

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

-----  
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE  
FILIERE : CHIMIE  
SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

# MÉMOIRE DE MASTER

## THEME

**Caractérisation et étude de l'activité antibactérienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis***

*Présenté par* : **NOMS : KOUKAOU / KACETE**      **PRENOMS : Celia /**

*Déposé publiquement, le*    20 / 10 / 2021,      *devant le Jury composé de :*

<b>Mme LOUNI. D</b>	<b>MAC</b>	<b>UMMTO</b>	<b>PRESIDENTE</b>
<b>Mme HEDJAL. M</b>	<b>Pr</b>	<b>UMMTO</b>	<b>ENCADREUR</b>
<b>Mlle AISSAOUI. F</b>	<b>DOCTORANTE</b>	<b>UMMTO</b>	<b>CO-ENCADREUR</b>
<b>Mme AITMOULOU D. L</b>	<b>MAC</b>	<b>UMMUO</b>	<b>EXAMINATRICE</b>

## **Remerciements**

Nous remercions profondément notre encadreur Mme HEDJAL. M pour son suivi, notre Copromotrice Mlle AISSAOUI. F pour sa contribution à la réalisation de ce travail.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury Mme LOUNI. D et Mme AITMOULOU. L pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous voudrions exprimer notre sincère reconnaissance pour Mme BENAZOUZE. A pour son aide.

Pour finir nous tenons à exprimer notre gratitude pour notre chef de spécialité Mr BENCHOU. LAK. M pour ses encouragements et sa bienveillance.

# Dédicace

Je dédie ce travail,

A mes parents et sœurs,

A mon frère Ghiles pour son soutien moral et ses conseils précieux tout le long de mes études.

A ma binôme et ma meilleure amie qui était toujours présente avec moi.

A mes amis, tout particulièrement Karim pour son aide dans les moments difficiles.

*Maïssa*

# Dédicace

Je dédie ce travail,

A ma maman qui m'a incité à faire de mes études ma priorité, mes sœurs, et aux autres membres de ma petite famille.

A ma binôme et meilleure amie pour sa loyauté et sa bonne compagnie.

A mes ami(e)s, et spécialement Raouf pour sa bonne humeur et sa présence.

*Celia*

## Liste des figures

Figure (01) : Fleurs et feuilles de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	2
Figure(02) : Structure d' <i>isoprène</i> .....	7
Figure(03) : Structure de <i>mycrène</i> .....	7
Figure(04) : Structure de <i>pulégone</i> .....	7
Figure(05) : Structure d' <i>eugénol</i> .....	8
Figure(06) : Structure de <i>la vaniline</i> .....	8
Figure(07) : Structure de <i>1,8 cinéol</i> .....	11
Figure(08) : Structure du <i>camphre</i> .....	11
Figure(09) : Structure du <i>verbenone</i> .....	11
Figure(10) : Pelallatrice italienne .....	14
Figure(11) : Sfumatrice italienne .....	14
Figure(12) : Extracteur américain .....	14
Figure(13) : <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	23
Figure(14) : Montage de l' <i>hydrodistillation</i> type <i>Clevenger</i> .....	25
Figure(15) : Refractomètre d'Abbe .....	27
Figure(16) : pH mètre HANNA .....	28
Figure(17) : Rendement de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	32
Figure(18) : Culture d' <i>E.Coli</i> .....	38
Figure (19) : Culture de <i>S.Aureus</i> .....	38
Figure (20) : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique .....	39
Figure(21) : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	4

## Liste des tableaux

Tableau(1) : Liste des composés de la plante de <i>Rosmarinus officinalis</i> . . . . .	4
Tableau(02) : Pourcentages des composés de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> . .	10
Tableau (03) : Produits chimiques utilisés . . . . .	22
Tableau (04) : Matériels de laboratoire utilisés . . . . .	24
Tableau (05) : Protocole des tests phytochimiques . . . . .	29
Tableau (06) : Caractéristiques organoléptiques de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> . . . . .	33
Tableau (07) : Caractéristiques physiques de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> . .	34
Tableau (08) : Résultats des tests phytochimiques . . . . .	36
Tableau (09) : Résultats d'analyse antibactérienne (Souches <i>E.coli</i> ). . . . .	37
Tableau (10) : Résultats d'analyse antibactérienne (Souches <i>S.Aureus</i> ) . . . . .	37
Tableau (11) : Valeurs d'IC50 de l'acide ascorbique et de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> . . . . .	41

## Résumé

Le but de cette étude est la détermination des propriétés physicochimiques ainsi que l'évaluation des activités antibactérienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

L'extraction de l'huile essentielle à partir des feuilles de romarin est réalisée par hydrodistillation type *Clevenger*, donnant ainsi un rendement de 0,082%. Les résultats des tests phytochimiques effectués sur la macération et l'infusion, ont permis d'identifier la nature de certains composés de la plante.

L'analyse physicochimique montre que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* extraite est conforme aux normes et à la littérature. En ce qui concerne le test antioxydant, le paramètre IC 50 est déterminée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH.

Enfin l'étude antibactérienne sur l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a prouvé son efficacité sur deux souches bactérienne, *E. Coli* et *S. Aureus*.

Mots clés : Huile essentielle, extraction, évaluation, test antioxydant, activité antibactérienne.

## Abstract

The aim of this study is the determination of physicochemicals properties and the evaluation of the antibacterial and antioxydant activities of essential oil of *Rosmarinus officinalis*.

The extraction of essential oil from the leaves of the plant is realized by hydrodistillation *clevnger* type, giving a yield of 0.082%. The phytochemical tests allowed to identify the nature of the plant's compounds.

The physicochemical analysis show that the extracted essential oil of Rosmary is congruent to standars. As for the antioxydant test the parametere IC50 is determined by the DPPH radical scavenging method.

Finally, the antibacterial study of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* proves its efficiency on two bacterial strains, *E. Coli* and *S. Aureus*.

Keywords : essential oil, extraction, evaluation, antioxydant test, antibacterial study.

Depuis toujours, les huiles essentielles, et plus généralement les plantes aromatiques, ont été utilisées quotidiennement par l'homme pour se parfumer, cuisiner et se soigner.

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles est devenu une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries [1].

Dans le cadre de la valorisation des espèces algérienne, et compte tenu des vertus thérapeutiques que représentent les *Lamiacées*, nous nous sommes intéressées à la plante du Romarin provenant de la wilaya de Tizi-Ouzou.

Le romarin, herbe aromatique de la famille des *Labiés* est apprécié pour ses propriétés aromatique, antioxydante, et antimicrobienne, c'est pour cela qu'il est largement utilisé dans les produits pharmaceutiques [2].

Ce travail a pour objet l'extraction et l'évaluation des activités chimiques et biologiques de l'huile essentielle de la plante *Rosmarinus officinalis*.

Une première partie de ce mémoire est consacrée aux généralités sur la plante et à l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. Leurs compositions chimiques et leurs activités chimiques et biologiques ont été abordées.

La seconde partie comprend le matériel et les méthodes utilisés lors de la réalisation de cette étude telles que la méthode d'extraction de l'huile essentielle, l'évaluation de ses propriétés antioxydante et antibactérienne. La deuxième partie comprend les résultats obtenus et est suivie d'une conclusion.

# **1. Etude bibliographique**

## 1.1. Généralités sur la plante

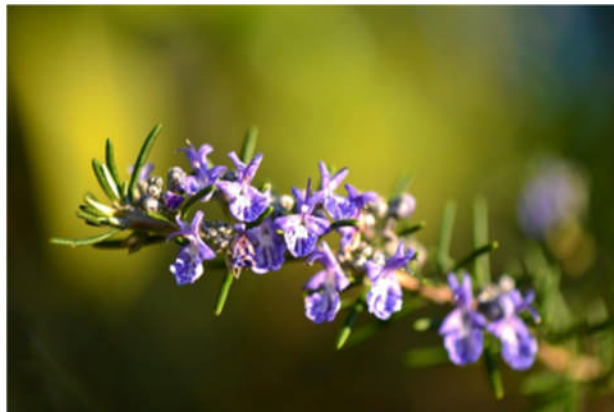
### 1.1.1. Les caractéristiques botaniques

Le romarin, *Rosmarinus officinalis*, est un arbrisseau de 50cm à 2m de haut, très répandu dans tout le bassin méditerranéen. Il affectionne particulièrement les terrains calcaires retrouvés dans les garrigues.

