méthode du papier PH.

• Les tests microbiologiques:

Le but de cette partie est de tester notre produit, en déterminant son efficacité bactéricide par la méthode de diffusion des puits.

L'activité antibactérienne a été réalisée au sein du laboratoire de Dr.Zibouche de la Wilaya d'Ain Defla. Nous avons procédé de la même façon que pour le test de l'activité antioxydante de l'HE de Romarin, sauf que nous n'avons pas utilisé de disques diffuseurs.

✓ La méthode utilisée est la suivante :

- Après la préparation des boîtes gélosées, on confectionne des puits de 5 mm à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée.
- On dépose ensuite une quantité de 40 μ L de pommade, délicatement afin de remplir les puits.

- Une quantité de vaseline va servir comme témoin. On laisse diffuser les boîtes surpaillasse pendant 40 – 45 minutes, puis on incube à 37 °C pendant 24h.

- Après on mesure le diamètre de diffusion.

Les germes qui ont été testé pour déceler l'activité antibactérienne de la pommade sont les suivantes :

- Staphylococcus aureus ATCC 25923
- Pseudomonas Aeruginosa ATCC 27853
- Escherichia coli ATCC 259227

- **Etude du Comportement rhéologique:**

La plupart des produits formulés (produits alimentaires, produits de soins ou cosmétiques, peintures et vernis...) exhibent un comportement rhéologique complexe, en ce sens qu'ils ne peuvent être caractérisés par une mesure unique de viscosité [77]. Pour cela il faut utiliser un rhéomètre à fin de préciser la viscosité de telle produit. [78]

L'étude du comportement rhéologique consiste à mesurer la vitesse de déformation d'un corps sous l'influence d'une force extérieure. La sollicitation appliquée est généralement un cisaillement. Comme résultat, on obtient alors une valeur de contrainte en fonction du gradient de

vitesse (ou vitesse de déformation) appliqué. Cette fonction caractérise les propriétés d'écoulement du matériau. [67]

La viscosité η (Pa.s) est exprimée par le rapport de la contrainte sur le gradient de vitesse :

$$\eta = \tau / \dot{\gamma}$$

Formule II.16

Le gradient de vitesse ou vitesse de déformation (shear rate) est:

$$\dot{\gamma} = d\gamma / dt$$

Formule II.17

Le comportement rhéologique est représenté soit sous la forme d'une relation entre la contrainte et la

vitesse de cisaillement, soit sous la forme d'une relation entre la viscosité et la vitesse de cisaillement. Il existe plusieurs comportements rhéologiques qui exprime le caractère d'un fluide donné on site alors :

-le comportement Newtonien, qui est celui des liquides simples. La viscosité est constante en fonction de la force appliquée, et elle ne dépend pas du gradient de vitesse. La courbe contrainte en fonction du gradient de vitesse est alors une droite.

-le comportement Rhéo épaississant, où la viscosité augmente en fonction de la vitesse d'écoulement. Ce comportement est très rare. On l'obtient avec certaines formulations des suspensions de particules anisotropes (argiles) ou quand l'écoulement provoque la floculation des suspensions.

-le comportement Rhéo fluidifiant (ou pseudo-plastique), où la viscosité diminue quand le gradient de vitesse augmente. L'écoulement est donc plus facile avec l'augmentation du cisaillement. Le comportement Rhéo fluidifiant est le plus fréquent dans le domaine des émulsions. [67]

