

Liste des abréviations

ATCC	: <i>American Type Collection Culture</i>
ACL	: <i>Antioxidant Capacity of Lipophilic soluble compounds</i>
BHA	: HydroxyAnisole Butylé
BHT	: HydroxyToluène Butylé
BSAC	: <i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i>
CE	: Communauté Européenne
CEI	: Communauté des Etats Indépendants
cfu/mL	: unités de colonies formés / millilitre
CIRAD	: Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CG	: Chromatographie en phase gazeuse
CG/SM	: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
COV	: Composé Organique Volatil
CO₂	: Dioxyde de carbone
CP	: Expression à froid
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
d²⁰₂₀	: Densité relative
DIC	: Détente instantanée contrôlée
EPA	: Agence Américaine pour la protection de l'Environnement
ESSAM	: Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes
FDA	: Food and Drug Administration
Fig.	: Figure
g/L	: gramme / litre
GHz	: Giga Herz
GRAS	: Generally Recognized as Safe
HD	: Hydrodistillation
HE	: Huile Essentielle
HFC	: Hydrofluorocarbures
HFE	: Hydrofluoroéthers
INA	: Institut National Agronomique
INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique
I_R	: Indice de rétention
ITAF	: Institut des Techniques d'Arboriculture Fruitière
kcal	: kilo calories
Log	: logarithme
m²/s	: mètre carré par seconde
MAE	: Microwave Assisted Extraction
MAP	: Microwave Assisted Process
mbar	: milli bar
MHG	: Hydro-diffusion assistée par micro-ondes et gravité
M_{HE}	: Masse en huile essentielle
MHz	: Méga Herz
mol/L	: mole/litre
MVS	: Masse de la matière végétale sèche
O₂	: Oxygène
P	: Pression
p	: Para

PFC	: Perfluorocarbures
PC	: Pression critique
pH	: Potentiel d'hydrogène
Rdt	: Rendement
SV	: Sous vide
T	: Température
t	: temps
t/ha	: tonnes / hectare
TC	: Température critique
t_R	: Temps de rétention
\$ US	: Dollar américain
V	: volume
VMHD	: Vacuum Microwave htdroDistillation
W	: Watt
v/v	: volume / volume

Liste des Tableaux

Tableau 1	: Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction.....	6
Tableau 2	: Production mondiale (2008) des plus importantes huiles essentielles.....	28
Tableau 3	: Les plus importants genres d'huiles essentielles produits dans la famille la famille des Rutaceae.....	45
Tableau 4	: Taux des constituants les plus importants des huiles essentielles issues des peaux de fruits d'agrumes.....	48
Tableau 5	: Les principaux pays importateurs et exportateurs d'agrumes dans le monde	51
Tableau 6	: Prix (\$ US/ pound) de l'huile essentielle du romarin importé par les Etats-Unis.....	59
Tableau 7	: Importation (en US \$) de l'HE de romarin par les Etats-Unis durant la période 1998-2002	59
Tableau 8	: Caractéristiques des solvants, des réactifs et produits chimiques utilisés...	60
Tableau 9	: Présentation des variétés étudiées et provenant de l'ITAF de Boufarik.....	61
Tableau 10	: Conditions opératoires des analyses par chromatographie en phase Gazeuse.....	65
Tableau 11	: Conditions opératoires des analyses en CG/SM	66
Tableau 12	: Programmation des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse par hplc.....	68
Tableau 13	: Liste et caractéristiques des microorganismes testés	71
Tableau 14	: Préparation du milieu réactionnel du test PCL.....	72
Tableau 15	: Concentrations des solutions standrads.....	73
Tableau 16	: Rendements en huiles essentielles de la variété Valencia Late selon trois (3) méthodes d'extraction.....	75
Tableau 17	: Composition des huiles essentielles de l'orange Valencia Late obtenues par MHG, HD et CP	77
Tableau 18	: Rendement en HE des huit variétés d'agrumes (g d'HE/ g de fruit de Citrus).....	82
Tableau 19	: Composition chimique des HE des variétés Eurêka et Villa França extraites par MHG, HD et CP	83
Tableau 20	: Composition chimique des HE des variétés Lime et Marsh Seedless extraites par MHG, HD et CP	84
Tableau 21	: Composition chimique des HE des variétés Tarocco et Valencia late extraites par MHG, HD et CP	85
Tableau 22	: Composition chimique des HE des variétés Washignton Navel et Tangelo Seminole extraites par MHG, HD et CP	86
Tableau 23	: Valeurs propres et pourcentage de variance	92
Tableau 24	: Rendement en HE de romarin selon deux méthodes d'extraction	94
Tableau 25	: Composition des huiles essentielles de Romarin obtenues respectivement par MHG et par HD	96

Tableau 26	: Propriétés physiques de l'huile essentielle de romarin extraite par MHG et par HD.....	99
Tableau 27	: Résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de romarin obtenu par MHG et HD	103
Tableau 28	: Diamètre des zones d'inhibition en mm des micro-organismes testés.....	104
Tableau 29	: Evaluation sensorielle des huiles essentielles de romarin extraites par HD et MHG	113
Tableau 30	: Résultats de la modélisation de la cinétique d'extraction.....	116
Tableau 31	: Caractéristiques de deux composés de l'HE de romarin extraites par MHG et HD.....	117
Tableau 32	: Proportions des polyphénols dans le romarin frais et dans l'eau résiduelle après extraction par MHG.....	121
Tableau 33	: Comparaison énergétique des deux méthodes d'extraction.....	126

Liste des Figures

Fig. 1 : Principales opérations industrielles d'extraction	7
Fig. 2 : Schéma de l'appareil d'hydrodistillation, et d'entraînement à la vapeur d'eau...	10
Fig. 3 : Schéma des différents Sfumatrices.....	14
Fig. 4 : Photo d'une pelatrice et d'une centrifugeuse séparatrice de l'essence de citrus des eaux résiduelles.....	14
Fig. 5 : Schéma représentatif de l'extraction par FMC in Line.....	15
Fig. 6 : Schéma représentatif de l'extraction par pression.....	15
Fig. 7 : Schéma du procédé d'hydrodiffusion.....	16
Fig. 8 : Schéma du principe d'une extraction par CO ₂ supercritique.....	17
Fig. 9 : Schéma de l'extraction par Flash Détente.....	19
Fig. 10 : Schéma d'une unité de Détente Instantanée Contrôlée (DIC) et son cycle de traitement.....	21
Fig. 11 : Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore.....	22
Fig. 12 : Spectre électromagnétique	23
Fig. 13 : Schéma du procédé d'extraction MAP TM en continu et photo d'une unité pilote du même procédé.....	24
Fig. 14 : Schéma du procédé d'extraction par entraînement à l'air assisté par micro-ondes.....	25
Fig. 15 : Schéma du procédé VMHD, Evolution des principaux paramètres, Photo d'une unité pilote du procédé.....	25
Fig. 16 : Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	26
Fig. 17 : Schéma du procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.....	27
Fig. 18 : Répartition des taux de production d'HE (en partie estimée) par pays à travers le monde durant l'année 2008.....	29
Fig. 19 : Limites climatiques de l'agrumicole et les principales régions productrices dans le monde.....	32
Fig. 20 : Coupe transversale d'une orange.....	33
Fig. 21 : Les 10 pays principaux producteurs d'orange dans le monde durant la période 2007 – 2010.....	49
Fig. 22 : Les 10 pays principaux consommateurs d'oranges fraîches dans le monde durant la période 2007 – 2010	50
Fig. 23 : Les 5 pays principaux transformateurs d'orange dans le monde durant la période 2007 – 2010	51
Fig. 24 : Photo des feuilles, et des fleurs du romarin	54
Fig. 25 : Photo et Schéma du montage expérimental de la MHG.....	62
Fig. 26 : Schéma du montage d'hydrodistillation	63
Fig. 27 : Photo du montage de l'expression à froid.....	64

Fig. 28 : Aromatogramme sur boite de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle	70
Fig. 29 : Profil de la puissance micro-ondes en fonction du temps total d'extraction	74
Fig. 30 : Evolution de la température au cours de l'extraction de l'huile essentielle de Valencia Late par MHG et HD.....	76
Fig. 31 : Proportion de la fraction oxygénée au sein de l'huile essentielle de Valencia Late après extraction selon trois méthodes	78
Fig. 32 : Cinétique de l'extraction de l'HE de Valencia Late par MHG et HD	79
Fig. 33 : Proportion de la fraction oxygénée au sein des huiles essentielles de 8 variétés d'agrumes	88
Fig. 34 : Cercle des corrélations des variables des huiles essentielles.....	91
Fig. 35 : La projection des individus des HE de 8 agrumes issues des trois méthodes d'extraction MHG, HD et CP.....	92
Fig. 36 : Analyse factorielle discriminante mesurée sur huit variétés d'agrumes	93
Fig. 37 : Cinétique de l'extraction de l'HE des feuilles de romarin par MHG et HD.....	98
Fig. 38 : Courbes de mesures de l'activité antioxydante des différentes concentrations du standrad (Trolox) et de l'huile essentielle de romarin extraite par MHG et HD.....	102
Fig. 39 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin extraite par la méthode MHG et HD	104
Fig. 40 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée	108
Fig. 41 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la prédominance des poils tecteurs	109
Fig. 42 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la forme d'un trichome capités	110
Fig. 43 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la forme des trichomes peltés	110
Fig. 44 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin après extraction par MHG	111
Fig. 45 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille du romarin après extraction par HD	112
Fig. 46 : Illustration des constantes de vitesse au cours de la cinétique de l'extraction de l'HE des feuilles de romarin par MHG et HD.....	115
Fig. 47 : Rotation des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes	120
Fig. 48 : Organigramme d'extraction des polyphénols à partir de feuilles fraîches de romarin.....	122
Fig. 49 : Chromatogramme de l'eau résiduelle après extraction par MHG montrant le pic de l'acide rosmarinique à la longueur d'onde 329 nm	123
Fig. 50 : Chromatogramme du romarin frais montrant le pic de l'acide rosmarinique à la longueur d'onde 329 nm	123

Fig. 51 : Chromatogramme du romarin frais montrant le pic du carnosol à la longueur d'onde 284 nm.....	124
Fig. 52 : Chromatogramme du romarin frais présentant le pic de l'acide carnosique à la longueur d'onde 284 nm.....	124

Rapport Gratuit.com



SOMMAIRE

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Partie Bibliographique	
Chapitre I : Procédés d'extraction des huiles essentielles et des molécules aromatiques.....	3
1 – Historique.....	3
2 – Définitions.....	3
3 – Choix de la méthode d'extraction.....	5
3.1 – Principales paramètres d'extraction.....	5
3.2 – Paramètres influençant l'extraction.....	7
3.2.1 – Matière Végétale.....	7
3.2.2 – Nature et état du solide et du soluté.....	8
3.2.3 – Nature, concentration et volume du solvant.....	9
3.2.4 – Méthode, durée, Température et pression.....	9
4 – Techniques conventionnelles d'extraction.....	9
4.1 – Distillation – Evaporation	9
4.1.1 – Codistillation avec vapeur d'eau.....	9
4.1.2 – Codistillation avec un autre fluide autre que l'eau.....	11
4.1.3 – Evaporation – concentration.....	11
4.1.4 – Rectification (fractionnement).....	11
4.1.5 – Distillation sèche.....	11
4.2 – Extraction au moyen de solvants.....	11
4.2.1 – L'enfleurage à froid.....	12
4.2.2 – L'enfleurage à chaud.....	13
4.3 – Méthodes d'extraction à froid.....	13
4.4 – Méthode d'hydrodiffusion.....	16
5 – Extraction par des techniques innovantes.....	16
5.1 – Extraction par des solvants supercritiques.....	16
5.2 – Extraction par Détente éclair (flash détente).....	19
5.3 – Détente instantée contrôlée (DIC).....	20
5.4 – Extraction par ultrasons.....	21
5.5 – Extraction assistée par micro-ondes.....	23
5.5.1 – Extraction par solvant assistée par micro-ondes.....	23
5.5.2 – Entraînement à l'air assisté par micro-ondes.....	24
5.5.3 – Hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite.....	25
5.5.4 – Hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	26
5.5.5 – Procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.....	26
6 – Situation économique des huiles essentielles.....	27
Chapitre II : Les Agrumes.....	31
1 – Introduction.....	31
2 – Origine et histoire des agrumes.....	31
3 – Caractéristique et description des agrumes.....	32
4 – Nouvelle taxonomie des agrumes.....	34
5 – Différentes variétés d'agrumes.....	35
5.1 – Les Oranges (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck).....	35
5.1.1 – L'oranger et sa culture.....	35
5.1.2 – L'orange.....	35