Il est aussi connu sous les noms de Rose marine, ou Encensier. Il possède des feuilles persistantes, sessiles, étroites à bords retournés. Elles sont vertes chagrinées sur la face supérieure et tomenteuses blanchâtres sur le dessous.

Les fleurs bleu clair ou lilas sont maculées de taches violettes et forment des inflorescences spiciformes [3].

Cependant, deux autres espèces du Romarin existent : *Rosmarinus eriocalyx* et *Rosmarinus tomentosus* mais n'ont que peu d'intérêt médicinal [4].



**Figure 1** : fleurs et feuilles de *Rosmarinus officinalis* [4].

### 1.1.2. La taxonomie

La classification botanique complète du genre *Rosmarinus L.* n'a été achevée qu'au début du 20<sup>ème</sup> siècle en raison de l'extrême variabilité des espèces. Le romarin appartient à la deuxième série de la famille des labiées ou Lamiacées qui en compte six.

Cette famille, l'une des plus importantes de la flore d'Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces [5].

**Quezel et Santa (1963)** ont classés l'espèce *R. officinalis* comme suit :

Règne Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Romarins*

Espèces : *Rosmarinus officinalis* L.

### **1.1.3. La culture du romarin**

Le Romarin pousse naturellement dans le sud de l'Europe mais il est cultivé dans le monde entier plus particulièrement dans les régions tempérées [6].

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 [7].

#### 1.1.4. La composition chimique des feuilles de la plante

La composition chimique de la plante dans son ensemble dépend du lieu de croissance ainsi que du moment de la récolte.

Les différents composés et leurs pourcentages sont représentés dans le tableau 1.

**Tableau 1** : La composition chimique des feuilles de la plante de *Rosmarinus officinalis* [4].

Composés	Molécules
<b>Acides phénols</b>	- acide rosmarinique 1,7-2,83% en moyenne - acide caféique (aucune valeur précisée) associé avec l'acide chlorogénique
<b>Diterpènes phénoliques tricycliques</b>	- acide carnos(ol)ique $\approx$ 0,35% - carnosol = picrosalvine (Valeur variable, jusqu'à 4,6% ou majoritaire) - rosmanol - rosmadial
<b>Triterpènes</b>	-acide ursolique : 2-4% en moyenne et 5% de dérivés de l'acide ursolique - acide oléanolique $\approx$ 10% - $\alpha$ - et $\beta$ -amyrines
<b>Flavones méthylées</b>	- lutéoline - genkwanine

### **1.1.5. L'intérêt du romarin**

Le romarin est une plante médicinale bien connue et, largement répandue dans les produits pharmaceutiques et la médecine. Elle est très appréciée pour ses propriétés aromatiques, antimicrobiennes et antioxydante.

#### **1.1.5.1. Usage médicinal**

L'huile essentielle de romarin entre dans la composition de plusieurs spécialités destinées à être utilisées en inhalation afin de dégager les voies respiratoires en cas de rhume ou sinusite.

Il possède d'autres intérêts médicaux, pour les traitement digestif (lenteurs de digestion, ballonnements, éructations ou encore les flatulences) par voie orale. En usage local, le romarin est utilisé éventuellement pour L'hygiène buccale (en bain de bouche). [8]

#### **1.1.5.2. En Parfumerie**

L'utilisation du romarin en parfumerie est très ancienne. On connaît en particulier l'eau de la Reine de Hongrie, alcoolat fréquemment utilisé au XVIIème siècle et qui pourrait avoir été conçu dès le XIVème siècle, dont le romarin était un des principaux composants.

Le romarin entre dans la composition de parfums surtout masculins, hespéridés aromatiques (eaux de Cologne), boisés et fougères aromatiques, ainsi que dans la formulation des pommades dermiques.

#### **1.1.5.3. En cosmétique**

L'utilisation des huiles essentielles dans la production de cosmétiques peut avoir de multiples avantages, elle peut être recommandée comme conservateur naturel. Le romarin a des propriétés dermo-purifiantes qui lui permette l'utilisation dans la préparation de déodorants [9].

#### **1.1.5.4. En Agroalimentaire**

Le romarin est une bonne source naturelle de composés antioxydants. Il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire pour prévenir une éventuelle dégradation oxydative et microbienne des aliments [10].

## **1.2. Les huiles essentielles**

### **1.2.1. Définition d'une huile essentielle**

La définition donnée par AFNOR en 2000 est la suivante : « les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche ».

Pour la Pharmacopée européenne, une huile essentielle est 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 sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement dans sa composition [11].

### **1.2.2. L'aromathérapie**

Du grec « Aroma » qui signifie odeur et de « Therapia » qui signifie soins.

Il s'agit d'une thérapeutique utilisant les essences, les huiles essentielles et les hydrolats aromatiques extraits des parties aromatiques des plantes médicinales.

Elle permet de traiter ou de prévenir les maladies physiques et psychosomatiques. Il s'agit d'une branche scientifique de la phytothérapie. [12]

### **1.2.3. La composition chimique**

Les huiles essentielles sont un mélange complexe de divers constituants. Au total, plus de 3 000 constituants ont été isolés à partir des huiles essentielles.

L'activité thérapeutique d'une huile essentielle étant liée à sa structure biochimique, seules les principales familles biochimiques seront présentées. [13]

Elles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phenylpropane.

### 1.2.3.1. Les composés terpéniques

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à cinq atomes de carbone ( $C_5H_8$ ). Par des réactions de combinaisons et enchaînements, à partir de cette base, sont formés : les monoterpènes ( $C_{10}H_{16}$ ), les sesquiterpènes ( $C_{15}H_{24}$ ) et les diterpènes [14].

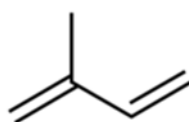


Figure 2 : structure d'isoprène [17]

#### 1.2.3.1.1. Les monoterpènes

Les monoterpènes comportent deux unités d'isoprène ( $C_5H_8$ ). Volatiles, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable dont la majorité des constituants des huiles essentielles, parfois 90%.

Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocycliques ou bicycliques (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales : alcool (géraniol, menthol) aldéhydes (geranial, citronellal), cétones (carvone, menthone) et des esters (acetate de géranyle, acetate de linalyle) [12]

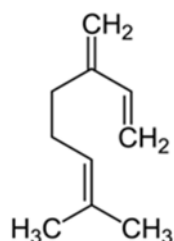


Figure 3 : structure de la myrcène [13]

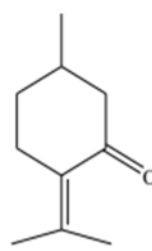


figure 4 : structure du puléguone [13]

### 1.2.3.1.2 Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en  $C_{15}H_{22}$  (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques.

Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature [16].

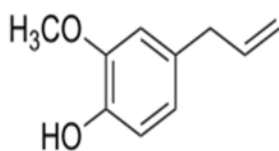
### 1.2.3.1.3. Les diterpènes

Ils sont composés de quatre unités d'isoprène f, qui en font des molécules assez rares dans les huiles essentielles et présentes en faible quantité [13].

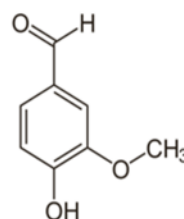
### 1.2.3.2. Les composés aromatiques

Contrairement aux composés terpéniques, les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles.

Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la *vanilline* et l'*Eugéno*l [12].



**Figure 5** : structure de l'*Eugéno*l [15].



**Figure 6** : structure de la *Vanilline* [15].

#### **1.2.4. Les intérêts pharmacologiques des huiles essentielles**

La plupart des huiles essentielles possèdent les propriétés suivantes : antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiparasitaires, spasmolytiques, apaisantes.

En plus de leurs propriétés générales, chaque huile essentielle aura ses propriétés spécifiques [4].

#### **1.2.5. L'intérêt culinaire**

Les huiles essentielles sont devenues des arômes naturels et des rehausseurs de goût dans de nombreux domaines de l'agroalimentaire : liqueurs, boissons, confiseries, plats cuisinés [19].

Certaines trouvent leur place comme antioxydant en lieu et place des conservateurs chimiques potentiellement toxiques mais surtout de plus en plus impopulaires.

Un certain nombre d'herbes aromatiques, notamment de la famille des *Lamiaceae* dont le romarin, ont montré leur efficacité pour la conservation de la viande ou de certains plats cuisinés [19].

#### **1.2.6 la conservation et le stockage des huiles essentielles**

Après l'extraction, l'huile essentielle ne doit faire l'objet d'aucun traitement chimique ou physique pouvant entraîner une modification sensible de sa composition naturelle.