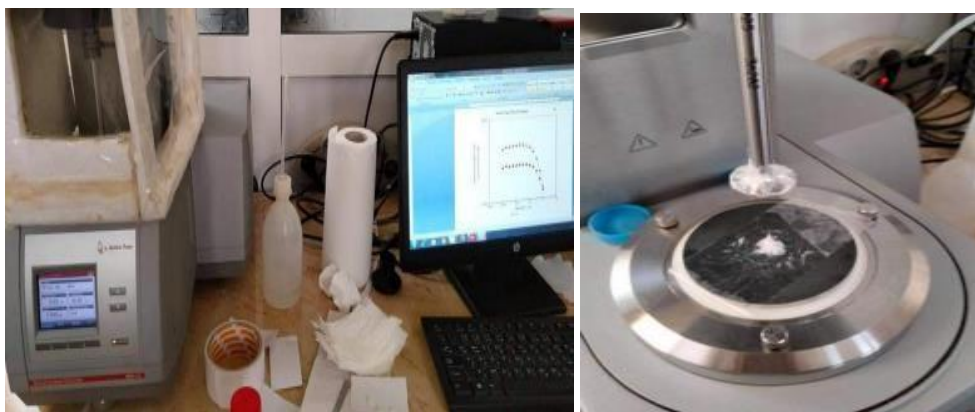


Figure II. 15. Photo du rhéomètre utilisé

- **Description de l'appareillage de mesure:**

Un rhéomètre est un appareil de laboratoire capable de faire des mesures relatives à la rhéologie fluide, qui est l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière sous l'effet d'une contrainte extérieure. Il applique un cisaillement à l'échantillon.

Généralement de faible dimension caractéristique (très faible inertie mécanique du rotor), il permet d'étudier fondamentalement les propriétés d'écoulement d'un liquide, d'une suspension d'une pâte, etc., en réponse à une force appliquée.

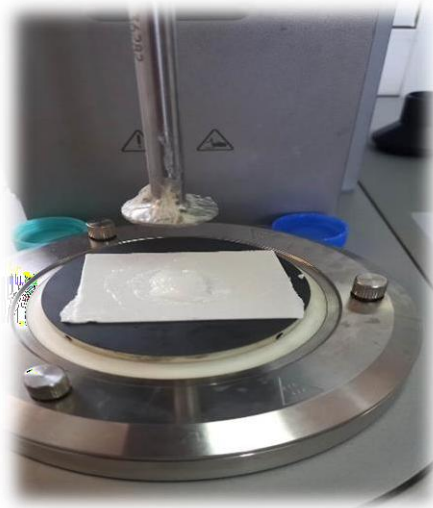


Figure II. 16. Photographie d'un rhéomètre

II.6.Conclusion :

Ce chapitre explore les méthodes et les outils de l'expérimentation. La procédure employée pour extraire l'huile de romarin (HE RO) est l'extraction par hydrodistillation. De plus, nous décrivons les analyses physico-chimiques menées, les évaluations de l'activité antibactérienne, de l'activité anti-inflammatoire et de l'activité antioxydante. Cette HE est inclus dans la composition de la pommade. Pour déterminer si la pommade est ou non éligible, un audit microbiologique est effectué. En appliquant ces méthodes et en utilisant ces substances, les résultats obtenus seront présentés, expliqués et débattus au cours du prochain chapitre.

CHAPITRE III :
CHAPITRE III :
Résultats et Discussions

Conclusion Générale

Conclusion générale :

Nous avons été motivés à étudier l'extraction de l'huile essentielle de Romarin en raison de son utilisation dans la fabrication de préparations médicamenteuses destinées au traitement des affections cutanées, en particulier des problèmes inflammatoires.

Dans ce travail, il a été question d'extraire et d'étudier l'huile essentielle de romarin, puis d'appliquer dans la formulation d'une pommade dermatologique à base de cette huile.

Nous avons tous d'abord procédé à l'extraction de l'huile essentielle de romarin par hydrodistillation, à partir des feuilles sèches et fraîches, et nous avons constaté que l'extraction de l'HE à partir des feuilles sèches donnait un meilleur rendement qui est de l'ordre de 2.56%. La cinétique d'extraction a montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle est extraite au bout des 30 premières minutes. L'huile essentielle extraite est caractérisée par une odeur Camphrée, une couleur jaune clair et un goût distinctif.

Les propriétés physico-chimiques (indice de réfraction, indice d'acide, indice d'ester, PH) mesurées étaient conformes à la norme AFNOR, ce qui garantit la pureté de notre huile.

L'huile essentielle extraite a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). L'analyse réalisée a permis d'identifier les monoterpènes comme constituants majoritaires dominés par le l-Camphre (**32.078%**), α -pinène (**19.2%**), le camphène (**16.551%**) et Limonène (**15.128%**).