5.1.3 – Composition.....	35
5.1.4 – Les variétés.....	35
5.1.5 – Utilisation.....	36
5.2 – Les Bigarades (<i>Citrus aurantium</i> L.).....	36
5.2.1 – Le bigaradier et sa culture.....	36
5.2.2 – La Bigarade.....	36
5.2.3 – Les variétés.....	36
4.1.2 – Utilisation.....	37
5.3 – Les mandarines (<i>Citrus reticulata</i> Blanco).....	37
5.3.1 – Les variétés.....	37
5.3.2 – Principaux hybrides d’importances commerciales.....	38
5.3.3 – Utilisation.....	39
5.4 – Les Citrons (<i>Citrus limon</i> (L.) Burm f.).....	39
5.5 – Les Limes (<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle).....	40
5.6 – Le Cédrat (<i>Citrus medica</i> L.).....	40
5.7 – Les Pomelos (<i>Citrus maxima</i>).....	41
5.8 – Les pamplemousses (<i>Citrus paradisi</i> (Burm.) merril).....	41
5.9 – Les kumquats (<i>Citrus japonica</i> Thunb.).....	42
6 – Transformation des agrumes.....	42
6.1 – Co-produits de la transformation des agrumes.....	43
6.2 – Huiles essentielles et essences.....	44
7 – Composition des HE et essences d’agrumes.....	45
8 – Aspect économique.....	49
Chapitre III : Le Romarin.....	52
1 – Introduction.....	52
2 – Taxonomie.....	53
3 – Constitution d’une huile essentielle.....	54
4 – Huile essentielle chémotypée et non chémotypée.....	55
5 – Usages.....	56
5.1 – Usage médicinal (Phytothérapie).....	56
5.1.1 – Voie externe.....	56
5.1.2 – Voie interne.....	57
5.2 – Parfumerie.....	57
5.3 – Usage alimentaire.....	57
6 – Aspect économique.....	58
Partie Expérimentale	
Matériel & Méthodes.....	60
1 – Réactifs et Solvants.....	60
2 – Matières premières.....	60
2.1 – Agrumes.....	60
2.2 – Romarin.....	61
3 – Extraction des huiles essentielles.....	61
3.1 – Extraction par hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (MHG).....	61
3.2 – Extraction par hydrodistillation (HD).....	63
3.3 – Extraction par expression à froid (CP).....	63
4 – Méthodes comparatives.....	65

4.1 – Analyse par CPG et CG/SM.....	65
4.2 – Analyse par HPLC.....	68
4.3 – Détermination du taux d'humidité.....	68
4.4 – Rendement en huile essentielle Rdt_{HE}	69
4.5 – Mesure de la densité selon la norme NF T 75 – 111.....	69
4.6 – Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112.....	69
4.7 – Mesure du pouvoir rotatoire NF T 75-113.....	69
5 – Analyse en microscopie électronique à balayage.....	70
6 – Mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	70
6.1 – Les microorganismes testés.....	71
6.2 – Préparation des suspensions microbiennes.....	71
6.3 – Mode opératoire.....	72
7 – Mesure de l'activité antioxydante.....	72
8 – Analyse sensorielle.....	73
9 – Analyses statistiques.....	73
Résultats & Interprétations.....	74
Chapitre I : Extraction par l'hydrodiffusion par micro-ondes et gravité des agrumes.....	74
1 – Introduction.....	74
2 – Extraction de l'huile essentielle d'orange (Valencia late) : analyse quantitative	74
3 – Composition des huiles essentielles d'oranges (Valencia late).....	76
4 – Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle.....	79
5 – Généralisation aux autres variétés de Citrus.....	80
6 – Classification des huiles essentielles par analyse de données multidimensionnelles.....	89
Chapitre II : Extraction par l'hydrodiffusion par micro-ondes et gravité du Romarin.....	94
1 – Introduction.....	94
2 – Extraction de l'huile essentielle de romarin.....	94
3 – Composition de l'huile essentielle de feuilles romarin collectées à l'ENSA (Ex-INA - Alger)	95
4 – Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle.....	98
5 – Constantes physique.....	99
6 – Activité antioxydante.....	100
7 – Activité antimicrobienne.....	103
Chapitre III : Compréhension.....	108
1 – Modification structurales du végétal.....	108
2 – Analyse sensorielle.....	113
3 – Modélisation des données cinétiques.....	113
4 – Mécanisme d'extraction.....	117
5 – Qu'est ce qu'on trouve dans la phase aqueuse ?.....	121
6 – Coût, énergie et impact environnemental.....	125
Conclusion Générale.....	127
Références bibliographiques	



INTRODUCTION

INTRODUCTION

De manière générale, l'extraction des huiles essentielles préalable à l'analyse chimique se compose de deux étapes : l'extraction et l'analyse. Alors que l'étape analytique requiert en général quelques minutes, l'étape d'extraction nécessite plusieurs heures. C'est le cas de la méthode de Clevenger, inventée en 1928 (Clevenger, 1928), qui est la procédure de distillation de référence. Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans l'eau portée à ébullition. Bien que très efficace et largement acceptée par la communauté scientifique, la distillation selon Clevenger présente néanmoins plusieurs inconvénients. Les plus significatifs sont les longues procédures d'extraction requises et les grands volumes d'eau consommés.

Depuis l'observation de la barre chocolatée qui avait fondu dans la poche de Percy Spencer en 1946 pendant ses travaux sur les radars, les effets thermiques potentiels des micro-ondes ont été largement caractérisés et validés par la communauté scientifique. En effet, l'énergie électromagnétique a été très exploitée dans de nombreux domaines pour son chauffage rapide et sélectif : synthèse organique, traitement des déchets radioactifs, procédés de transformation et de conservation agro-alimentaires, vulcanisation, désinsectisation...

Rapidement, les micro-ondes ont été utilisés comme source d'énergie pour l'extraction de molécules d'intérêt. Différents procédés d'extraction assistés par micro-ondes ont été développés dans le but de contrecarrer les limites des techniques d'extraction conventionnelles. Nous avons développé un nouveau dispositif d'extraction des huiles essentielles pour les matrices végétales et co-produits alimentaires : l'Hydrodiffusion par micro-ondes et gravité (MHG). Ce manuscrit de thèse présente les travaux de recherche effectués pour la conception, l'optimisation et la valorisation de cette nouvelle technique d'extraction.

Une première partie de ce mémoire est consacrée aux fondements et considérations théoriques découlant des procédés conventionnels et innovants d'extraction des molécules aromatiques. Nous avons aussi décrit l'étude des matrices végétales contenant les huiles essentielles. Ces dernières années un intérêt accru a été porté pour les molécules naturelles bioactives comme source potentielle pouvant constituer une alternative aux produits de synthèse. A cet effet, les huiles essentielles d'agrumes et de Romarin comptent parmi les plus étudiées.

Dans un second temps, le matériel utilisé, la démarche expérimentale et les méthodes employées à l'égard des investigations seront décrits.

La troisième partie de ce manuscrit relève des résultats, de leur discussion, et des techniques employées afin de proposer une procédure innovante pour la détermination des huiles essentielles dans les matrices végétales. Cette dernière partie s'articule selon trois sections distinctes : dans un premier chapitre, la mise au point, l'optimisation et l'application du nouveau dispositif de laboratoire, permettant un dosage rapide des huiles essentielles dans les matrices végétales seront discutées. L'originalité de l'appareillage réside en une extraction rapide, non destructrice et généralisable à une multitude de matrices végétales qui sera discutée dans un second chapitre. Enfin, la compréhension du phénomène mis en jeu dans l'extraction des huiles essentielles et l'approche écologique apportée par l'invention, ainsi qu'une alternative aux méthodes d'extraction usuellement employées pour les huiles essentielles, fera l'objet d'un troisième et dernier chapitre.



Partie Bibliographique



CHAPITRE I

*Procédés d'extraction des huiles
essentielles et des molécules
aromatiques*

1 – Historique

Depuis longtemps, les hommes avaient cherché le moyen de séparer les éléments huileux des produits aromatiques. Ils réussirent en soumettant la matière à l'action de la chaleur. Les substances aromatiques étaient transformées en vapeur ; il suffisait de les recueillir et de les refroidir pour les obtenir sous forme liquide.

Ce procédé qui se faisait à feu nu, prit le nom de distillation. Il était certainement connu des Chinois et des Indiens depuis 20 siècles avant J.C. Les Egyptiens et les Arabes ont prévalu des caractéristiques médicinales et aromatiques des plantes : la conservation des momies, l'aromatisation des bains, la désinfection des plaies avec les onguents, les parfums et la fabrication des boissons aromatiques (Möller, 2008).

A l'apogée de leurs conquêtes en Afrique du Nord et en Espagne, les arabes le firent connaître aux Espagnols, lesquels à leur tour le propagèrent en Europe, à travers les possessions du Royaume d'Aragon, échelonnées tout le long des Côtes du Nord de la Méditerranée (Berthier, 1980 ; Möller, 2008).

2 – Définitions

Selon Durvelle (1930, 1893), les essences ou huiles essentielles, connues également sous le nom d'huiles volatiles, de parfums, etc., sont des substances odorantes huileuses, volatiles, peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, incolores ou jaunâtres, inflammables qui s'altèrent facilement à l'air en se résinifiant. Elles sont liquides à température ordinaire ; quelques unes sont solides ou en partie cristallisées ; elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes dont elles se distinguent par leur volatilité. Leur odeur plus ou moins forte, suave, piquante ou désagréable. Elles ont la propriété de ne pas laisser de tache durable sur le papier.

Les huiles essentielles se trouvent, pour la plus grande partie, élaborées par l'organisme végétal (Charabot *et al.*, 1899) ; mais il en est (telles que les essences d'amande et de moutarde) qui ne prennent naissance qu'au moment où les parties végétales sont mises au contact de l'eau (Durvelle, 1930).

D'après Naves (1976), aucune des définitions des HE n'a le mérite d'être claire, ni précise. Les HE sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau.

Cette définition peut être étendue aux HE obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de Citrus, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères.

La nouvelle Encyclopédie Funk & Wagnalls (2004) décrit les huiles essentielles comme les « *liquides volatils, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact de la peau. Leurs composants peuvent être regroupés en six classes selon leur structure chimique :*

- a) *Les hydrocarbures, tel que le limonène dans l'huile de citron;*
- b) *Les alcools, tel que le bornéol dans le camphrier de Bornéo;*
- c) *Les esters, tel que le salicylate de méthyle dans l'huile de wintergreen;*
- d) *Les aldéhydes, tel que l'aldéhyde benzoïque dans l'huile d'amandes amères;*
- e) *Les cétones, telle que la menthone dans l'huile de menthe poivrée;*
- f) *Les lactones et oxydes, telle que la coumarine des haricots de Tonka. »*

L'Association Française de Normalisation (AFNOR, Edition 2000), a défini les huiles essentielles comme étant : *des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.*

Bruneton (1993, 1999), définit les termes les plus couramment utilisés dans ce domaine, tels que :

- *Pommade florale* : Corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs, soit par enfleurage à froid, soit par enfleurage à chaud.
- *Résinoïde* : Extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première sèche d'origine naturelle, par extraction à l'aide d'un solvant non aqueux.
- *Absolue* : Produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un Résinoïde par extraction à l'éthanol à température ambiante. La solution éthanolique obtenue est généralement refroidie et filtrée dans le but de supprimer les cires.