Avant le stockage dans des cuves inaltérables et hermétiques, l'huile essentielle est d'abord filtrée, Les cuves sont ensuite rangées dans un endroit frais à l'abri de la chaleur, de l'air et de la lumière. Pour être commercialisées, les huiles essentielles sont transférées dans des flacons étanches et de faible volume, filtrant les radiations IR et UV : en acier inoxydable, en aluminium ou en verres colorés (bleus ou bruns) ; avec des bouchons inertes (pas de liège) [12].

La durée de conservation d'une huile essentielle est de 12 à 18 mois, à une température maximale de 25C<sup>0</sup>. Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des huiles essentielles (norme NF 75-002, 1996).

### 1.3. L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

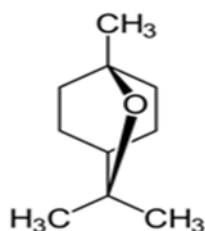
L'huile essentielle de romarin peut présenter trois profils chimiques différents. On distingue le romarin à camphre (*Rosmarinus officinalis* L. ct camphre). Le deuxième chémotype est le romarin à verbénone et acétate de bornyle (*Rosmarinus officinalis* L. ct verbénone). Et Le romarin à 1,8-cinéole (*Rosmarinus officinalis* L. ct 1,8-cinéole) [4].

#### 1.3.1. La composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

La composition chimique d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a été déterminé à partir des résultats d'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

**Tableau 2 : le pourcentage des composés de l'huile essentielle de Romarin [17].**

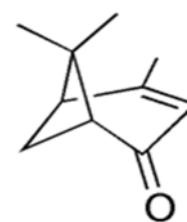
Composé	Pourcentage (%)
Alpha-pinène	<b>9,84</b>
Camphène	<b>4,27</b>
Beta-pinène	<b>0,10</b>
Beta-myrcène	<b>1,94</b>
Cineole	<b>51,77</b>
p-cymène	<b>0,51</b>
Camphre	<b>22,31</b>
Acetate de Bornyle	<b>1,02</b>
Alpha-terpinéole	<b>5,04</b>
Bornéole	<b>2,80</b>
Verbenone	<b>0,11</b>



**Figure 7 :** structure de *1,8-Cinéol* [4].



**figure 8 :** structure du *Camphre* [4].



**figure 9 :** structure du *Verbenone* [4].

### 1.3.2. La notion de chemotype

Le concept de chémotype permet de distinguer deux ou plusieurs huiles essentielles de composition chimique différente produites à partir de plantes de la même espèce, définie par sa dénomination scientifique et non à partir de sa dénomination commune [18].

### 1.3.3. Les propriétés pharmacologiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

#### 1.3.3.1. L'activité antioxydante

Les produits naturels antioxydants sont de plus en plus utilisés pour traiter diverses affections hépatiques. L'HE de Romarin empêche l'augmentation de la peroxydation lipidique induite dans des homogénats de foie.

En plus de présenter une activité de piégeage des radicaux libres, elle présente un effet hépatoprotecteur à travers l'activation des mécanismes de défense physiologiques [4].

#### 1.3.3.2. L'activité antibactérienne

L'huile essentielle de romarin a été testée sous différentes formes contre différentes bactéries à Gram positif ou négatif responsables de différents types de pathologies [4].

### **1.3.3.3 L'activité anti-inflammatoire**

Le composant majoritaire de l'huile essentielle de Romarin est l'alpha-pinène, connu comme ayant une activité anti-inflammatoire. En outre, l'alpha-pinène a un effet inhibiteur sur la translocation nucléaire du NF-kappa B qui joue un rôle important dans la colite.

Le 1,8-cinéole, un autre composant de l'huile essentielle de Romarin, a également des activités anti-inflammatoires et analgésiques. Par conséquent, il est probable que l'alpha-pinène et le 1,8-cinéole soient, au moins en partie, responsables des effets antiulcéreux et anti-inflammatoire mis en évidence dans cette étude [4].

### **1.3.3.4. L'activité anti-hypotensive**

Une étude a examiné l'effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur l'hypotension primaire (fatigue passagère, sensation de faiblesse) et son influence sur les aspects physiques et psychologiques.

Les résultats obtenus dans cette étude clinique prospective prouvent l'effet antihypotensif de l'huile essentielle de Romarin et sa relation avec l'amélioration de la qualité de vie des patients [4].

## **1.4. Généralités sur les méthodes d'extraction**

Les huiles essentielles sont des liquides extraits de plantes aromatique, qui ont diverses applications dans diverses industries. Plusieurs méthodes sont mises en œuvre pour extraire les huiles essentielles, et chacune exhibe des avantages mais également des inconvénients.

### **1.4.1. Les méthodes conventionnelles**

#### **1.4.1.1. L'extraction par solvants volatils**

Grâce à leur pouvoir d'extraction qui est supérieure à celui de l'eau [22]. Les solvants sont l'outil principal de ce type d'extraction dite " classique ". Le principe consiste à mettre en contact un solvant volatil avec le corps végétal en question dans un extracteur.

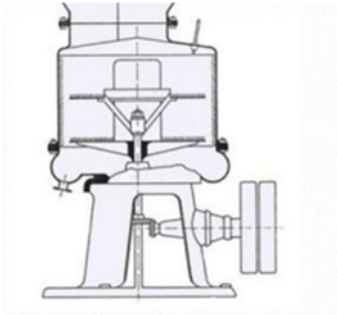
Suite à des lavages successifs le solvant va se charger en molécules aromatiques et envoyé ainsi au concentrateur pour y être distillé. L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. [23]

La manipulation de solvants organiques présente des risques d'intoxication aigues mais également chroniques tant par l'inhalation des vapeurs que par le contact cutané, cela a induit à l'apparition de diverses maladies professionnelles. La présence de solvant inflammables (comme les alcools), les réactions chimiques dangereuses aggravent le risque d'incendie et d'explosion ainsi que la destruction de la faune et la flore.

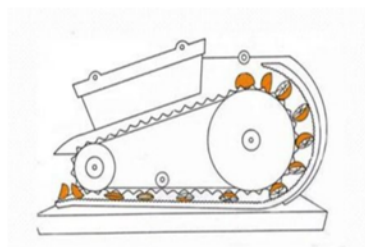
#### **1.4.1.2. L'expression à froid**

L'expression à froid est certainement la méthode la plus simple et la plus limitée de celles citées précédemment car elle est réservée aux essences de citrus (orange, citron, pamplemousse...)

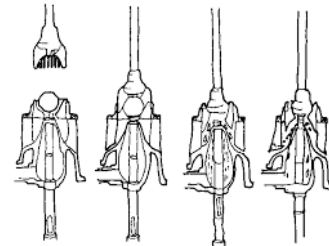
Les appareils utilisés sont des machines en continue qui, font éclater les cellules et libèrent l'huile essentielle qui se trouve dans la peau, le zeste en grattant (pellatrices italiennes, figure 10), pressent (sfumatrices italiennes figure 11), ou réalisent les deux opérations en même combinaison (Extracteur américain « FMC In-line », figure 12) [19].



**Figure 10 :** pellatrice  
Italienne [19].



**figure 11 :** sfumatrice  
Italienne [19].



**figure 12 :** extracteur  
Américain [19].

### 1.4.1.3. L'hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus anciennement utilisée ainsi que la plus simple. Le principe de l'hydrodistillation consiste en une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult). [24]

Le procédé consiste à mettre la matière première végétale ; dans un ballon, en contact avec de l'eau. Le tout sera placé sur une source de chaleur et porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau. Les vapeurs sont par la suite condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité.

Ce procédé d'extraction présente plusieurs avantages. Outre sa relative simplicité de mise en œuvre, c'est son faible coût qui en fait une méthode d'intérêt. De plus, la matière végétale étant en suspension dans l'eau, on peut lui appliquer un brassage qui assure la pénétration de l'eau en son cœur, là où la vapeur d'eau utilisée dans d'autres méthodes, ne peut pénétrer.

Un certain nombre d'inconvénients ont fait que cette méthode est peu à peu remplacée par d'autres. C'est une méthode qui ne s'applique qu'à une plus petite échelle que d'autres techniques. C'est également un procédé beaucoup plus lent que l'entraînement à la vapeur.