Du côté microbiologique, l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE de Romarin a permis de montrer par la méthode d'aromatogramme un effet inhibiteur modéré de l'huile essentielle du Romarin sur les 3 souches de références testées. Il semble que l'HE RO soit plus efficace sur les Staphylococcus aureus que sur les Escherichia coli. Par contre, elle n'a aucun effet sur Pseudomonas Aeruginosa.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire a permis de confirmer le pouvoir inhibant de l'HE sur l'inflammation et de ce fait, de confirmer l'existence de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de Romarin.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode du piégeage de radical libre DPPH a montré que notre huile essentielle présente une bonne activité antioxydante en comparaison à la vitamine C. En consultant la littérature, on constate que la valeur de IC50 est intéressante (29.76mg/ml est suffisant pour inhiber 50%).

La pommade élaborée est stable et à un PH acide, son étude rhéologique a permis de montrer qu'elle a un comportement non newtonien rhéofluidifiant.

L'étude de l'effet bactérienne de la pommade a montré que le germe *Staphylococcus* et *Escherichia coli* est sensible à la pommade; par contre on constate une résistance de la souche *Pseudomonas Aeruginosa*.

En conclusion, notre travail met en évidence le potentiel du romarin algérien en tant que source importante d'espèces végétales intéressantes, dont les principes actifs peuvent être utilisés dans différents domaines. Les résultats obtenus suggèrent que les huiles essentielles de cette espèce méritent une étude plus approfondie afin d'exploiter pleinement leurs propriétés biologiques, en utilisant des équipements plus sophistiqués à l'échelle industrielle.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIE

Références

- [1] M. B. Amr, A. Shabbar, A. Barkat, M. Hamid, A. Mohamed Y, M. Ahmed et L. Li ,
« Microencapsulation des huiles : un examen complet des avantages, des techniques et des applications,» *Comprehensive Reviews in Food Science Food Safety*, vol. 15(1), pp. 143-182, 2016.
- [2] A. Fatiha, S. Badr, G. Mohamed, F. Abdellah, A. Abderrahmane, A. Lotfi, E. A. Mustapha et C. Abdelaziz, « Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc,» *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement/Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, vol. 14(1), pp. 141-148, 2010.
- [3] Y. Mouas, F. Z. Benrebiha et C. Chaouia, « Évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait antibactérienne de l'huile méthanolique du Romarin *Rosmarinus Officinalis*,» *Agrobiologia*, vol. 7(1), pp. 363-370, 2017.
- [4] K. arab, O. Bouchenak et K. Yahiaoui, « phytochemical study and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of oils and phenolic compounds of *pistacia lentiscus* L » *journal of fundamental and applied science*, vol. 6(1), pp. 77-91, 30 jaune 2014.
- [5] M. B. Ajinkya, A. Muralikrishnan, P. Hemlata, V. T. Roshan, M. Abhijeet, H. Seyed Meysam, K. Santanu, M. S. Narasimha et A. R. Michael, «Développement d'une formulation de pommade à l'aide de la technologie d'extrusion à chaud,» *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 17(1), p. 158–166, 2016.
- [6] N. Bousbia, «Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires,» chez thèse de doctorat, Université D'avignon et des pays de Vaucluse, 2011.
- [7] B. Colette, «Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées.» chez thèse de doctorat, France, Université de La Rochelle., 2008.
- [8] L. A. Couic-Marinier F, «Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine.» *Actualités pharmaceutiques*, vol. 52(525), pp. 18-21, 2013.

- [9] AFNOR, Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.
- [10] E. H. Abderrahim, «Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques,» chez thèse de doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier. France, 2011.
- [11] B. Amira, «Etude de la micropropagation de *Mentha x rotundifolia* (L.)Huds et *Mentha pulegium* L.: Production des huiles essentielles et évaluation des activités biologiques,» chez thèse dedoctorat, Université des Frères Mentouri - Constantine 1, Algérie., 2018.
- [12] J.-L. Guignard, Métabolites secondaires-Biochimie végétal, Edition Masson, 1996.
- [13] A. D. Samate, « Composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : valorisation ». chez thèse de doctorat, Université Ouagadougou. Burkina Faso, 2002.
- [14] B. Jean, Pharmacognosie photochimie plantes médicinales, 3ème édition. Tec & doc. Paris, 1999.
- [15] C. Ourida, «Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*,» chez thèse de doctorat, Université d'Oran - Sénia.Algérie, 2012.
- [16] B. Bagora, «Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, antiprolifératives et anti- migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes,» chez thèse de doctorat, Université Blaise Pascal. France, 2014.
- [17] D. Belhachat, «Etude phytochimique des extraits de *Pistacia lentiscus* (L.). Activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide.» chez thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique- El-Harrach-Alger, 2019.
- [18] B. Nabila, Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : *Origanum vulgare* et *Mentha pulegium*,» chez thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba. Algérie, 2015.