- *Epices* : Produits végétaux naturels ou mélanges de ceux-ci, sans matières étrangères, qui sont utilisés pour donner de la saveur et de l'arôme et pour assaisonner les aliments ; le terme s'applique à la fois au produit entier et au produit en poudre.
- *Concrète* : Extrait à odeur caractéristique obtenu à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux, suivie de l'élimination de ce solvant par des procédés physiques.

3 – Choix de la méthode d'extraction

La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils. Pour cela, différents paramètres et propriétés sont à prendre en compte (Fernandez et Cabrol-Bass, 2007).

3.1 – Principaux paramètres d'extraction

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

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

Le Tableau 1 résume les techniques les plus couramment utilisées et quelques types de produits fabriqués. Ces techniques d'extraction mettent en œuvre, en ligne la plupart du temps, plusieurs types d'opérations fondamentales. Les principales opérations industrielles ont été résumées dans la Figure 1 (Peyron, 1992).

Tableau 1 : Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction.

Techniques	Propriétés	Produits fabriqués
Evaporation Déshydratation - Séchage Concentration de miscella (S/pres. atm. ou réduite) Concentration de jus de fruits		Résinoïdes, concrètes Oléorésines
Distillation Rectification (S/pres. atm. ou réduite) Distillation sèche	Volatilité	Isolats, déterpénés Huile empyreumatique
Co-distillation Avec eau (S/pres. atm. ou en surpression) Hydrodistillation et à vapeur humide Vapeur sèche Avec un autre fluide (S/pres. atm. ou réduite) Alcool Polyols		Huiles essentielles Eaux aromatisées Alcoolats Distillats moléculaires
Extraction liquide / solide Solvant conservé : Corps gras Alcool Solvant éliminé: Fluide liquide Fluide liquéfié (ou supercritique)	Solubilité	Pommade Infusion – Teinture } Concrète, résinoïde
Extraction liquide / liquide Discontinue Continue		Essences déterpénées
Cristallisation après concentration partielle et refroidissement		Menthol – Anéthol
Broyage – tamisage	Formes et taille des particules	
Expression – Filtration		Huiles essentielles d'agrumes
Glaçage – Filtration		
Séparation au moyen de membranes		
Séparation chromatographique Décoloration	Adsorption	Huiles essentielles Absolues

(Source : Peyron, 1992).

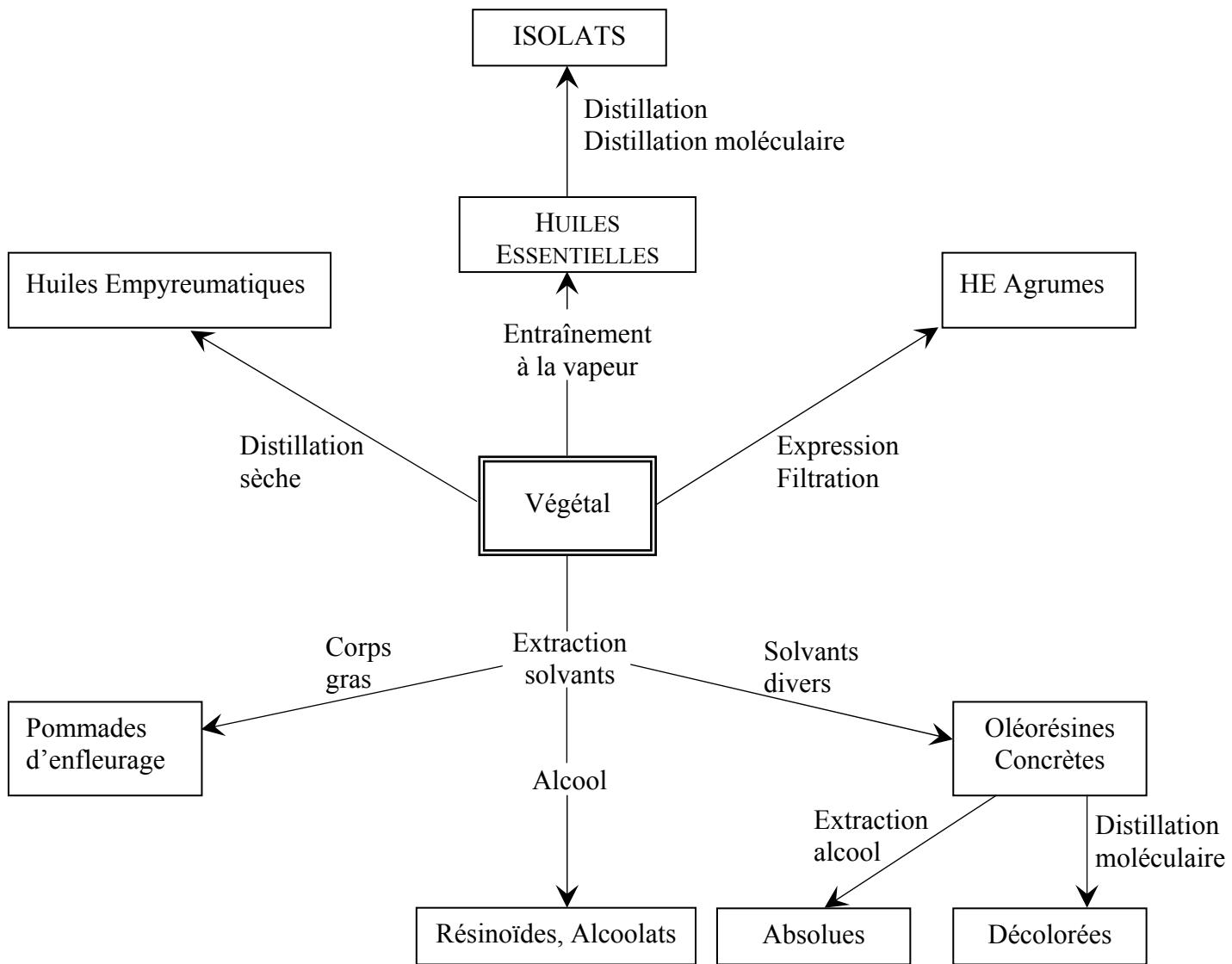


Fig. 1 : Principales opérations industrielles d'extraction (Peyron, 1992).

3.2 – Paramètres influençant l'extraction

3.2.1 – Matière végétale

- Choix des plantes : Seules les plantes saines de l'espèce recherchée doivent être récoltées.
- Mode de cueillette : On peut cueillir les fleurs, feuilles, bourgeons et petites baies en les arrachant simplement de la plante à la main. Puis on récolte les tiges, les racines et écorces de préférence avec un petit couteau ou un sécateur. Cette méthode est plus écologique et permet d'obtenir des huiles essentielles de meilleure qualité.

- Provenance (région d'origine) : Le sol dans lequel pousse la plante et le climat qui règne dans une région donnée déterminent et différencient en grande partie la qualité de l'essence que produit cette région par rapport à l'essence de la même plante provenant d'une autre région.
- Stade végétatif : La récolte doit avoir lieu pendant le stade végétatif quand la plante est plus riche en essence. Ce moment varie d'une plante à une autre.
- Période de la journée : La qualité de l'essence d'une plante varie en fonction de la période de la journée où elle est récoltée. C'est dès l'aube, lorsque la rosée s'évapore, que la concentration des huiles essentielles est la plus élevée dans les plantes, car les gouttelettes de rosée empêchent encore l'évaporation des huiles. A défaut, on peut récolter en fin d'après-midi ou en début de soirée, au moment où les plantes exhalent le moins leur parfum.
- Partie de la plante distillée : Les diverses parties d'une même plante (fleur, feuille, tige, écorce, racine, etc.) peuvent produire des essences différentes (Sallé, 2004 ; Möller, 2008).

3.2.2 – Nature et état du solide et du soluté

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

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

Lorsque la teneur en soluté est importante dans le solide, la structure poreuse peut être détruite par broyage. La dissolution ultérieure du soluté devient plus facile. Dans les matières végétales, le soluté est généralement occlus dans des cellules d'où il est extrait par un mécanisme de dialyse ou de diffusion capillaire à travers des parois cellulaires. L'ordre de grandeur expérimentale de la diffusivité d'une huile est de 10^{-9} m²/s dans le solvant libre et de 10^{-14} m²/s dans le tissu cellulaire intact (Leybros et Frémeaux, 1990).

3.2.3 – Nature, concentration et volume du solvant

Le choix du ou des solvants est très important. Il doit être d'une grande pureté et avoir un faible point d'ébullition pour pouvoir être éliminé facilement en limitant la perte de composés volatils. Il ne doit pas interférer avec la méthode d'analyse utilisée. Il doit pouvoir extraire les composés polaires et apolaires ou bien être sélectif. Le choix est fonction de la matrice et des composés à étudier. Il faut tenir compte de la polarité des composés, de leurs températures d'ébullition et de la miscibilité avec les autres solvants (Cicile, 2002 ; Fernandez et Cabrol-Bass, 2007).

3.2.4 – Méthode, durée, température et pression

La réduction de la pression de marche provoque un abaissement des températures d'ébullition et de condensation. Inversement, toute augmentation de pression entraîne une élévation de ces températures (Cicile, 2002).

L'élévation de la température permet l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité. Elle doit être limitée pour éviter les risques d'extraction des composés nuisibles et la dégradation thermique du soluté (Leybros et Fremeaux, 1990).

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

4 – Techniques conventionnelles d'extraction

D'après Guenther (1949), les huiles essentielles sont obtenues le plus souvent par distillation.

4.1 – Distillation – Evaporation

La différence entre distillation et évaporation, est l'intérêt porté aux produits séparés. Dans la distillation, c'est la phase vapeur qui a de la valeur car elle contient le ou les constituants à séparer, alors que dans l'évaporation, c'est le résidu solide ou liquide obtenu par vaporisation du solvant, qui est le produit intéressant (Peyron, 1992).

4.1.1 – Codistillation avec vapeur d'eau

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

- La distillation à la vapeur, ou hydrodistillation (Figure 2, A), dans laquelle le végétal est en contact direct avec l'eau bouillante, ce qui évite d'agglutiner les charges végétales comme le fait l'injection de vapeur. Quelques utilisations actuelles : rose, fleurs d'oranger, amande pulvérisée.
- La distillation à la vapeur saturée : le végétal est supporté dans l'alambic par une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau (Figure 2, B). Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée, mais pas avec l'eau bouillante.
- La distillation à la vapeur directe, saturée ou surchauffée, souvent à des pressions supérieures à l'atmosphérique, est identique à la précédente, sans eau dans le fond de l'alambic, la vapeur étant introduite au-dessous de la charge végétale (ou en dessus dans le système d'hydrodiffusion). Technique la plus utilisée actuellement, elle évite le contact prolongé du végétal avec l'eau en ébullition et la formation de certains artefacts (Peyron, 1992 ; Garnero, 1996).

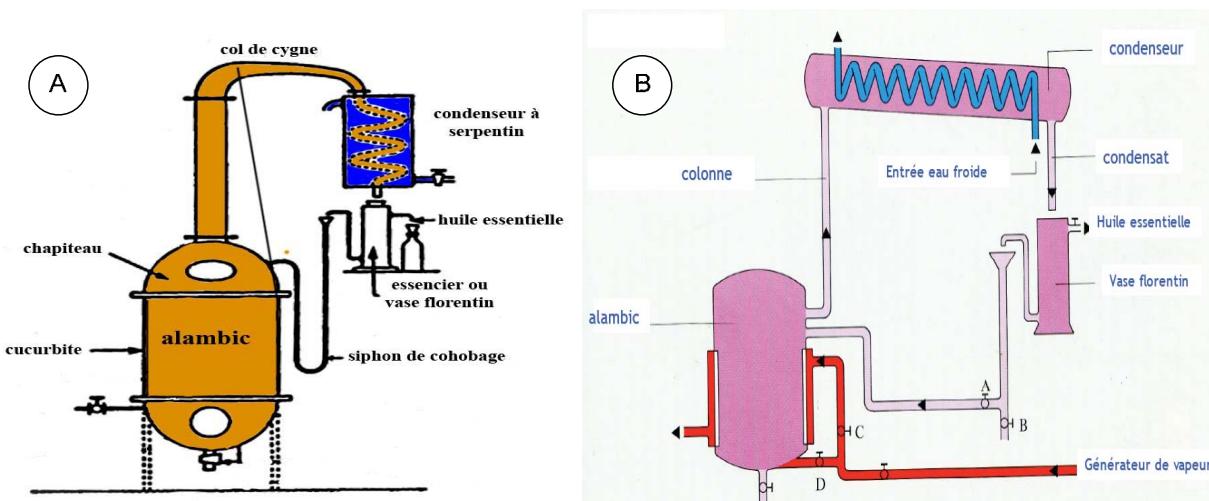


Fig. 2 : Schéma des appareils d'Hydrodistillation (A), et d'entraînement à la vapeur d'eau (B).