Dans cette technique, la matière première baigne dans l'eau, à température élevée et pendant plusieurs heures, ce qui facilite la survenue d'un certain nombre de transformations au sein de l'essence. Les esters sont en partie hydrolysés, les hydrocarbures monoterpéniques acycliques et les aldéhydes ont tendance à polymériser. Certains composés oxygénés tels que les phénols se dissolvent en partie dans l'eau contenue dans l'alambic et ne sont donc pas extraits [25].

#### **1.4.1.4. L'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 [16]. 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 végétal, 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. L'un des principaux intérêts de cette méthode par rapport à l'hydrodistillation est la préservation de la qualité de l'essence. En effet, la plante ne macère pas dans l'eau, ce qui limite les phénomènes d'hydrolyse mais également de solubilisation de certains composés hydrosolubles (comme les phénols) qui sont donc mieux extraits

Le risque de dégradation par la chaleur est également mieux maîtrisé puisque le chauffage ne se fait pas directement sur la cuve contenant la matière première végétale [26].

La génération de la vapeur dans une chaudière externe permet d'en contrôler la quantité, la pression ou encore la température à laquelle se fait l'extraction ; elle permet également de réduire le temps d'extraction et l'apport énergétique nécessaire. Enfin, l'entraînement à la vapeur permet généralement des extractions à plus grande échelle.

Cette méthode trouve sa limite dans le coût des installations nécessaires à sa mise en œuvre, bien plus important que pour l'hydrodistillation. Cela pose un problème de rentabilité pour les huiles essentielles présentes en grande quantité et à faible prix sur le marché.

Un problème d'accessibilité du matériel se présente également dans les zones pauvres ou particulièrement reculées [19].

#### **1.4.1.5. L'hydrodiffusion**

L'hydrodiffusion 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 [16].

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

#### **1.4.2. Les méthodes innovantes**

##### **1.4.2.1. L'extraction par fluides supercritiques (FSC)**

L'extraction par fluide supercritique (FSC) est équivalente à l'extraction par un solvant liquide classique. Le principe de cette extraction repose sur une distribution inégale de divers constituants entre deux phases non miscibles, la phase à extraire et la phase " extractante " (ou solvant).

Le dioxyde de carbone supercritique est actuellement le FSC le plus utilisé. Car il a des coordonnées critiques relativement basses, permettant une mise en œuvre aisée [19].

Son développement découle également du fait qu'il est peu onéreux, non-inflammable, inerte chimiquement et son innocuité le rend compatible aux contraintes de normes propres à l'agro-alimentaire et à la pharmacie. De plus, le CO<sub>2</sub> a reçu la mention **GRAS** ( **Generally recognize as safe**) de la part de la **FOOD & DRUG administration** (USA).

L'ensemble sera chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement.

#### **1.4.2.2. L'extraction assistée par micro-ondes**

Ce procédé consiste à irradier par micro-onde de la matière végétal en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes pour l'extraction des composés polaires ou bien en présence d'un solvant transparent pour les micro-ondes pour extraire les composés apolaires.

L'extraction par micro-ondes a prouvé que c'est une technique avec plusieurs avantages comparée aux méthodes d'extraction conventionnelles et on peut citer : un meilleur rendement en huiles essentielles, meilleure contenance en composés oxygénés, un temps d'extraction réduit et pour finir elle s'inscrit dans une démarche plus environnementale et plus respectueuse [27].

### **1.5. Les analyses des huiles essentielles**

#### **1.5.1. L'analyse olfactive**

L'analyse olfactive d'une huile essentielle est d'une grande importance, d'autant plus si elle a pour finalité d'être employée dans les secteurs des arômes, parfums, cosmétiques. En effet, si l'odeur d'une huile essentielle n'est pas satisfaisante, très souvent, même si les autres analyses sont conformes, l'extrait sera rejeté [19].

#### **1.5.2. Les mesures physiques**

De nombreuses mesures physiques simples servent à contrôler la qualité des huiles essentielles.

##### **1.5.2.1. La densité**

La densité ou densité relative d'une huile essentielle est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique d'un corps pris comme référence, de l'eau distillée à 20 °C [19].

Cette grandeur est sans dimension, symbolisée  $d_{20}^{20}$ . Selon la nature de l'huile essentielle, il peut être nécessaire d'effectuer la mesure à une température différente de 20 °C, il faut alors le mentionner. La correction moyenne, aux environs de 20 °C, est de 0.0007 à 0.0008 par degré Celsius.

#### **1.5.2.2. L'indice de réfraction**

L'indice de réfraction, est « le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux d'une longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante » [19].

Ces mesures sont réalisées à l'aide d'un réfractomètre. Selon le type d'instrument utilisé, une mesure est effectuée soit directement soit par observation de la limite de réflexion totale, l'huile essentielle étant maintenue dans des conditions de transparence et d'isotropisme.

#### **1.5.3. Les analyses chimiques**

La quantification des constituants des huiles essentielles pour évaluer leur qualité passe souvent par la mesure d'un indice obtenu à l'aide d'un titrage (indice d'acide, indice d'ester) [19].

##### **1.5.3.1. L'indice d'acide**

La mesure de l'indice d'acide est une mesure importante dans le contrôle des huiles essentielles.

L'indice d'acide est défini comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides contenus dans un gramme d'huile essentielle.

## **1.6. Les activités chimiques et biologiques des huiles essentielles**

De nombreuses huiles essentielles et leurs composés majoritaires ont été définis comme agents antioxydants et antibactériens.

Ainsi leur importance dans la thérapie ne cesse de croître, surtout qu'elles sont des mélanges d'hydrocarbure saturés et insaturés, aldéhydes, esters, éthers, ketones, phénols et terpènes [29].

### **1.6.1. Les huiles essentielles en tant qu'antioxydants**

Les réactions d'oxydations peuvent être accélérées par plusieurs paramètres, comme la présence de radicaux libres, une température élevée, la présence de la lumière solaire ou bien encore une trace de métaux de transition [19].

D'importants travaux de recherche ont conduit diverses industries à se tourner vers les huiles essentielles qui constituent une source potentielle de molécules bioactives pour d'éventuelles utilisations en tant qu'antioxydants.

#### **1.6.1.1. Les principales techniques de détermination de l'activité antioxydante des huiles essentielles**

Il n'existe pas de test universel mais une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante [30] [31].

On pourra citer la méthode TEAC (*Trolox Equivalent Antioxydant Capacity*), méthode utilisant un accepteur d'électrons sel d'aluminium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS<sup>•+</sup>), radical relativement stable de coloration bleu vert.

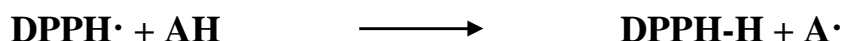
Ou encore l'évaluation du potentiel antioxydant FRAP (*Ferric Reducing Antioxydant Power*) basée sur l'étude de la réduction de l'ion ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>).

Cependant, nous allons nous intéresser au test DPPH.

#### 1.6.1.1.1. Test du radical libre stable DPPH

Ce test nous permet de manière relativement simple de mettre en évidence le pouvoir antiradicalaire d'une huile essentielle. Cette méthode mesure la capacité réductrice d'un antioxydant en présence d'un radical libre, le DPPH· (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) [19].

Ce dernier est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de couleur violette, présentant une bande d'absorption maximale à 515 nm. La réduction du radical DPPH· par un donneur d'atome H(AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine incolore (DPPH-H) et au radical A·.



Plus un composé aura de facilité à céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci sera jugé efficace en tant qu'antioxydant.

Le potentiel donneur d'un atome d'H d'un échantillon est le plus souvent exprimé par le paramètre **IC<sub>50</sub>**, qui correspond à la concentration nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale de DPPH·. Plus l'**IC<sub>50</sub>** est petite, plus la molécule est antioxydante.

#### 1.6.2. Test antimicrobien

Les huiles essentielles sont obtenues à partir de matière végétales (fleurs, feuilles, fruits...). Elles possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales.

La phytothérapie n'a pas attendu les découvertes scientifiques pour exploiter les vertus des plantes. En effet, la fonction antimicrobienne des huiles essentielles est exploitée depuis l'antiquité.

Les premières recherches expérimentales des propriétés antibactériennes des huiles essentielles seraient attribuées à De la Croix, en 1881. De nombreuses études sur la composition chimique des huiles essentielles et leurs activités biologiques (antioxydantes, antimicrobienne, insecticide, herbicides...) ont été publiées à l'échelle mondiale [32] [33].