- [19] A. E. Haib, «Valorisation de terpènes naturel issus de plantes marocaines par transformations catalytiques» chez thèse de doctorat, Université Toulouse III - Paul Sabatier. France., 2011.
- [20] M.-E. Lucchesi, «Extraction Sans Solvant Assistée par les micro-ondes. Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles,» chez thèse pour le diplôme de docteur en sciences (chimie), Université de la Réunion, France, 2005.
- [21] D. Mnayer, «, Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobien,» chez thèse de doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France, 2014.
- [22] Fekih.N, « Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre pinus poussant en Algérie,» chez thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie, 2015.
- [23] M. N. Boukhatem, A. Ferhat et A. Kameli, «Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature,» Revue Agrobiologia, vol. 9(2), pp. 1653-1659, 2019.
- [24] R. Deschepper, «Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie,» chez mémoire de doctorat en pharmacie, Université d'Aix-Marseille. France, 2017.
- [25] T. Hesses et S. Simoud, «Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de Thymus sp,» chez mémoire de doctorat en pharmacie, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. Algérie, 2018.
- [26] C. Briot, «Le laurier noble, plante des héros : aspects historiques, botaniques et thérapeutiques,» chez mémoire de doctorat en pharmacie, Université de Lorraine. France, 2016.
- [27] Afssaps, Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles, 2008.
- [28] G. Jacques et. s. Paltz, « Le fascinant pouvoir des huiles essentielles », Fascicule du laboratoire "Jacque Paltz". 1997.
- [29] R. Francis et R. Annick, «Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques» Second Edition. John Wiley and Sons, 2007, p. 31.

- [30] B. Sara, «Huiles essentielles : leurs propriétés antibactériennes et leurs applications potentielles dans les aliments : un bilan,» chez Journal international de microbiologie alimentaire, 2004, pp. 94,223-253.
- [31] M. S. Ibrahim, «Activité Biologique et Analyse Chimique des Huiles Essentielles des Galles du Pistachier de l'Atlas,» chez thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah Ouargla. Algérie, 2016.
- [32] L. Mebarka, «Activités biologiques et composition chimique des huiles essentielles d'Ammiopsis aristidis Coss. (Syn. Daucus aristidis Coss.) et d'Achillea santolinoides Lag» chez thèse de doctorat, Université Ferhat Abbas Sétif 1. Algérie, 2018.
- [33] F. Benbleaid, « Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur Enterococcus faecalis responsable d'infections d'origine dentaire » chez thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Algérie, 2015.
- [34] D. Toure, «Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de Cote d'ivoire» chez thèse de doctorat, Université Félix Houphouët-Boigny. Côte d'Ivoire, 2014.
- [35] N. F. Florentine Marie-Chantal, K. T. Tatiana Flore, M. N. Ascension, A. Jean-Pierre, G. Y. Abel Joël, T. T. Alembert, O. E. Jean-Louis et E. François-Xavier, «Composition chimique, propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires in vitro des huiles essentielles de quatre plantes diététiques et médicinales du Cameroun» BMC Médecine et thérapies complémentaires 16, 117(2016).
- [36] C. Buvat, «Conseils en aromathérapie à l'officine : création de fiches conseils pratiques à destination de l'équipe officinale,» chez thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes. France, 2017.
- [37] F. Mayer, «Utilisations thérapeutiques de huiles essentielles : étude de cas en maison de retraite,» chez thèse de doctorat, Université de Lorraine. France, 2012.
- [38] M. Mouna, « Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camendulensis dans la région de Ouargla » chez thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie 2015.