D'une façon générale, l'hydrodistillation, de même que l'entraînement à la vapeur, engendrent des réactions d'isomérisation, de saponification ou de polymérisation. Par ailleurs, le temps de distillation affecte la composition de l'huile essentielle dans la mesure où l'hydrodiffusion des composés volatils présents dans les tissus végétaux à travers les parois cellulaires constitue l'étape limitante du processus. Le mélange huile essentielle–eau est recueilli par un col de cygne et refroidi dans un condenseur : la séparation se fait le plus souvent par simple décantation dans un vase florentin (Crouzet, 1998).

4.1.2 – Codistillation avec un fluide autre que l'eau

L'alcool a été anciennement utilisé pour fabriquer les alcoolates. L'emploi de liquides entraîneurs convenablement choisis (polyols, polyesters et autres composés chimiques à point d'ébullition élevé) s'est généralisé depuis quelques décennies, en codistillant le végétal lui-même, ce qui est rare, mais surtout un de ses extraits primaires (huile essentielle, concrète...) sous pression élevée ou très réduite (distillation moléculaire : vide élevé, court trajets des vapeurs). On obtient ainsi d'excellents produits commerciaux, peu colorés, sans odeur empyreumatique (Peyron, 1992 ; Pellerin, 2001).

4.1.3 – Evaporation – concentration

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

Notons que « la qualité d'un extrait est en raison inverse de la température maximale mise en œuvre pour son obtention et de la durée d'application de cette température, en particulier dans la concentration du solvant d'extraction » (Peyron, 1992).

4.1.4 – Rectification (fractionnement)

Cette opération de distillation sous vide consiste à séparer plusieurs constituants d'un mélange liquide par échange de matière entre une phase vapeur et une phase liquide, au moyen d'une série de vaporisations et de condensations entre ce liquide et cette vapeur qui chemine à contre courant dans une colonne. Elle permet de séparer des composants de mélanges liquides dans un état de grande pureté, voire éliminer les traces d'eau, les matières solubles ou résineuses et les colorants (Cicile, 1994, 2002 ; Crouzet, 1998).

4.1.5 – Distillation sèche

En chauffant en milieu clos, certains bois (cade, bouleau,...) à des températures élevées, on fabrique des huiles empyreumatisques (cade, bouleau, arôme fumé...) d'importance assez limitée, mais riches en hydrocarbures aromatiques polycycliques cancérogènes (Peyron, 1992 ; Garnero, 1996).

4.2 – Extraction au moyen de solvants

Certains organes de végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau ou l'hydrodistillation. C'est le cas des fleurs de jasmin, d'œillet, de tubéreuse... Il faut donc, pour ces végétaux, recourir à d'autres

méthodes d'extraction des composés odorants volatils telles que l'extraction par les solvants fixes (extraction par les corps gras ou enfleurage) et volatils (extraction par l'hexane) (Garnero, 1996).

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

- L'extraction solide/liquide, c'est-à-dire l'opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide (la matière à extraire), et une phase liquide (le solvant d'extraction). Elle est réalisable :
 - soit par simple contact (à étage unique). L'extraction dans ce cas est souvent incomplète même avec un très bon solvant ;
 - soit par contacts multiples, à co-courants parallèles ou à contre-courant (extraction méthodique), cette dernière est plus économique (Leybros et Frémeaux, 1990).
- L'extraction liquide/liquide, c'est-à-dire l'opération de transfert ou d'échange de matière entre deux phases liquides, la solution et le solvant. Il s'agit d'une extraction systématique en continu, utilisée pour extraire un constituant particulier ou pour en éliminer d'autres, en utilisant deux solvants non miscibles à pouvoir dissolvant plus spécifique de chaque groupe (Moulin et al., 2002).

4.2.1 – L'enfleurage à froid

Ce processus d'extraction, n'es plus trop utilisé, est réservé aux huiles florales de très grande qualité. Les senteurs particulièrement délicates peuvent également être capturées par enfleurage dans de la graisse froide. Pour ce faire, le mieux est de suspendre simplement les plantes dans un linge immergé dans de l'huile froide et de changer celui-ci après 12 à 24 heures.

Pour pouvoir utiliser la fragrance à la fin, il convient de la déclaver de la graisse avec de l'alcool puis de distiller finalement cet alcool selon ses besoins afin de concentrer davantage la senteur. L'enfleurage constitue en quelque sorte la part royale dans le domaine de la confection de parfums, car il permet également de préserver des senteurs particulièrement délicates dans leur haute qualité et leur pureté. La macération dans l'alcool est sensiblement plus simple et moins dispendieuse ; toutefois, cette méthode n'est en rien comparable à l'extraction des senteurs par enfleurage au niveau de la qualité (Möller, 2008).

4.2.2 – L'enfleurage à chaud

Alternativement à la macération, il est également possible de procéder par l'enfleurage à chaud dans la graisse. Pour cela, il convient de chauffer une graisse animale clarifiée (à défaut de la vaseline ou de la paraffine, substances plus modernes) dans une chaudière en cuivre à 60 degrés. Les plantes y sont incorporées et détrempées pendant 12 à 24 heures. Afin d'obtenir un résultat de qualité, il faut pressurer les plantes et remplir de nouveau la chaudière. Ce processus est répété autant de fois que nécessaire pour assurer le passage d'un maximum d'arômes dans la graisse. Ensuite une opération de filtration est nécessaire pour séparer la garsse des fleurs. Une pâte parfumée appelée « pommade » qui va être traitée avec la même technique d'extraction que pour un enfleurage à froid (Möller, 2008).

4.3 – Méthodes d'extraction à froid

La pression à froid est le moyen le plus simple mais aussi le plus limité. Cette technique d'extraction est utilisée pour obtenir des essences d'agrumes contenues dans les zestes.

Autrefois, les fruits étaient frottés manuellement sur des parois garnies de picots d'une écuelle de bois. L'huile exprimée était recueillie à l'aide d'une éponge. Elle était ensuite soigneusement filtrée. Quatre à cinq heures sont nécessaires pour traiter une centaine de kilo d'écorces, sans compter les pertes de rendement.

Afin d'augmenter le rendement et de réduire les coûts, de nombreux essais ont été effectués pour mécaniser le procédé. En 1908, Perroni-Paladini suivi de Lo Castro, Marisca et, plus tard, Speciale et Indelicato ont inventé des machines ayant une capacité de traitement supérieure (environ 1 tonne/heure). De concepts mécaniques différents, ces machines consistent en deux rouleaux sur lesquels tourne une chaîne spéciale, avec des éléments déformables. Après extraction du jus par "birillatrice", les écorces sont entraînées en tournant entre la chaîne et un plateau horizontal nervuré fixe. Des jets d'eau permettent de récupérer l'essence et l'émulsion est ensuite centrifugée. Ces machines (Figure 3) sont appelées « Sfumatrice ».

En appliquant des systèmes plus performants, Speciale et Indelicato ont mis au point de nouvelles machines telles que la "Super-Sfumatrice" et, plus récemment "AZS-204" permettant l'extraction automatique et simultanée du jus et de l'huile essentielle, avec des capacités supérieures à 2 tonnes/heure. Le fruit est coupé en deux par une lame fixe et les moitiés tombent dans des coupelles dans lesquelles elles sont pressées par des têtes rotatives pour récupérer le jus. Elles sont ensuite entraînées entre un rouleau et un plateau fixe où l'essence est récupérée avec des jets d'eau. L'émulsion eau - essence est séparée par centrifugation (Dugo et Di Giacomo, 2002).

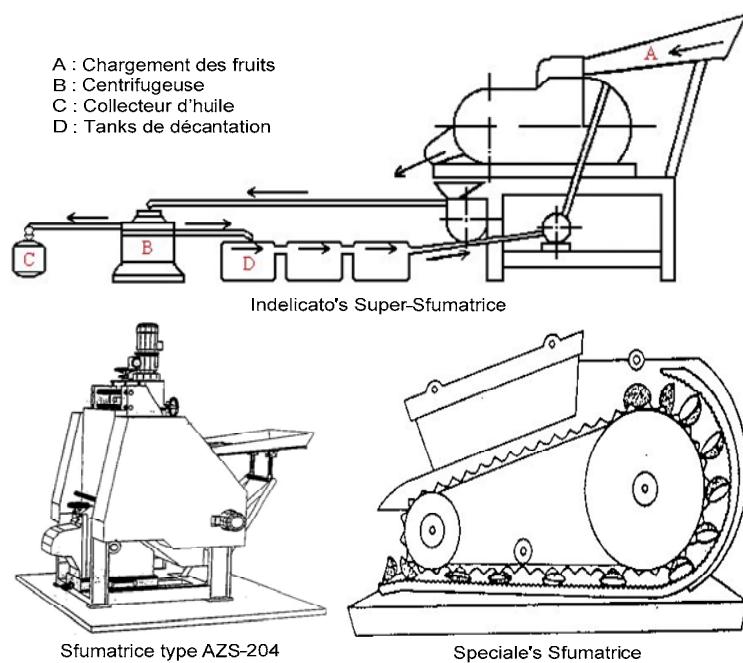


Fig. 3 : Schéma des différents Sfumatrices.

Poursuivant leurs recherches pour améliorer l'extraction de l'essence à partir du fruit entier, Ando, Avena, et plus récemment Speciale et Indelicato, ont développé une nouvelle méthode d'extraction appelée « Pelatrice » largement diffusée dans le monde (Figure 4). Les fruits sont envoyés dans une machine comportant trois couples de rouleaux en acier inox percés de trous comme une râpe, tournant en sens contraire et forçant les fruits à tourner sur eux-mêmes afin d'en râper toute l'écorce. Des jets d'eau récupèrent l'essence formant une émulsion. Celle-ci est séparée puis clarifiée dans plusieurs centrifugeuses (Kimball, 1999 ; Dugo et Di Giacomo, 2002).



Fig. 4 : Photos à gauche d'une Pelatrice et à droite d'une centrifugeuse séparatrice de l'essence de citrus des eaux résiduelles.

La société américaine FOOD MACHINERY CORPORATION (F.M.C.), est ensuite arrivée sur le marché avec sa "FMC- IN-LINE", qui extrait simultanément le jus et l'essence (Figure 5). Les extracteurs sont équipés de quatre têtes d'extraction, chacune d'elles étant constituée d'un bol inférieur et d'un bol supérieur mobile qui compriment le fruit. Des couteaux supérieurs et inférieurs tranchent le fruit pendant le mouvement de descente du bol supérieur. Le jus est ainsi pressé dans un tuyau tamiseur qui se comprime pendant le mouvement ascendant synchronisé du tuyau d'écoulement. Parallèlement, l'essence obtenue est éoulée latéralement lorsque les cellules du zeste (flavedo) éclatent lors de la descente du bol supérieur (Kimball, 1999).