Les recherches ont montré que la fonction antimicrobienne s'exerce de deux manières selon les types de micro-organismes et de biomolécules :

-**Activité inhibitrice ou microbiostatique** : blocage de la multiplication des cellules microbiennes ;

-**Activité létale ou microbicide** : mort des cellules microbiennes

### **1.6.2.1. Les méthodes de l'activité antimicrobiennes des huiles essentielles**

Les diverses études menées dans ce domaine ont montré la diversité des méthodologies employées pour mettre en évidence les activités antimicrobiennes des huiles essentielles. Le choix de la technique utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne a une grande influence sur les résultats.

L'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau et leur volatilité constituent les principales difficultés rencontrées [19].

Ces méthodes sont applicables en milieu solide ou en milieu liquide. Les différents protocoles sont classés selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. Dans ce travail nous allons porter intérêt pour "*les méthodes par diffusion sur milieux solide*" et particulièrement pour "*la méthode des disques*".

#### **1.6.2.1.1. Méthodes par diffusion sur milieux solides**

Il s'agit de méthodes qualitatives permettant de tester la sensibilité ou la résistance des micro-organismes aux huiles essentielles par contact direct.

##### **1.6.2.1.1.1. Méthode des disques**

L'évaluation technique de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est l'aromatogramme, semblable à l'antibiogramme qui permet de tester les antibiotiques, appelée « méthode des disques ».

## **2. MATERIELS ET METHODES**

## 2.1. Matériels

### 2.1.1. Le matériel chimique

Les produits chimiques utilisés durant notre expérimentation sont représentés dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** produits chimiques utilisés

Matériels	Utilisation
Eau distillée	Extraction de l'HE, tests phytochimiques.
Acétone	Lavage du Clevenger.
Acide sulfurique	Tests phytochimiques
Ethanol 96%	Tests phytochimiques
Acide chloridrique	Tests phytochimiques
Coupeaux de magnésium	Tests phytochimiques
Chlorure de fer	Tests phytochimiques
Chloroforme	Tests phytochimiques
Anhydride acétique	Tests phytochimiques
Réactif de Mayer, Réactif de Dragendorf.	Tests phytochimiques
Acide sulfurique à 10%	Tests phytochimiques
DPPH	Activité antioxydante
Acide chlroridrique 0.5N	Titration
Hydroxyde de potassium $10^{-2}$	Titration
Phénolphaléine	Titration

### 2.1.2. Les matériels biologiques

#### 2.1.2.1 Le matériel végétal

La partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* ont été récoltés au mois de mai dans la région de Larbaa Nath Irathen située au centre-est de la wilaya de Tizi-Ouzou.

L'identification botanique a été faite par Mme BEN SMAIL enseignante au sein du département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'UMMTO.

Après la récolte, les parties aériennes ont été isolées et séchées à l'ombre dans un endroit bien aéré pendant 10 à 15 jours, ensuite conservées dans des sacs jusqu'à leur utilisation pour l'extraction.



**Figure 13 :** *Romarinus officinalis* (Photo originale)

#### **2.1.2.2- Le milieu de culture**

Les souches bactériennes utilisées sont *Escherichia Coli* et *staphylococcus Aureus*.

Le milieu de culture est gélosé.

#### **2.1.3. Les matériels de laboratoire**

Le matériel utilisé pour mener les différentes étapes d'extraction, caractérisation et de l'étude antibactérienne ainsi que l'activité antioxydante est regroupé dans le tableau 4.

Tableau 4 : les matériels de laboratoire utilisés

Appareillage	Verreries	Appareil de mesure	Matériel d'analyse
Balance analytique	Fioles jaugées	Refractomètre d'Abbe	Spectrophotomètre UV-visible
Chauffes ballons	Béchers		
Clevenger	Cristallisoirs	PH mètre	
Bain thermostatique	Pipettes		
Réfrigérateur	Tubes en verre		
Plaque chauffante	Eprouvettes		
Agitateur	Verres de montre		
Barreau aimanté	Boîtes de pétri		
Autoclave	Ballons		
Etuve			
Micropipette			

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. L'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par *hydrodistillation* type *Clevenger*. 100 g de plante sèche (romarin) sont introduit dans un ballon de 2 L rempli à 2/3 d'eau distillée, l'ensemble a été porté à ébullition (Figure 14).



**Figure 14** : montage de l'hydrodistillation  
Type *Clevenger* (photo originale).

Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. L'huile essentielle est ensuite récupérée à l'aide d'une seringue puis, mise dans des Eppendorfs et stockée au réfrigérateur.

#### **2.2.1.1. Détermination du rendement**

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse ( $M'$ ) d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse ( $M$ ) de la matière végétale utilisée. Le rendement est exprimé en pourcentage par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = \frac{M'}{M} * 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en (%).

$M'$  : Masse d'huile essentielle en gramme.

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

## **2.2.2. Caractérisation de l'huile essentielle**

### **2.2.2.1. Tests organoleptiques**

L'aspect, la couleur et l'odeur de l'huile essentielle ont été déterminés par voies sensorielles.

### **2.2.2.2. Caractéristiques physiques**

#### **2.2.2.2.1. Mesure de la densité**

La densité permet d'avoir une idée sur le caractère physique de l'huile essentielle [19]. La densité est donnée par l'expression suivante :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m<sub>0</sub> : la masse de l'Eppendorf vide (en g)

m<sub>1</sub> : la masse de l'Eppendorf rempli d'eau distillée (en g)

m<sub>2</sub> : la masse de l'Eppendorf rempli d'HE (en g)

#### **2.2.2.2.2 Taux d'humidité**

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau.

L'évaluation du taux d'humidité des plantes a été effectuée suivant la méthode décrite par Twidwell et ses collaborateurs, qui consiste à sécher une masse des feuilles de la plante à l'étuve à une température de 105 ± 5 °C pendant environ 2 heures.

Le calcul est effectué à l'aide de l'équation suivante :

$$H\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100$$

m1 : masse de l'échantillon avant séchage (en g).

m2 : masse de l'échantillon après séchage (en g).

### 2.2.2.2.3. L'indice de réfraction

La mesure de l'indice de réfraction est effectuée au moyen du réfractomètre d'Abbe (figure 15) et calculé à l'aide de l'équation suivante [19].

$$n_D^T = n_D^{T'} + 0.0004 * (T' - T)$$

Où la température de référence est de 20 °C

$n_D^T$ : Indice de réfraction à 20 °C.

$n_D^{T'}$ : Valeur de lecture



**Figure 15 :** réfractomètre d'Abbe (Photo originale)

#### 2.2.2.2.4. Le potentiel Hydrogène pH

La mesure du PH a été réalisée à l'aide d'un PH mètre.



**Figure 16** : pH mètre HANNA (Photo originale)

#### 2.2.2.3. Les caractéristiques chimiques

##### 2.2.2.3.1. L'indice d'acide

0.5g d'huile essentielle sont introduites dans un ballon 1.5 ml d'éthanol neutralisé et 2 à 3 gouttes d'indicateur coloré. Nous titrons le liquide avec la solution (0.1N) d'hydroxyde de potassium contenue dans une burette.

Nous poursuivons l'addition jusqu'à l'obtention du virage permanent de la solution (rose) pendant 30 secondes. Nous notons ensuite la valeur du volume de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée.

Calcul de l'indice d'acide :

$$IA = \frac{(56.1 * V * N)}{m}$$

m : Masse de l'huile (g)

V : volume de la solution de KOH

N : Normalité de la solution de KOH

### 2.2.3.2. Les tests phytochimiques

Les différents tests que nous avons réalisés sont représentés dans le tableau 5.

**Tableau 5** : Le protocole des tests phytochimiques

Test	Protocole	Résultats positifs
<b>Saponosides</b>	Quelques milligrammes d'extrait + 5ml d'eau distillée ensuite agiter vigoureusement.	Formation d'une mousse stable de hauteur supérieur à 1 cm, persistant pendant plus de 15min
<b>Alcaloïdes</b>	Macéré + quelques gouttes du réactif de Mayer et de wigger.	Formation d'un précipité blanc avec le 1 <sup>er</sup> réactif, et un précipité rouge avec le 2 <sup>ème</sup>
<b>Tanins</b>	10ml d'extrait + qlq goutte de FeCl <sub>3</sub>	Apparition d'une couleur verte très foncé ou bleu noir
<b>Flavonoïdes</b>	5ml d'extrait bien mélangés avec 4ml d'éthanol + 1ml de HCl + quelques copeaux de Magnésium	Apparition d'une couleur marronne très claire
<b>Stéroïdes</b>	5ml d'extrait + 2 gouttes d'anhydride acétique + 1 goutte d'acide sulfurique	Couleur mauve ou violette
<b>Terpenoïdes</b>	5ml d'extrait, sont ajoutés 2ml de chloroforme et 3ml d'H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Apparition de deux phases et une couleur marronne à l'interface

#### La préparation de l'extrait

Nous avons pesé 10 g de plante et nous les avons introduits dans de l'eau chaude pendant 15 minutes, après nous avons filtré le mélange et nous avons obtenu l'extrait.