- [39] Y. Fillatre, « Produits phytosanitaires: Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem », chez thèse de doctorat, Université d'Angers. France, 2011.
- [40] F. Bardeau, « Les huiles essentielles. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale, » Paris, Ed. Fernand Lanore, 2009, p. 315.
- [41] M. Wilson et G. Guylaine, *Fleurs comestibles : Du jardin à la table*. Ed Fides, 2008.
- [42] H. Lamendin, *Soignez votre bouche par les plantes. Remèdes d'hier et d'aujourd'hui*, Ed. Le Harmattan, 2007.
- [43] E. Noureddine, B. Louasté, B. Latifa et R. Adnane, Contribution au développement des régions rurales : Conservation de *Rosmarinus officinalis*, Science Lib. Ed Mersenne : Vol 5, n° 130409. p 2, 2013.
- [44] I. Paul et al, *Encyclopédie des plantes médicinales*, Paris: Larousse, 2ème Edition, 2001.
- [45] B. Hamza, « Effet des biomolécules extraites à partir de différentes plantes de la région de Mascara [ressource textuelle, sauf manuscrits] : évaluation biochimique des marqueurs d'ostéoarticulation et de l'activité biologique, » chez thèse de doctorat, Université de Mustapha Stambouli –Mascara, Algérie, 2016.
- [46] A. Babar, A.-W. Naser, S. Saïba, A. Aftab, A. K. Shah et A. Firoz, « Huiles essentielles utilisées en aromathérapie, Une revue systémique, » *Journal Asie-Pacifique de biomédecine tropicale*, vol. 5(8), pp. 589-598, 2015.
- [47] A. Rutkay, U. Esra et G. Önder, « Enquête sur le stress salin chez le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) avec la technique de télédétection, » *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, vol. 7, n° %12, 120, 2020.
- [48] L. Marion, « Romarin, *Rosmarinus officinalis* une Lamiacée médicinales de la région de la garrigue provençale, » chez thèse de doctorat, Université d'Aix Marseille. France, 2017.
- [49] Y. Zaouali, C. Messaoud et M. Boussaid, « Diversité génétique des populations naturelles de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) en Tunisie, » *Ecologia mediterranea: International Journal of Mediterranean Ecology*, vol. 29 n°2, n° %11775-4100, pp. 199-215, 2003.

- [50] M. Reclu, Manuel de l'herboriste : comprenant la culture, la récolte, la conservation, les propriétés médicinales des plantes du commerce, et un dictionnaire des maladies et des remèdes, Editions Lacour, 2004.
- [51] T. Po-Jung, T.-H. Tsai et H. Su-Chen, «In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyl transferase activity of *Streptococcus sobrinus*» Food Chemistry 105, p. 311–316, 2007.
- [52] Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B, Wittmer A et Pelz K, «riblage d'extraits de plantes pour l'activité antimicrobienne contre les bactéries et les levures avec une pertinence dermatologique,» Phytomedicine, vol. 14, n° %17-8, pp. 508-516, 2007.
- [53] N. T. Renata, G. G. Lireny Aparecida, A. P. d. S. Maria Aparecida et B. Frederico José, «Stabilité oxydative de la saucisse de viande de chèvre fermentée avec différents niveaux d'antioxydants naturels,» Meat Science, vol. 63, n° %11, pp. 43-49, 2003.
- [54] M. al-Sereiti, K. Abu-Amer et P. Sen, «Pharmacologie du romarin (*Rosmarinus officinalis* Linn.) et ses potentiels thérapeutiques,» Indien J Exp Biol, vol. 37(2), pp. 124-30, 1999.
- [55] Z. Jian, Z. Wei-Hua, H. Qiu et G. Ying-Qing, «Cultures compactes en suspension de grappes de cals de *Catharanthus roseus* avec biosynthèse améliorée des alcaloïdes indoliques,» Société de biologie in vitro, vol. 27, n° 1, pp. 68-72, 2001.
- [56] A.Khia, M. Ghanmi, B. Satrani, A.Afi, M. Aberchane, B. Quaboul, A. Chaouch, N. Amusant et Z. Charrouf, «Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc» Phytothérapie, vol. 12, p. 341–347, 2014.
- [57] Hänsel R, Keller K, Rimpler H et Schneider G, «Drogen E-O. Berlin: Springer-Verlag,» pp. 399-404, 1993.
- [58] A. Jean-Marie et S. Gilbert, «Formulation - Présentation générale,» Techniques de l'Ingénieur, 1999, réf. j2110.
- [59] K. Anikumar, «Enseigner la formulation chimique,» Vangelis Antzoulatos, 2015.
- [60] G. Jean-Marie et O. Anne-Marie, Manuel du préparateur en pharmacie, Paris: 2e édition, Lavoisier, 2013.