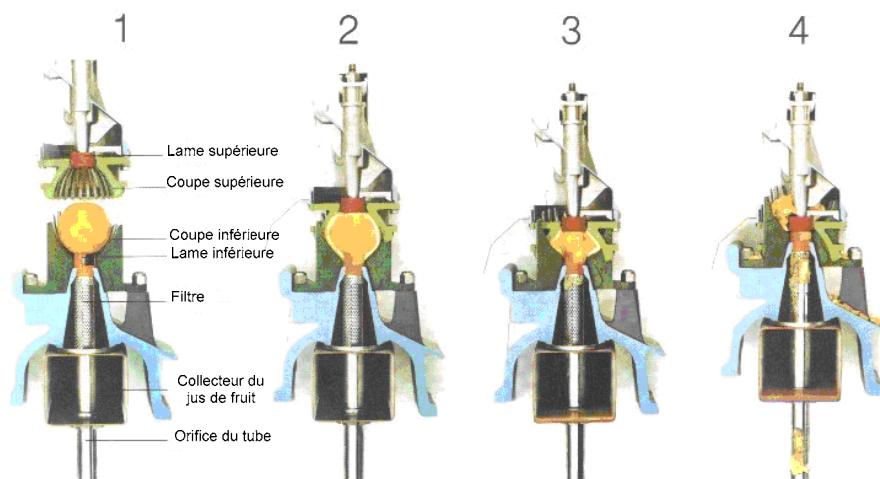


Fig. 5 : Schéma représentatif de l'extraction par FMC in line.

Il convient de mentionner une autre technique utilisée avec succès par l'industrie. Elle consiste en deux vis qui forcent les écorces à libérer l'essence à une pression donnée (Figure 6). L'émulsion est envoyée dans un filtre-presse pour éliminer les principaux résidus (Dugo et Di Giacomo, 2002).

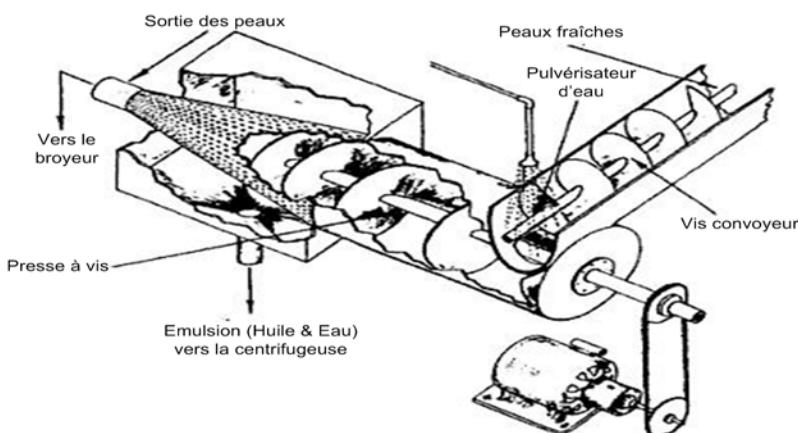


Fig. 6 : Schéma représentatif de l'extraction par pression.

4.4 – Méthode d'hydrodiffusion

L'hydrodiffusion (Figure 7), est une co-distillation descendante. Dans ce procédé, le végétal est disposé dans un parallélépipède métallique grillagé. On soumet donc le végétal à une pulsion de vapeur d'eau, saturée et humide, mais jamais surchauffée de haut en bas. La forme de l'appareillage permet une meilleure répartition des charges. La vapeur d'eau emporte avec elle toutes les substances volatiles. L'huile essentielle est recueillie grâce à un collecteur qui permet un équilibre avec la pression atmosphérique. On peut aussi préciser qu'il y a un procédé de cohobation qui renvoie dans la chaudière toutes les eaux qui sont séparées des huiles (Wijesekara et al., 1997).

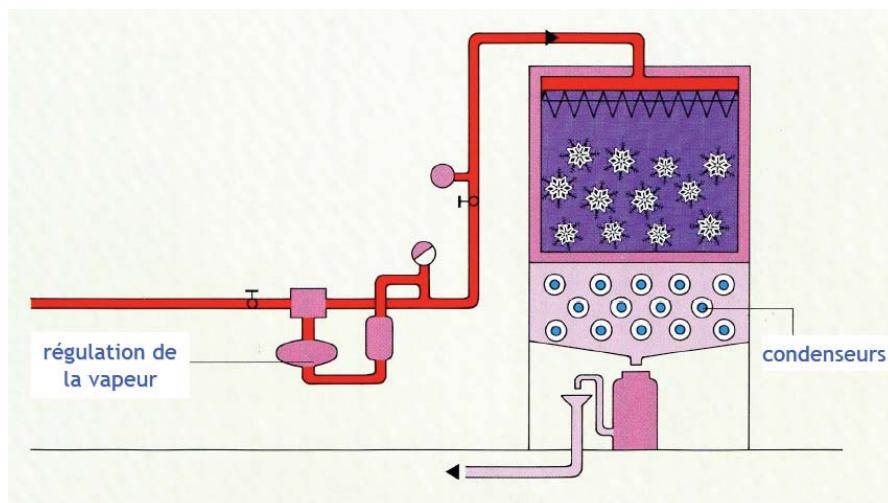


Fig. 7 : Schéma du procédé d'hydrodiffusion.

5 – Extraction par des techniques innovantes

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

5.1 – Extraction par des solvants supercritiques

C'est une nouvelle technologie utilisée industriellement qui fait encore l'objet de nombreuses recherches. L'originalité de cette technique repose sur le comportement du solvant utilisé sous des conditions particulières puisque au-delà d'un certain point, dit point critique, caractérisé par une température (T_c) et une pression (P_c), les corps purs se trouvent dans un état particulier dit supercritique. Dans leurs conditions d'utilisation, les fluides supercritiques ont une masse volumique voisine de celle des liquides, une viscosité proche de celle des gaz et une

diffusivité intermédiaire ; leur polarité est modifiée par rapport à l'état liquide. Leur pouvoir dissolvant dépend fortement de la température et de la pression (Perrut, 1999).

Le fluide supercritique le plus utilisé est le dioxyde de carbone (Pellerin, 1991, 2001). Le CO₂ est thermodynamiquement stable, insipide, inodore et incolore, il est ininflammable mais peut être asphyxiant à haute concentration. Son point critique est de $P_c = 73,6$ bar et $T_c = 31,4$ °C.

Dans cet état, l'extrait devient insoluble dans le CO₂ et précipite au fond de l'enceinte. Le gaz carbonique est ensuite liquéfié et peut être à nouveau utilisé (Figure 8).

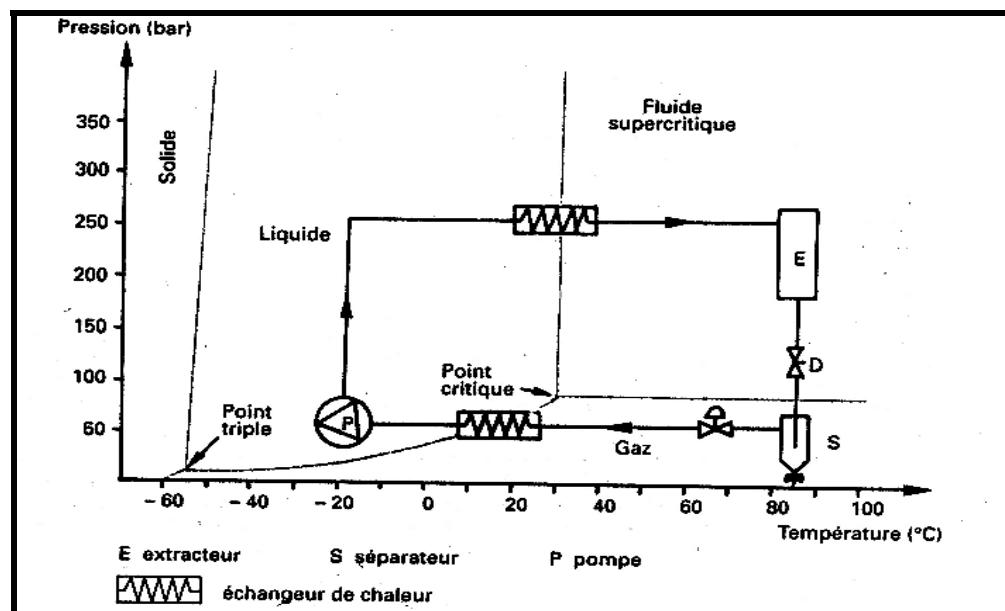


Fig. 8 : Schéma de principe d'une extraction par CO₂ supercritique (Pellerin, 2001).

L'extrait récupéré ne contient aucune trace de solvant résiduel qui est facilement éliminé sous forme gazeuse. Le CO₂ est ensuite recyclé et ramené à l'état supercritique. Afin d'extraire les composés les plus volatils dont la composition est de type « *huiles essentielles* », on utilise des pressions d'extraction modérées (entre 80 et 100 bar). À des pressions plus élevées (200 à 280 bar), on extrait également des composés plus lourds dont la composition est de type « *concrètes* ». Évidemment selon les conditions opératoires, on peut en théorie obtenir tous les extraits intermédiaires. Le rendement est alors beaucoup plus élevé. Les extractions sont rapides ; il faut compter environ 90 min pour extraire 500 g de matière végétale (Pellerin, 2001). Le CO₂ étant une molécule apolaire, il extrait préférentiellement les composés apolaires. Cependant, à des pressions élevées, la polarité du CO₂ augmente et il va extraire des composés de plus en plus polaires (Anklam et al., 1998). Étant donné que l'on chauffe très peu la matière première, les composés thermosensibles et hydrolysables ne sont pas dégradés. Cependant, le CO₂ présente une certaine acidité, il peut se former de l'acide carbonique, pouvant entraîner une

légère hydrolyse acide. L'extrait obtenu par extraction au CO₂ supercritique est un des extraits qui se rapproche le plus de la matière première (Pellerin, 1991).

L'extraction au CO₂ supercritique entièrement « verte » semble être viable avec l'ajout de co-solvants qui sont introduits à l'aide d'une pompe à débit constant. L'éthanol et l'eau sont les plus utilisés à cause de leurs polarités comme co-solvants/réactifs intermédiaires, et l'eau dans le domaine compris entre le point d'ébullition et les conditions supercritiques. Ainsi, l'extraction est moins sélective, plus de composés sont extraits, le rendement en est amélioré. D'autres solvants peuvent être utilisés. Cependant, leur utilisation supprime certains avantages majeurs rencontrés lors de l'utilisation du CO₂. En effet, avec un co-solvant, il est possible de perdre des composés volatils lors de l'étape de concentration (Anklam et al., 1998 ; King, 2004).

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

L'extraction aux fluides supercritiques, le plus souvent du CO₂, permet d'extraire des substances odorantes peu volatiles et plus particulièrement les matières sèches qui sont récalcitrantes aux méthodes d'extraction traditionnelles. De ce fait, elle a été utilisée pour extraire les composés aromatisants de nombreux aliments comme des épices (Duarte et al., 2004), du riz (Bhattacharjee et al., 2003), diverses boissons (Senorans et al., 2003) et du café (Sarrazin et al., 2000).

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

L'extraction aux fluides supercritiques est donc une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives (méthode d'extraction plus complète et moins dégradante). Le développement de cette technologie continue à s'appuyer sur des traitements et/ou des produits qui n'affectent pas l'environnement et les consommateurs. Le changement des températures et/ou des pressions réduites des fluides critiques offre une profusion d'opportunités, dont un excellent exemple est constitué par l'état critique relatif de l'eau. Par exemple, l'eau sous-critique fournit, légèrement au-dessus de son point d'ébullition, un milieu unique imitant celui des solvants organiques polaires, qui a même été utilisé pour l'extraction des solutés thermiquement labiles ou dans la chimie réactionnelle (King, 2004 ; Turner, 2006).