#### La préparation du macéra

5 g d'organe végétale est macéré dans 10 ml de la solution de HCl à 1% pendant 24 h. Le macéré est ensuite récupéré après filtration.

### **2.2.3. L'étude antibactérienne**

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée avec la méthode de diffusion sur disque en milieu solide pour l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. Deux souches bactériennes de référence ont été utilisées, *Staphylococcus aureus* MU50, et *Escherichia coli* ATCC 25922 [34].

#### **2.2.3.1. Les préparations**

Le milieu de culture (gélose Mueller-Hinton) a été réparti dans des boîtes de pétri stériles. Nous les avons laissés sur la paillasse pour que la gélose refroidisse et se solidifie.

L'inoculum a été préparé par le prélèvement de colonies isolées d'une culture jeune pour les deux souches. Ensuite, nous les avons suspensionnées dans 10 ml d'eau physiologique.

#### **2.2.3.2. L'ensemencement**

Les suspensions bactériennes ont été étalées à l'aide d'un écouvillon stérile dans chaque boîte en appliquant des stries serrées sur toute la surface de la boîte et dans tous les sens. A l'aide d'une pince stérile, quatre disques (de 6mm de diamètre du papier Wattman) ont été placés dans les boîtes de pétri.

Sur les quatre disques, nous avons déposé des concentrations de 4, 8, 12, 16  $\mu$ l d'huile essentielle. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve pendant une durée de 24h heures à 37°C.

#### **2.2.3.3. La lecture**

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition qui ont été mesurés à l'aide d'une règle, et peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des différentes concentrations d'huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* étudiées [35].

#### 2.2.4. Activité antioxydante

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -diphényl- $\beta$ -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier l'activité antioxydant. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515 nm [36].

##### 2.2.4.1. La préparation des solutions

Une solution de DPPH a été préparée à une concentration de 0.04 mg/ml afin d'avoir une absorbance comprise entre 0.6 et 1. Les solutions mères ont été préparées dans l'éthanol à une concentration de 100 mg/ml pour les échantillons d'huile essentielle et une concentration de 1 mg/ml pour le témoin positif (acide ascorbique). Les solutions mères ont été diluées pour aboutir à des solutions filles de concentration 1/2, 1/4 et 1/6 pour les échantillons et à (75, 50, 25, et 12.5) % pour la solution d'acide ascorbique.

##### 2.2.4.2. La réalisation de l'essai

Le pouvoir antioxydant des échantillons étudiés et de l'échantillon témoin est mis en évidence par le mélange de 40  $\mu$ l de l'échantillon avec 2 ml de la solution de DPPH. La lecture de l'absorbance de ce mélange est faite après 1 heure d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière.

##### 2.2.4.3. La détermination du pourcentage d'inhibition

L'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I%) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$I\% = \frac{(A_b - A_e)}{A_b} * 100$$

Ab : ABS du blanc

Ae : ABS de l'échantillon

Tous les essais ont été effectués en double. Les courbes du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations sont tracées pour déterminer les concentrations qui donnent 50% d'inhibition **IC50**.

# **3. RESULTATS ET DISCUSSION**

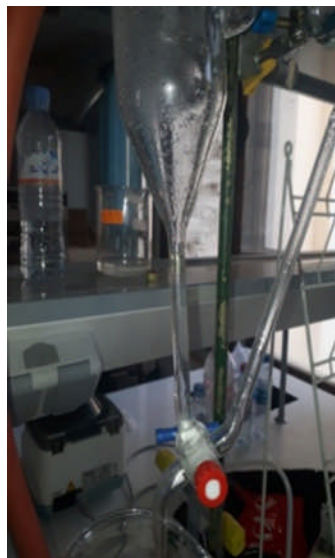
### 3.1. L'extraction de l'huile essentielle

#### 3.1.1. Le rendement

Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante.

Le rendement de l'huile essentielle de Romarin extraite est

$$\text{RHE} = 0.0824\%$$



**Figure 17 :** Le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* (Photo originale)

Ce rendement est relativement faible par rapport à celui trouvé dans les normes (AFNOR). Cette différence dans les résultats est probablement due à l'origine de l'espèce, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage ou encore la méthode et les conditions d'extraction au laboratoire.

Ainsi l'espèce de Romarin étudiée s'agit de *Rosmarinus officinalis* non arrosé, et comme il est connu cette espèce donne un rendement relativement faible.

### 3.2. Caractérisation de l'huile essentielle de romarin

La détermination de la qualité des huiles essentielles est primordiale. Elle s'évalue à travers de nombreuses analyses physiques, chimiques ou sensorielles et chromatographiques. Les différents contrôles portent sur les caractéristiques organoleptiques, sur les constantes physiques et sur les caractéristiques chromatographiques des huiles essentielles.

Très souvent, ces analyses ont été développées et mises en place par des commissions nationales et internationales d'expert de type ISO ou AFNOR.

#### 3.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Il s'agit de déterminer l'aspect, la couleur et l'odeur de l'huile essentielle.

Les informations données par les normes AFNOR pour l'HE de *Rosmarinus officinalis* sont :

**Aspect** : liquide mobile, limpide.

**Couleur** : liquide incolore à jaune pâle ou jaune verdâtre.

**Odeur** : caractéristique : agreste (champêtre), cinéolée, plus ou moins camphrée.

Les caractéristiques organoleptiques de notre huile essentielle sont représentées dans le tableau 6.

**Tableau 6** : Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Aspect	Couleur	Odeur
Liquide et mobile	Jaune pale	Forte et épicée

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle extraite sont en accord avec celles obtenues par les normes (AFNOR ,1999).

### 3.2.2. Caractéristiques physicochimiques

La détermination de ces paramètres a été réalisée au niveau de laboratoire de chimie pharmaceutique du département de chimie de la faculté des sciences de l'UMMTO.

#### 3.2.2.1. Les caractéristiques physiques

Les valeurs des caractéristiques physiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sont représentés dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Caractéristiques physiques de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

	Densité (g/cm <sup>3</sup> )	Taux d'humidité (%)	Indice de réfraction	pH
<b>Valeurs trouvées</b>	0.911	31,16	1,465	6,3
<b>Normes</b>	[0,905-0.921]	/	[1,464-1,473]	pH < 7

##### 3.2.2.1.1. La densité

Le résultat trouvé est conforme à la norme décrite par AFNOR. Ce paramètre est lié à la composition chimique de cette huile qui est affectée par un grand nombre de facteurs tels que le moment de récolte, le type de terrain, la conservation, le procédé et les conditions d'extraction.

#### **3.2.2.1.2. Le taux d'humidité**

Selon le résultat obtenu, le taux d'humidité est faible. On constate que plus de la moitié du poids de la plante est sèche.

#### **3.2.2.1.3. L'indice de réfraction**

La valeur trouvée est conforme aux normes décrites par la pharmacopée européenne 2014.

#### **3.2.2.1.4. Le potentiel d'hydrogène**

La valeur de pH mesurée est  $< 7$ , cela signifie que le pH de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est acide.

### **3.2.2.2. Caractéristiques chimiques**

#### **3.2.2.2.1. Indice d'acide**

Après le titrage par KOH (0.1 M) on a obtenu un virage de couleur rose persistant pendant 20 secondes à peu près cela signifie que les acides libres sont neutralisés par la solution d'éthanol titrée d'hydroxyde de potassium.

La valeur d'indice d'acide de notre huile est de 1,22. Cette valeur est comprise dans l'intervalle de valeurs [0,5-2] précisé par AFNOR (1999).

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans notre huile. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations.

### 3.2.2.2.2. Tests phytochimiques

Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur les feuilles de romarin sont regroupés dans le tableau 8.

**Tableau 8** : Résultats des tests phytochimiques

Test	Résultat
Alcaloïdes	-
Flavonoïdes	+
Saponoïdes	+
Stérols	-
Tanins	+
Terpenoïdes	+

Ces résultats ont permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes, saponoïdes, tanins et les terpenoïdes dans les feuilles de *Rosmarinus officinalis*.