- [61] A. Le Hir et M.-M. Janot, pharmacie galénique (bonne pratique de la fabrication) Abrégés de pharmacie, Paris : Masson, 2001.
- [62] L. P. Graham, « Chimie pharmaceutique », Edition 2003.
- [63] L. G, Manuel du préparateur en pharmacie, Paris: 10ème édition Masson, 1986.
- [64] T. H.V, C. Fabrice, E. Alain et H. B. T. Marie-Christine, «Propriétés mécaniques multicouches de la peau humaine in vivo Modèle numérique anatomique,» 7e colloque national en calcul des structures, CSMA, 2005, Giens, France.
- [65] F. L. Bourezg, «Émulsions stabilisées par des particules polymériques biodégradables: études physico-chimiques et évaluation pour l'application cutanée,» chez thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1.France, 2013.
- [66] H.-V. Tran, «Caractérisation des propriétés mécaniques de la peau humaine in vivo via l'IRM,» chez Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne. France, 2007.
- [67] F. Justyna, «Emulsions stabilisées par des particules solides : études physicochimiques et évaluation pour l'application cutanée,» chez thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon I. France, 2009.
- [68] k.Taleb-Toudert, «« Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien), Evaluation de leurs effets sur le bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : bruchidae) » chez thèse Doctorat, 2015.
- [69] N. Methanni et M. Benabdelkader, « Contribution à l'étude des propriétés physico-chimiques et l'activité antifongique des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques et médicinales » chez Doctoral dissertation, Université de Jijel, 2016.
- [70] M.B.Goudjil, «« Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois,» chez thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah, Ouargla., 2016.
- [71] C.Paquot, «« Union internationale de chimie pure et appliquée (I.U.P.A.C). Commission des huiles, graisses et dérivés, méthode standard pour l'analyse des huiles », des graisses et ses dérivés,» 6 ème Ed, Pergamon press, 1979.
- [72] P.Ducrotte,« traitement du reflux gastro-oesophagien: règles hygiéno-diététiques et topiques

»,Gastroentérologie, 1999.

- [73] R. Labiod, «Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide,» chez thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 2016.
- [74] L.Kachetel et A.Sahmi, «« Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des fruits de *Coriandrum sativum* L »,» chez Mémoire de doctorat, Université Ummto, 2016.
- [75] C. Sangita, C. Priyanka, D. Protapaditya et B. Sanjib, «Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vitro du café contre la dénaturation des protéines» *Journal Asie-Pacifique de biomédecine tropicale*, vol. 2, 2012.
- [76] P. Molyneux, «The use of the stable free radical diphenyl picryldrazyl (DPPH.) For estimating antioxidant activity *Song klanakar*in » *Journal of Sciences and Technologies*, vol. 26 (2), pp. 211-219,2004.
- [77] Choplin L et P. Marchal, «La rhéologie systémique ou une rhéologie au service d'ingénierie des procédés et des produits. Rhéologie» vol. 12, pp. 9-18, 2007.
- [78] F. Traore, «Proposition de formulation d'un sirop antipaludique a base de *argemone mexicana* L.papaveraceae. Médecine,» chez thèse de doctorat, Université de Bamako. Mali, 2010.
- [79] S. B. Raphaëlle, S. O. Brenda Lorena, M. P. Arlindo César, K. Hady et T. C. José Carlos, «*Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved » *Journal of Ethno pharmacology*, vol. 229, pp. 29-45, 2019.
- [80] AFNOR, « Huiles essentielles », Recueil de normes Françaises, Paris: 3ème édition, AFNOR, 1999.
- [81] Y. Zaouali, H. Chograni, R. Trimech et M. Boussaid, «Diversité génétique et structure des populations parmi les variétés de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) : var. typique Batt. et var. *troglodytorum* Maire. basé sur plusieurs traits» *Journal of Industrial Crops and Products*, vol. 38,pp. 166-176, 2012.
- [82] M. Musfiq et Ananthi T, «In vitro anti-inflammatory activity of seed extract of *Zea Mays* (L.) » *Journal of Global Biosciences*, vol. 4, n°5, pp. 2168-2173, 2015.

- [83] C.-H. Lilia A., E.-V. José R., T. Arturo et G.-B. José Á., «Extraction supercritique au CO₂, hydrodistillation et distillation à la vapeur d'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis*)»*Journal of Food Engineering*, vol. 200, pp. 81-86, 2017.