5.2 – Extraction par Détente Eclair (Flash–Détente)

La Flash-Détente brevetée par l'INRA en 1993, fut mise au point pour extraire les arômes de bananes, de mangues ou de lichis. La flash détente (Figure 9), est un procédé multi-usages, multi-effets (Brat, 2001). Cette technique se réalise en deux étapes, la première consiste à étuver la matière végétale à 85 – 90°C par l'utilisation d'une vis à injection de vapeur. La seconde est une détente avec introduction brutale sous vide (environ 30 mbar) du matériel végétal (fruits, légumes, plantes, etc.). La température d'ébullition de l'eau dans ces conditions de vide se situe entre 27 et 30°C. Cette mise sous vide instantanée provoque donc l'évaporation brutale d'une partie de l'eau de constitution du matériel végétal étuvé (environ 10 % de la masse humide initiale) et une chute brutale de la température du milieu. Cette perte d'eau instantanée engendre un broyage fin dû à la création de micro-canaux intercellulaires. Ce bouleversement et cette explosion cellulaire confèrent aux produits des qualités physico-chimiques, rhéologiques et organoleptiques bien particulières. Les eaux d'évaporation sont récupérées séparément par condensation : ces eaux, particulièrement riches en composés volatils aromatiques, sont appelées eaux aromatiques et pourront être réintroduites dans les produits après l'extraction par Flash-Détente.

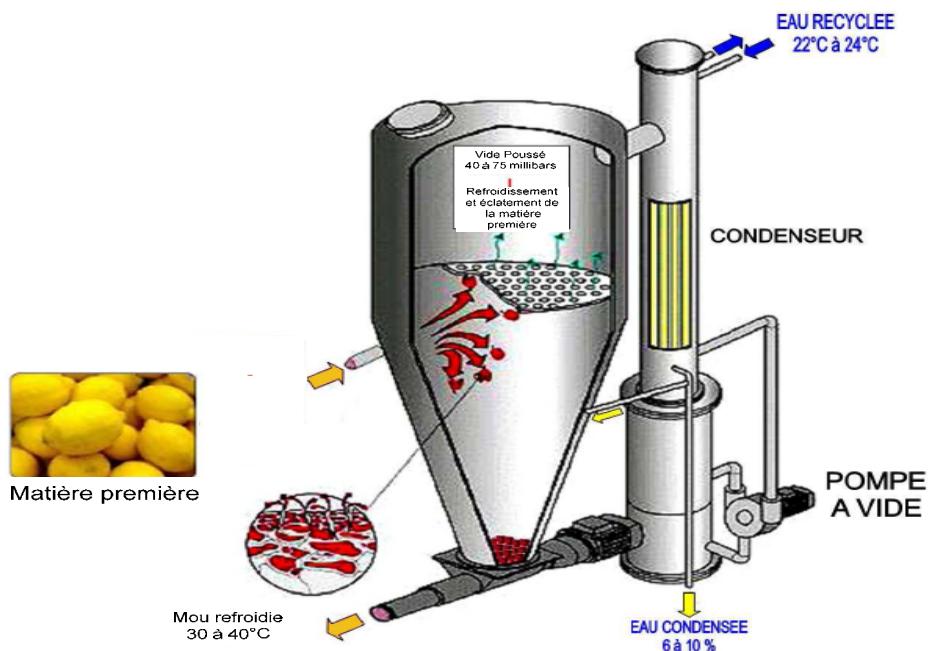


Fig. 9 : Schéma de l'extraction par Flash Détente.

Des essais ont été effectués par le CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement – France) pour l'extraction des huiles essentielles d'écorces d'agrumes (pomelo, orange, mandarine, citron), préalablement étuvées dans la chambre de vide, provoquant l'explosion des glandes à huiles essentielles contenues dans

le flavedo. Les huiles seront donc vaporisées simultanément avec une partie de l'eau présente dans les écorces. Après condensation, les huiles seront récupérées sous forme d'émulsion aqueuse, puis purifiées par centrifugation. Les rendements d'extraction obtenus à partir d'écorces de citron, d'orange, de mandarine et de pomelo sont respectivement égaux à 44 %, 29 %, 33 % et 27 %. Après déterpémentation, les huiles essentielles extraites par le procédé de Flash-Détente sont de qualité supérieure à celles des huiles fraîchement pressées et ce, avec des proportions relatives supérieures en aldéhydes mono- et sesquiterpéniques.

En plus de l'extraction des huiles essentielles d'agrumes, cette technique permet, de produire simultanément de la purée de fruits (aux propriétés sensorielles renforcées) avec un rendement avoisinant les 75 %. Donc de 1000 kg de fruits introduits nous recevons 750 kg de purée de fruits, 330 kg de drêches de citrons et 100 kg d'eaux aromatiques de citron et d'huiles essentielles. La Flashe Détente présente ainsi d'une part un intérêt technologique et économique en améliorant et en développant les propriétés sensorielles et nutritionnelles des produits qui en sont issus ; et d'autre part un intérêt environnemental par la réduction des volumes transportés, la diminution de la charge organique des effluents et la valorisation de l'alimentation du bétail (digestibilité améliorée et durée de vie accrue).

5.3 – Détente Instantanée Contrôlée

Cette méthode d'extraction est née des études théoriques menées par le Professeur Allaf (1989) sur l'expansion par extrusion et suivies de travaux expérimentaux. La Détente Instantanée Contrôlée est fondée sur la thermodynamique de l'instantanéité et des processus d'autovaporisation couplée à l'évolution hydro-thermo-mécanique de nombreux polymères à usages alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, etc... (Allaf et al., 1994 ; Rezzoug et al., 1998).

Le traitement par "*Détente Instantanée Contrôlée D.I.C.*" est utilisé en vue d'extraire les arômes et les huiles essentielles à partir de végétaux adéquats naturels ou préalablement séchés. En effet, appliquée aux végétaux, la D.I.C. permet la modification de leur structure, provoquant ainsi leur texturation et facilitant alors les opérations de transfert de matière. L'auto-vaporisation qui accompagne la détente implique la séparation liquide-solide et permet donc l'extraction de composés spécifiques. Cette opération se distingue par un traitement thermique très localisé, durant un temps réduit (quelques dizaines de secondes).

Comparée aux autres procédés traditionnels, la D.I.C. (Figure 10), est relativement rapide, et donc nettement plus flexible. D'un rendement supérieur, la méthode est comparable à l'extraction par CO₂ supercritique au niveau de la qualité de l'extrait, alors que la consommation

énergétique est inférieure à celles de la distillation et par entraînement à la vapeur. Les différents aspects de la qualité sont ainsi couplés : ceux du produit fini, ceux du procédé et ceux de son impact environnemental :

- *Vecteur qualité* : Améliorer la qualité de l'extrait obtenu par élimination de la dégradation thermique et de la présence de solvants résiduels.
- *Vecteur environnemental* : Réduire les rejets de solvants, d'eau usée et de matières résiduelles.
- *Vecteur énergétique* : Réduire la consommation énergétique nécessaire à l'extraction des huiles essentielles.

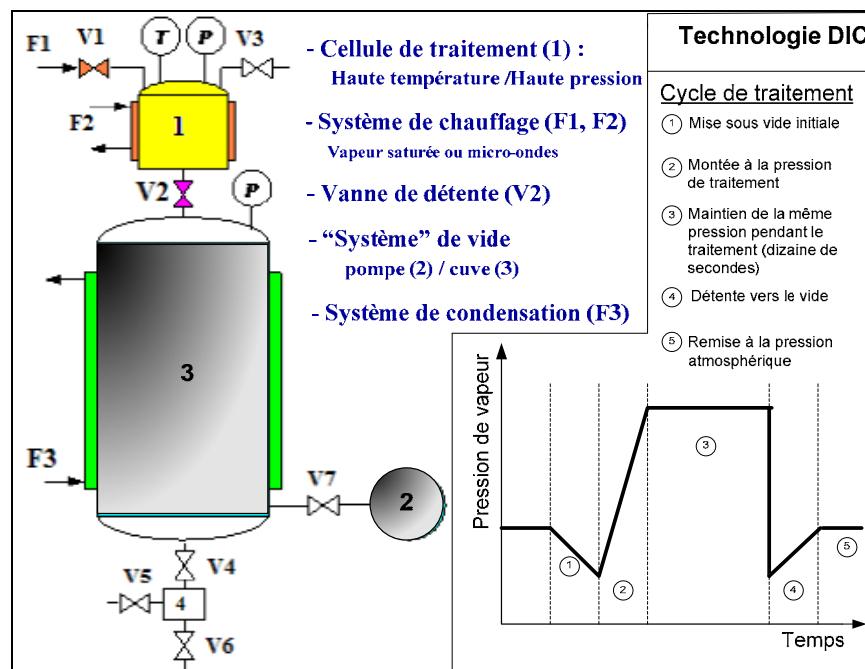


Fig. 10 : Schéma d'une unité de Détente Instantanée Contrôlée (DIC) et son cycle de traitement.

La Détente Instantanée Contrôlée (DIC) trouve des applications diverses dans le séchage des fruits et légumes, et dans la décontamination microbienne. Elle offre également des avantages économiques (vitesse, coût), et qualitatifs (stérilisation, qualités organoleptiques, contenu en vitamines) (Rezzoug et al., 2005).

5.4 – Extraction par ultrasons

L'extraction des composés bioactifs par ultrasons (20 – 100 kHz) est une technique émergente qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant. Elle est facile à mettre en œuvre et peu consommatrice de solvant et d'énergie (Chemat et al., 2008). En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être

utilisée pour l'extraction des composés aromatique ou des essences de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (Salisova et al., 1997 ; Vinatoru et al., 1997 ; Hromadkova et al., 1999 ; Vinatoru et al., 1999 ; Vinatoru, 2001 ; Chemat et al., 2003 ; Chemat et al., 2004^a ; Luque de Castro et al., 2007).

CAVITATION ACOUSTIQUE

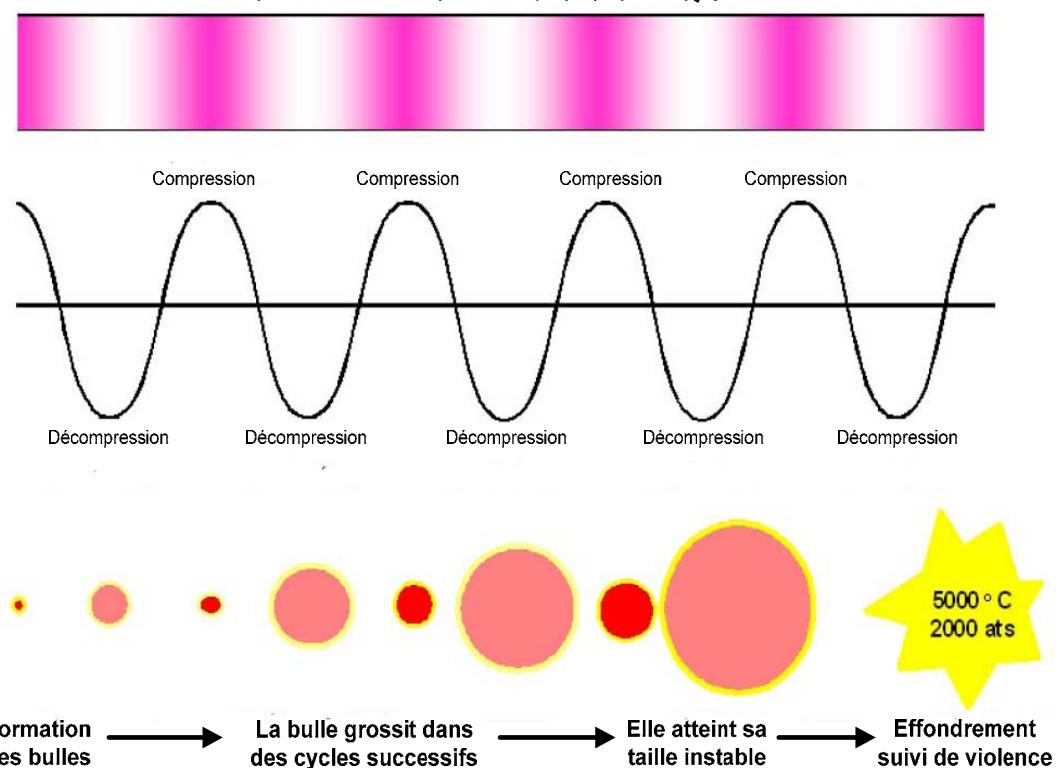


Fig. 11 : Schéma démonstratif de la cavitation ultrasonore.