### 3.3. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les échantillons à tester vis-à-vis de deux bactéries pathogènes *Escherichia coli* (Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram+).

Le pouvoir antibactérien est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (mm). Les résultats expérimentaux sont représentés dans les tableaux 9 et 10.

**Tableau 9** : Résultats d'analyse antibactérienne (Souche *E. Coli*)

<b>Concentration De l'HE testée en (µg /ml)</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>16</b>
<b>Diamètre d'inhibition en (mm)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>10,5</b>	<b>16</b>
<b>Sensibilité</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>

**Tableau 10** : Résultats d'analyse antibactérienne (Souche *S. Aureus*)

<b>Concentration de l'HE testée en (µg /ml)</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>16</b>
<b>Diamètre d'inhibition en(mm)</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>15</b>
<b>Sensibilité</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

(-) : Non sensible, (+) : sensible, (++) : très sensible

D'après les résultats donnés par les tableaux 9 et 10, on constate que les deux souches testées présentent une sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* à différentes dilutions.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre. La valeur du diamètre d'inhibition d'*E. Coli* est de 16 mm tandis que celui de *S. Aureus* est de 15 mm à 16 µg /ml. Cela signifie que l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a plus d'effet sur *E. Coli* que sur *S. Aureus*.

L'activité antibactérienne est due essentiellement à la présence des molécules antibactérienne. L'huile essentielle est riche en monoterpènes hydrocarbures, terpinènes qui sont dotés d'une grande activité antibactérienne contre les bactéries Gram négatif et positif.

Ces composants chimiques exercent leur activité antimicrobienne sur les micro-organismes par la perturbation de l'intégrité membranaire. Selon Wang et ses collaborateurs, la présence de bornéol, 1-Verbenone, -linalol, camphor et d'autres composés phénoliques dans les huiles essentielles de romarin sont responsables à cette activité [37].



**Figure 18** : culture d'*E. Coli*.



**Figure 19** : culture de *S. Aureus*.

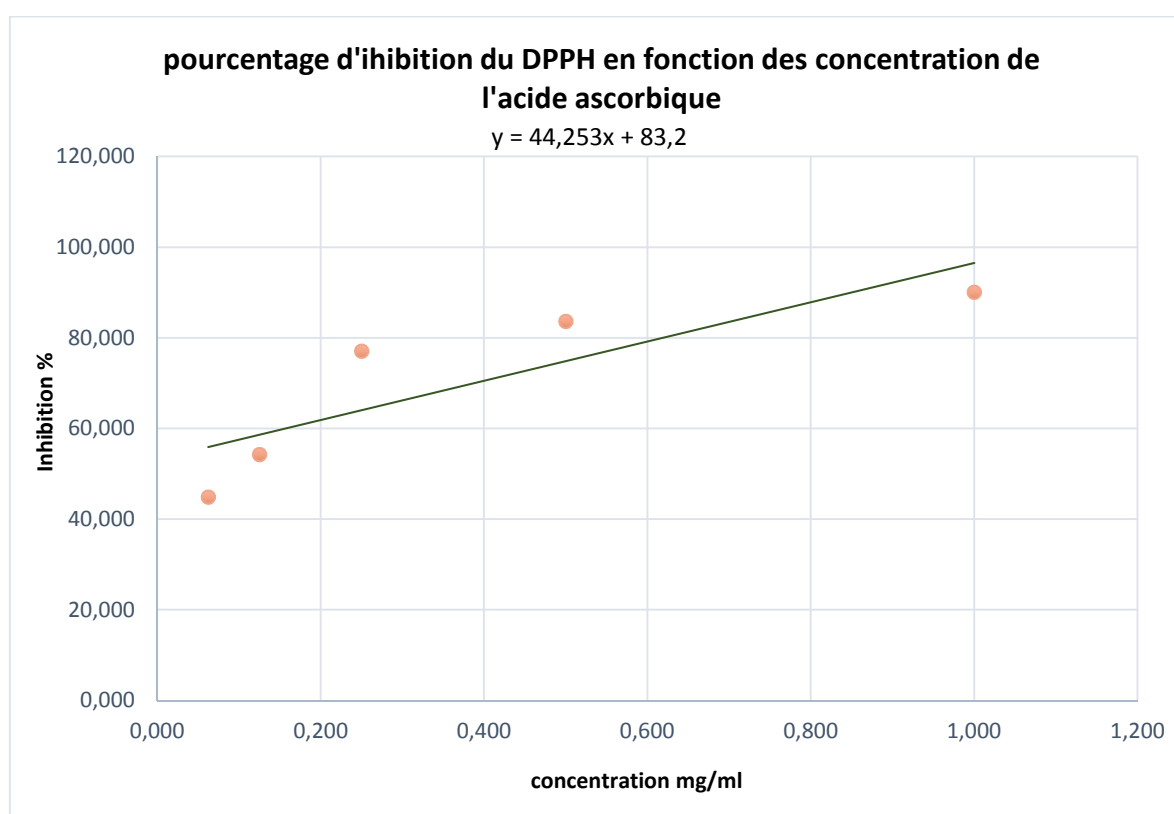
### 3.4. Activité antioxydante de l'huile essentielle

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par le test du piégeage du DPPH. Cette valeur a été comparée à celle de l'acide ascorbique qui est un antioxydant synthétique de référence.

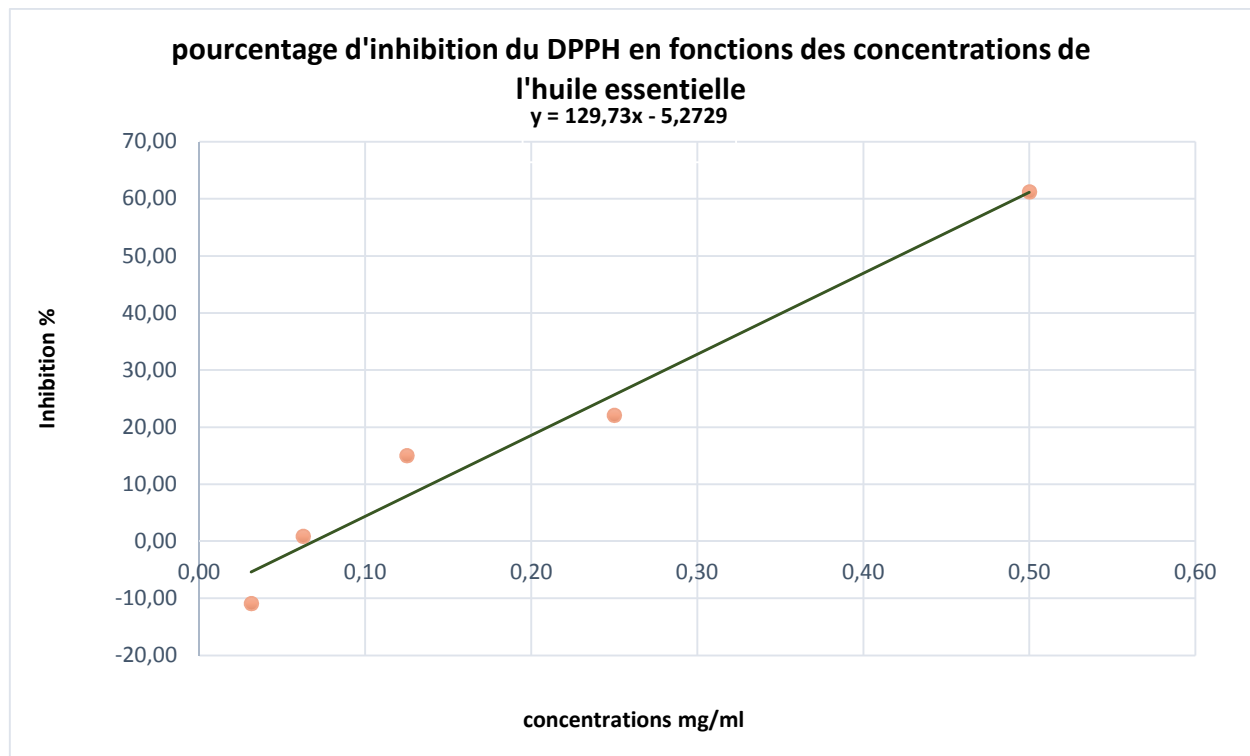
#### 3.4.1. Détermination du pourcentage d'inhibition

Les valeurs des absorbances mesurées ont permis de tracer les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Les figures 20 et 21 représentent respectivement le suivi de la réduction du DPPH en solution par l'acide ascorbique et par l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.



**Figure 20** : Le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique



**Figure 21** : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour l'acide ascorbique ou pour l'huile essentielle.

Pour une concentration de 1 mg/ml, l'acide ascorbique a révélé un pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH de 90.01 %, tandis que pour la concentration de l'huile essentielle de 0.5 mg/ml la valeur de pourcentage d'inhibition est de 61.26 %.

### 3.4.2. La détermination d'IC50

Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50%. Il est inversement lié à la capacité antioxydante d'un Composé, car il exprime la quantité d'antioxydante requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande [38].

Les concentrations qui fournissent 50% d'inhibition (IC50) sont déterminées à partir des courbes des figures 34 et 35. Elles sont présentées dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Les valeurs des IC50 de l'acide ascorbique et de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Composé	IC50 (mg/ml)
Acide ascorbique	0,750
Huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	0,426

L'HE de romarin ramène le radical libre de DDPH au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec une IC50 de 0,426 µg /ml.

L'IC50 de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est inférieure à celle de l'acide ascorbique. Cela signifie que l'activité antioxydante de l'huile essentielle est supérieure à celle de l'acide ascorbique.

# **Conclusion**

L'objectif de cette étude est la caractérisation et l'évaluation de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* extraite par le procédé d'*hydrodistillation* type *Clevenger*. Le rendement en huile essentielle de romarin est évalué à 0.0824% pour un temps d'extraction de 60 minutes.

Les tests phytochimiques ont pu mettre en évidence la présence de flavonoïdes, saponosides, tanins et terpenoïdes dans les feuilles de la plante.

L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a montré son efficacité contre deux souches bactériennes pathogènes, *Escherichia coli* (Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram+).

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par la méthode du piégeage du radical libre stable DPPH, qui cible un mécanisme d'action des antioxydants. Le test a montré que l'huile essentielle de romarin a un paramètre IC50 de 0.426 mg/ml.

Il serait intéressant de compléter ce travail par d'autres analyses de l'huile essentielle du genre *ericalyx* avec d'autres espèces, effectuer des tests bioinsecticides à l'égard des insectes ravageurs.

## Référence

- [1] : Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins, 2001 ; édition Larousse
- [2] : **S. ATHAMENA, 2009**, Etude quantitative des flavonoïdes des graines de cuminum cyminum et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et l'évaluation de l'activité biologique ; Mémoire de magister ; Université d'Elhadj Lakhdar 2 Batna.
- [3] : **Bruneton. Jean.** Pharmacognosie : 5ème édition. Éditions Lavoisier, 2016. 1487P.
- [4] : **LEPLAT Marion, 2017**, Le Romarin, *Rosmarinus officinalis* L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale, thèse de doctorat, Pharmacie, Marseille.
- [5]: **M. H. BOLENS, 1985.** The essential oil from *Rosmarinus officinalis*. L. Perfumes Flavours, Vol. 5, N°.10, p.p. 21-37.
- [6] : : **J. McVicar.** La passion des herbes : aromatiques, culinaires, médicinales, cosmétiques et comment les cultiver. 3e ed. Revue et augmentée. Laval (Québec) : Guy Saint Jean ed., 2009, 304p
- [7] : **R. Anton, A. Lobstein.** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments, et huiles essentielles. Paris et Cachan : Tec&Doc, 2005, 522p.
- [8] : **BOULADE Clémentine**, thèse, LAMIACEAE : Caractéristiques et intérêts thérapeutiques à officine, 2018, Université Toulouse III Paul Sabatier.
- [9]: **N. MUYIMA, G. ZULU, T. Bhengu.**  
The potential application of some novel essential oils as natural cosmetic preservatives in an aqueous cream formulation. Flavour and fragrance Journal, 2020 ; 17 ; 66-258.
- [10] : **BOUSBIA. Nabil, 2011**, Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat : Chimie. Algérie
- [11] : **pharmacopée européenne 7<sup>e</sup> édition**
- [12] : **NOWICKI Justine, 2019**, Les dangers de l'utilisation abusive des huiles essentielles, thèse de doctorat, pharmacie, LORRAINE  
Bruneton Jean. Pharmacognosie : 5ème édition. Éditions Lavoisier.
- [13] : **LAGUERRE Virginie, 2015**, Huile essentielle et 1,8-CInéole, Thèse de doctorat, Pharmacie. Lorraine, France.

- [14] : **Hernandez-Ochoa, 2005**. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/Actif ». D'origine végétale. Thèse de doctorat. Institut National Polytechniques de Toulouse. France
- [15] : **ABDELLI Wafae, 2017**. Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus Phoenicae* et *Thymus vulgaris*. Thèse de doctorat, Sciences biologiques. Mostaghanem. Algérie.
- [16] : **EL HAIB Abderrahim, 2011**, Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique. Thèse de doctorat : Chimie organique : Toulouse. France.
- [17] : **T. EL Kamli, F. Errachid, N. Eloutassi, H. Madjid, R.CHbir, A.Bour. 2017**. Comparaison quantitative et qualitative des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* obtenues par différentes méthodes. European Scientific Journal, 13, 21, page 178.
- [18] : **ROBIN DESCHEPPER, 2017**, variabilité de la composition des huiles essentielles et la notion de chémotype en aromathérapie, Pharmacie. Marseille. France
- [19] : **X. Fernandez, F. Chemat**, la chimie des huiles essentielles. Edition Vuibert. 2012. Paris
- [20] : **P. DAVIS**. L'aromathérapie de A à Z, Edition Vigot, 2006
- [21] : **D. BAUDOUX**. Le formulaire d'aromathérapie pratique pour le prescripteur et le conseil pharmaceutique Edition Inspir, 2007.
- [22] : **R. Hubert**, Epices et aromates, Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris, 1992.
- [23] : **N.S. Kim, D.S. Lee, J. Chrom. A. 2002**, 982, 31
- [24] : **D.L. Pavida. G.M. Lampman. G.S. Kriz**, Introduction to organic laboratory techniques, W.B. Saunders Co. Philadelphia, USA. 1976, 567
- [25] : **S. S. Handa, S. P. S. Khanuja, G. Longo, D. D. Rakesh**, Extraction technologies for aromatic and medicinal plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology (2008). 260p
- [26] : **D. P. De Sousa**. Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects. Nova Science Publishers (2012). 1ère éd. 236p.
- [27] : **Z. Drinic, D. Pljevljakusic, J. Zivkovic, D. Bigovic, K. Savikin. 2020**, Microwave assisted extraction of *O. Vulgare*.L.spp. Titrum essential oil: comparison with conventional HD. Institute of medicinal plant research, 120, 158-165.
- [28] : **K. H. C. Baser, G. Buchbauer**. Handbook of essential oils: science, technology and applications. CRC Press (2009). 1ère éd. 991p.

[29] : **A. Babar, A. N. Al-Wabel, S. Saiba, A. S. Aftab, Khan, A. Firoz. 2015**, Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine ; 5(8) : 589-598.

[30] : **F. Chemat, M. Albert-Vian, O. Dangles, 2017** Essential oils as antioxydants, international journal of essential oil therapeutics, I, 4-15.

[31]: **A. Somogyi, K. Rosta, P. Pusztai, Z.Tulassay, G.Nagy, 2007**. Antioxydant measurments, Physiol. Meas, 28, R41-R55.

[32]: **S. Burt**, Essential oils: their antibacterial propeties and potential application in foods. A review, Int. J. Food Microbial., 2004, 94, 223-253.

[33]: **F. Solorzano-Santos, M. G. Miranda-Novales, 2011**. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents, Curr. Opin. Biotechnol., 23, 1-6.

[34] : Méthode de diffusion : **Hayes and Markovnic. 2002**

[35] : Mesure de la zone d'inhibition : **Kumar et al.2009**.

[36]: **W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset. Lebensm Wiss. Technol. 28 (1995)** 25-30.

[37]: **W. Wang, N. Li, M. Luo, Y. Zu, T. Efferth, 2012**. Antibacterial activity and anticancer activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to that of its main component molecules0 17: 2704-271.

[38] : **I. Ismail, S. Houbairi, S. Lanouari, K. Moustaidi, A. Lamiri, 2017**. Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de plantes aromatiques et médicinales marocaines. European scientific journal, 13, 12, 332.