Pendant la sonication, les ondes sonores utilisées induisent des vibrations mécaniques dans le solide, le liquide ou le gaz, à travers une succession de phases d'expansion et de compression, comme au cours d'un phénomène de cavitation. Les bulles, formées par l'expansion, vont se développer puis dégonfler. Si ces bulles se situent près d'une surface solide, alors le dégonflement sera asymétrique, ce qui produira des jets de liquide ultra-rapides (Figure 11). D'après Vinatoru (2001), les mécanismes d'extraction impliquent deux phénomènes physiques :

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

Les ultra-sons permettent d'améliorer ces deux phénomènes. Ils pourraient augmenter le rendement, diminuer la quantité de solvant nécessaire et/ou le temps de traitement (Mason et Cintas, 2002).

5.5 – Extraction assistée par Micro-ondes

Les rayonnements micro-ondes sont des ondes électromagnétiques qui se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière. Elles sont caractérisées par une fréquence comprise entre 300 MHz et 30 GHz, c'est-à-dire par une longueur d'onde comprise entre 1 m et 1 cm. Sur le spectre électromagnétique (Figure 12), elles sont situées entre les radiofréquences et les infrarouges (Kingston et Haswell, 1997).

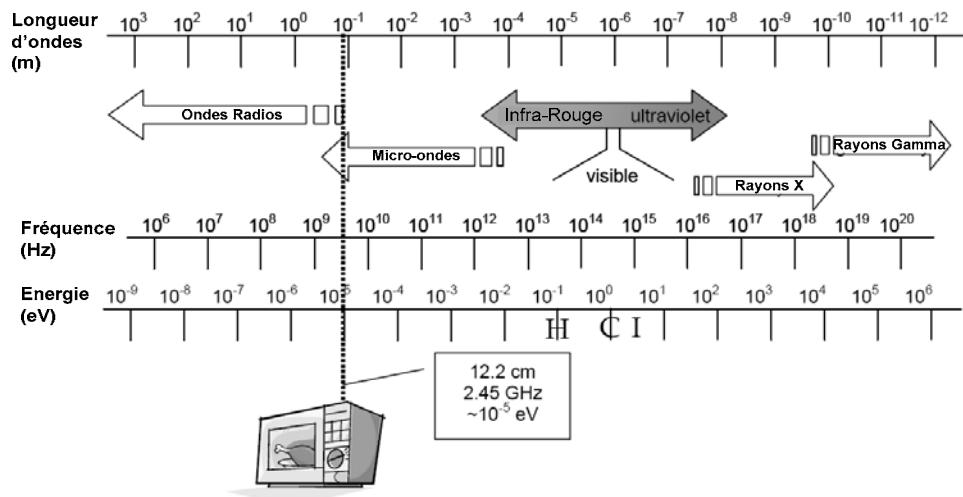


Fig. 12 : Spectre électromagnétique.

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

5.5.1 – Extraction par solvant assistée par micro-ondes

La méthode d'extraction par solvant assistée par micro-ondes a été mise au point par l'équipe canadienne de Paré et *al.* (1990). Celle-ci a déposé le premier brevet européen sur « l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes ». Ces auteurs proposaient de traiter

sous micro-ondes un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant partiellement ou totalement transparent aux micro-ondes qui permettent d'accélérer la cinétique d'extraction et de réduire le ratio solvant/charge.

Des essais effectués par cette nouvelle technique - notamment sur la menthe -, ont souligné le gain de temps ainsi que la similitude de la qualité des produits à ceux obtenus par entraînement à la vapeur classique. De nombreux brevets seront déposés alors par Paré et son équipe tant au niveau américain qu'au niveau européen (Paré et al., 1990 ; Paré et al., 1991 ; Paré, 1994). Le procédé original sera par la suite quelque peu modifié et enrichi et sera dénommé : MAPTM (Microwave Assisted Process). Il a pour vocation d'être une méthode d'extraction utilisable pour un grand nombre de matrices solides ou liquides telles que les végétaux mais aussi les tissus animaux, les sols, les cosmétiques ou les eaux polluées. Actuellement l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave Assisted Extraction) est actuellement très généralement citée dans la littérature (Eskilsson et Bjorklund, 2000). En réalité, la MAE et MAPTM sont toutes deux des techniques d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. A titre d'exemple, un pilote d'extraction des épices et aromates par la technique MAPTM est présenté dans la Figure 13.

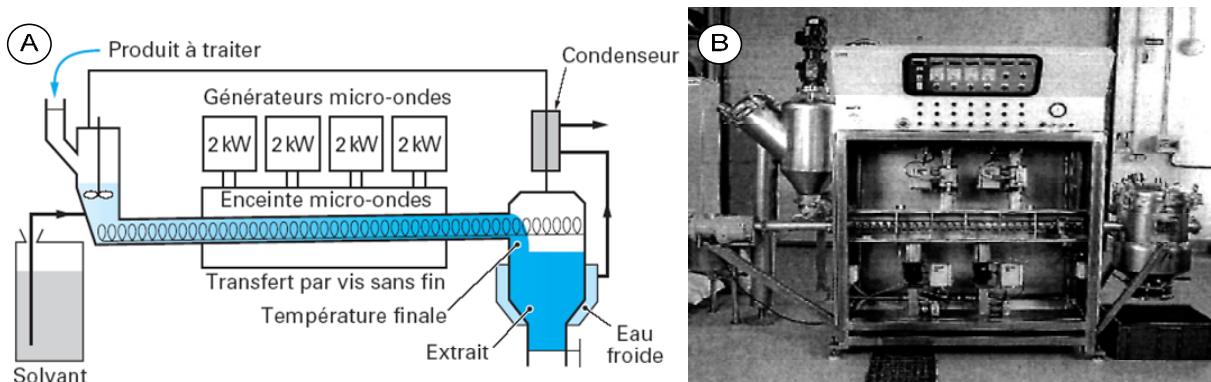


Fig. 13 : Schéma du procédé d'extraction MAPTM en continu (A) et photo d'une unité pilote du même procédé (B)

5.5.2 – Entraînement à l'air assisté par micro-ondes

En 1989, Craveiro et al. (Craveiro et al., 1989), ont proposé une technique originale d'extraction de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* par chauffage micro-ondes sans solvant en utilisant un compresseur à air. L'huile essentielle extraite en 5 minutes sous chauffage micro-ondes était présentée comme qualitativement identique à celle obtenue en 90 minutes par entraînement à la vapeur. Le système proposé est inspiré du procédé d'enraînement à la vapeur d'eau classique. Il se compose en fait de trois parties : un compresseur envoyant de l'air dans le

ballon où se trouve la matière végétale placée dans un four micro-ondes domestique, comme le montre la Figure 14.

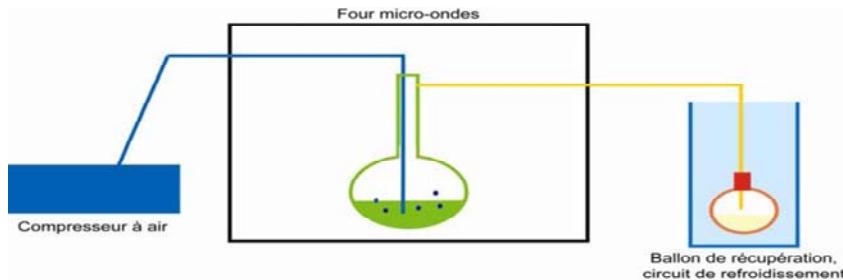


Fig. 14 : Schéma du procédé d'extraction par entraînement à l'air assisté par micro-ondes.

5.5.3 – Hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite

Le procédé « VMHD » ou Vacuum Microwave HydroDistillation a été élaboré et breveté par la société Archimex dans les années 1990, avant d'être racheté par l'équipementier Pierre Guérin (Mengal et Monpon, 1994). Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Le matériel végétal traité, frais ou sec (auquel cas on lui rajoute la quantité d'eau requise) est soumis d'une part aux micro-ondes dont le rôle est d'assurer le transfert de matière, puis d'autre part à un vide pulsé qui permet l'entraînement azéotropique des substances volatiles à une température inférieure à 100°C. Cette opération peut être répétée plusieurs fois selon le rendement souhaité. D'après les concepteurs du VMHD (Figure 15), l'extraction serait, pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique, dix fois plus rapide que l'hydrodistillation. Les notes « crues », les plus thermosensibles, semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique (Toursel, 1997 ; Mengal et al., 1993).

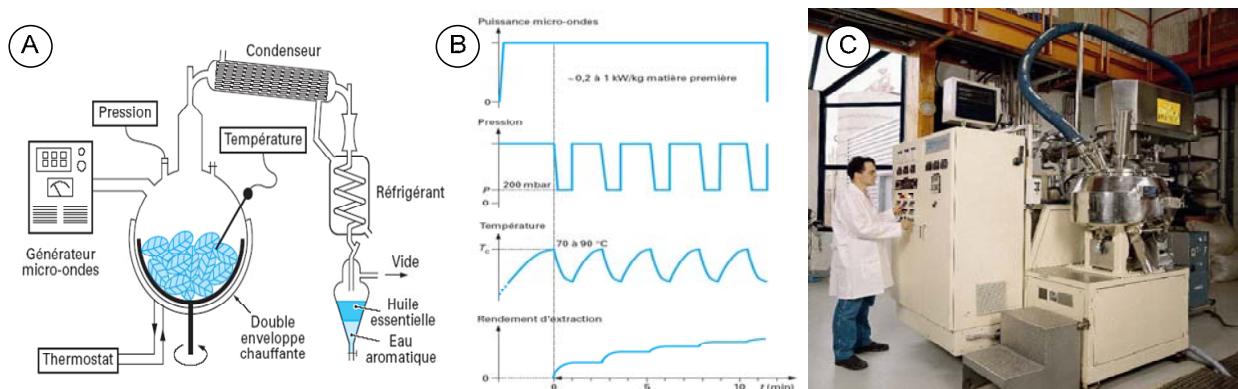


Fig. 15 : Schéma du procédé VMHD (A), Evolution des principaux paramètres (B), Photo d'une unité pilote du procédé VMHD (C).

5.5.4 – Hydrodistillation assistée par micro-ondes

Récemment, Stashenko et al. (2004^{a,b}), utilisent un procédé d'hydrodistillation par micro-ondes. Ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes (Figure 16). Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités par ces auteurs sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique.

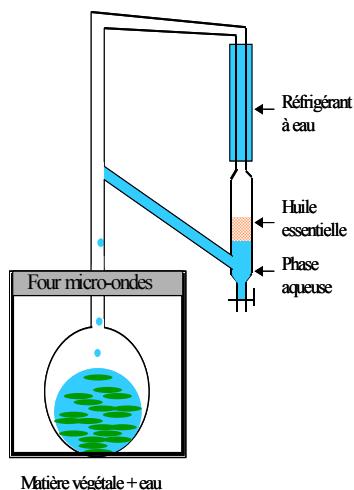


Fig. 16 : Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.

5.5.5 – Procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM)

En 2004, une méthode originale d'extraction des produits naturels assistée par micro-ondes à pression atmosphérique, sans solvant et sans eau a été développée et brevetée par Chemat et al. (2004^{b,c}). Basée sur un principe relativement simple, cette méthode décrit une distillation sèche assistée par micro-ondes qui consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes contenant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite à partir de l'eau de la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal (Figure 17). La distillation sèche assistée par micro-ondes, a été appliquée à deux types de plantes, les épices (Lucchesi et al., 2004^a) et les herbes aromatiques (Lucchesi et al., 2004^b). Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction les rendements en huiles

essentielles obtenus par ESSAM sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation. D'un point de vue qualitatif, on retrouve dans les huiles essentielles obtenues par ESSAM une proportion plus importante de composés oxygénés, les plus valorisables sur le plan olfactif.

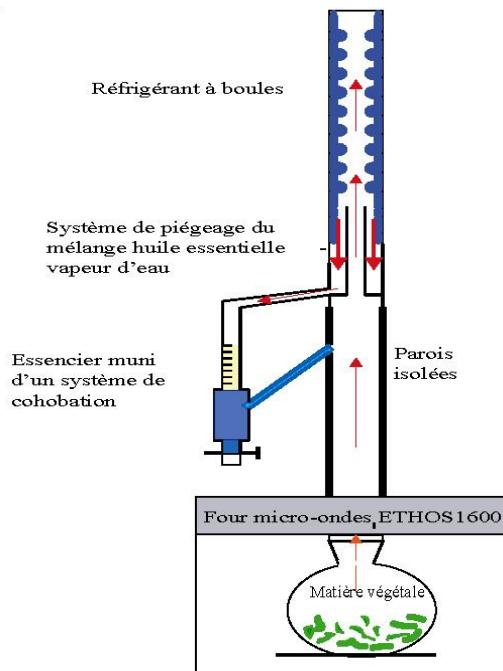


Fig. 17 : Schéma du procédé d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).

6 – Situation économique des huiles essentielles

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

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

sibirica à la CEI [Communauté des Etats Indépendants (ex-Russie)]. Pour de nombreux pays, principalement en Afrique et en Asie, la production d'huile essentielle est leur principale source d'exportation. Pour l'Indonésie, le Sri Lanka, le Vietnam, et même l'Inde, les chiffres d'exportation d'HE sont très élevés.

Tableau 2: Production mondiale (2008) des plus importantes huiles essentielles.

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

(Source: Lawrence, 2009).

Les principaux pays producteurs se trouvent dans tous les continents. En Europe, le cœur de production se trouve dans les pays méditerranéens : Italie, Espagne, Portugal, France, Croatie, Albanie et Grèce, qui produisent tous des huiles essentielles en quantités industrielles. Sans oublier de mentionner les pays d'Europe centrale tels que, la Bulgarie, la Roumanie, la Hongrie et l'Ukraine, l'immense Fédération de Russie, répartie sur une grande partie de l'Europe de l'Est et de l'Asie du Nord, a non seulement des ressources de plantes sauvages presque infinies mais aussi de vastes zones de terres cultivées. Le continent asiatique avec la diversité de ses climats semble être le plus important producteur d'huiles essentielles. La Chine et l'Inde jouent un rôle

majeur suivies de l'Indonésie, le Sri Lanka et le Vietnam. Beaucoup d'huiles essentielles uniques et insolites proviennent de l'immense continent australien et de ses voisins : la Nouvelle-Zélande et la Nouvelle-Calédonie. Les principaux pays producteurs d'HE en Afrique sont le Maroc, la Tunisie, l'Egypte, l'Algérie et la Côte d'Ivoire. Les pays qui jouent un rôle mineur sont l'Afrique du Sud, le Ghana, le Kenya, la Tanzanie, l'Ouganda et l'Ethiopie. Les plus importantes îles productrices d'épices : Madagascar, les Comores, Mayotte, la Réunion sont situées le long de la côte Est du continent africain. Le continent américain est également l'un des plus grands producteurs d'huiles essentielles. Les États-Unis, le Canada et le Mexique possèdent une richesse en matières végétales naturelles et aromatiques. En Amérique du Sud, les huiles essentielles sont produites au Brésil, en Argentine, au Paraguay, en Uruguay, au Guatemala, et dans l'île d'Haïti. Outre les principaux pays producteurs d'huiles mentionnés ci-dessus, il y en a beaucoup d'autres, moins importants, comme l'Allemagne, Taiwan, le Japon, la Jamaïque, et les Philippines. La Figure 18 montre les principaux pays producteurs d'huiles essentielles à travers le monde (2008).

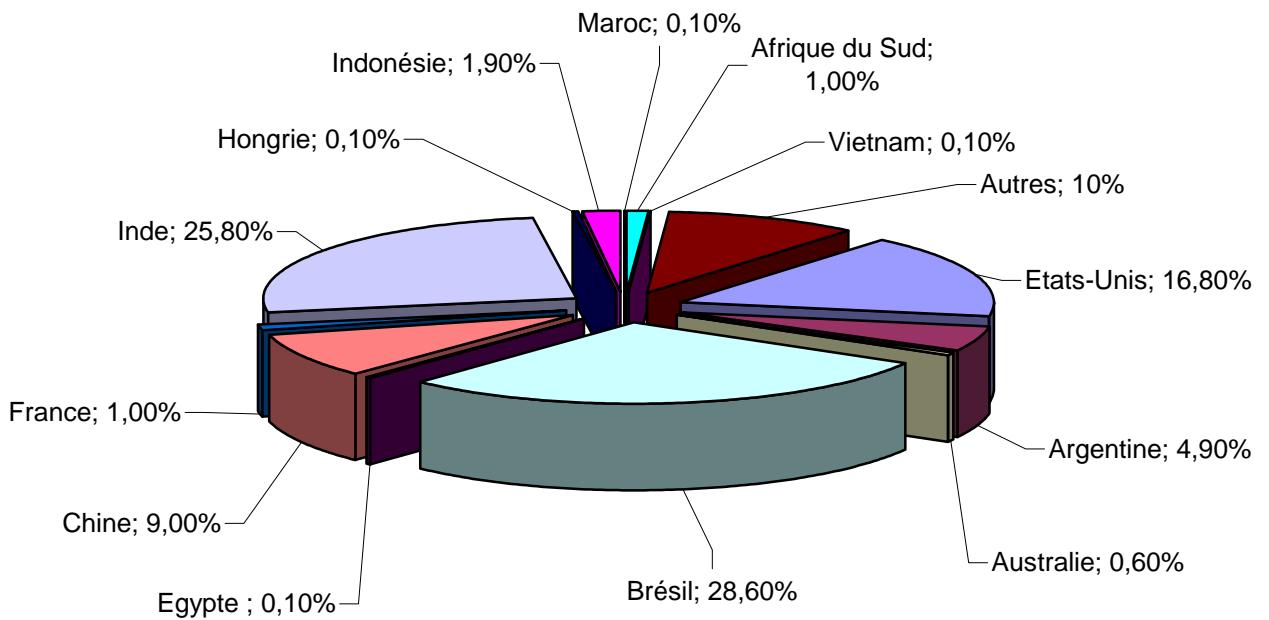


Fig. 18 : Répartition des taux de production d'HE (en parties estimées) par pays à travers le monde durant l'année 2008 (Lawrence, 2009).

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

Comme la récolte manuelle s'est avérée d'un coût trop élevé sous les conditions européennes, et que des améliorations très nettes ont été apportées dans la conception de machines de récolte, seules les cultures pour les HE qui se prêtaient à la récolte mécanique ont continué à être poursuivies en Europe. Au début des années 1990, même les récoltes en plantes aromatiques en Afrique du Nord se sont avérées très coûteuses et les centres de ces cultures ont dû être délocalisés en Chine et en Inde. A l'heure actuelle, les méthodes manuelles ont tendance à s'avérer trop coûteuses même en Chine. De ce fait, actuellement, seule l'Inde demeure un centre de développement des cultures de plantes à parfum (Lawrence, 2009).

CHAPITRE II

Les Agrumes

1 – Introduction

Les agrumes sont des baies modifiées ou ont une forme spécialisée de baie (*Hesperdium*) résultant d'un ovaire simple. En plus du genre *Citrus*, nous observons cinq genres supplémentaires de ce type de fruit : *Poncirus* (orange trifoliée), *Fortunella* (le kumquat qui est mangé tel quel avec sa peau), *Microcitrus*, *Eremocitrus*, et *Clymenia* dans la sous famille des *Aurentioideae* et appartenant tous à la famille des *Rutaceae*.

La taille des agrumes s'étend d'environ 2,25 cm pour le kumquats (espèce de *Fortunella*) à plus de 20 cm de diamètre pour le pomelo (*C. grandis*). La forme est également variable : aplatie (pour le pamplemousse, les mandarines et les tangerines), globuleuse à ovale (sphérique ou presque pour les oranges douces), oblong (pour les citrons (*C. limon*) et cédrats (*C. medica*)), et sphérique pour les limes (*C. aurantiifolia*).

L'écorce (ou la peau) devient dure comme du cuir une fois déshydratée et elle se fragilise et se casse sur son pli lorsqu'elle est turgide. Généralement, les fruits ont 8 à 16 segments. Les pamplemousses et les pomelos ont 17 à 18 segments. Les graines ou pépins changent en nombre de zéro dans quelques cultivars à beaucoup, menant au fruit plein de pépin. La lime de Tahiti (*C. latifolia*) et les oranges navelle peuvent s'appeler vraiment aspermes (sans pépins) et n'avoir presque aucun graine alors que le pamplemousse et le pomelo ont 40 à 50 graines. La taille et la forme des graines changent également considérablement parmi les espèces.

2 – Origine et histoire des agrumes

L'histoire des agrumes, d'après Webber et al. (1967), remonte à 4000 ans avant J-C. où le cédratier a poussé en Mésopotamie. La plupart des types d'agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour des montagnes de l'Himalaya et du Sud-Est Asiatique.

La première mention écrite sur les agrumes se trouve dans la littérature Sanskrit environ 800 ans avant J-C. La culture des agrumes a commencé en Chine probablement 500 ans avant J-C. Le cédrat est le premier agrume introduit en Europe par Theophrastus en 310 avant J-C. Les botanistes grecs qui suivirent Alexandre le Grand dans ses conquêtes, ont découvert le cédratier en Perse et l'ont baptisé « Pomme de midi ». Le cédrat fut d'abord utilisé comme parfum et comme insecticide. Plus tard, il fut jugé comestible lorsqu'il était correctement préparé. Les romains ont importé les oranges et les citrons de leur province comme un luxe couteux pour leurs banquets. Les plantes qu'ils cultivaient à Rome ont survécu mais portaient peu de fruits.

Au 10^{ème} siècle, les conquérants arabes réintroduisent le cédrat en Europe et introduisent de nombreuses nouveautés tels que le citron et l'orange amère (bigaradier). Ces fruits ont été répartis autour de la méditerranée orientale, l'île de Sicile, le Nord d'Afrique jusqu'au Sud de l'Espagne (zone de Séville vers 1150). Aux XI et XII^{ème} siècles et de retour de Jérusalem, les Croisés propagent en Europe occidentale l'utilisation et la culture du citron, du bigaradier et de la lime.

Les grands navigateurs, ont non seulement élargi notre vision du monde mais également joué un rôle important dans la diffusion des agrumes. C'est lors de son deuxième voyage que Christophe Colomb introduisit en 1493 le citron et la lime dans l'île d'Hispaniola (Haïti). Vasco De Gama découvreur de la route de l'Inde introduit en 1494 l'orange douce dans le Portugal.

C'est par hasard que ces navigateurs, lors des grands voyages, découvrent le rôle de la vitamine C présente dans le citron comme moyen de lutte contre le scorbut. Depuis ce temps là les agrumes partent à la conquête du monde. Les premières plantations dans le continent américain furent introduites sur la côte de l'actuel Mexique en l'an 1518, ensuite au Brésil en l'an 1540, en Floride en 1565, en Caroline du Sud en 1577, au Pérou en 1609, en Arizona en 1707, en Australie en 1718, en Californie en 1769 et au Texas en 1890.

Le dernier agrume arrivé en Europe fut le mandarinier au début du 19^{ème} siècle. Depuis lors, il est devenu l'un des agrumes les plus populaires et une source de développement continu.

3 – Caractéristiques et description des agrumes

Les agrumes ont des feuilles persistantes, caractère d'adaptation à des hivers peu rigoureux. Les agrumes sont en principe cultivés autour de l'équateur, du 40° Nord au 40° Sud (Figure 19). On les rencontre par conséquent en priorité dans les climats de type méditerranéen.

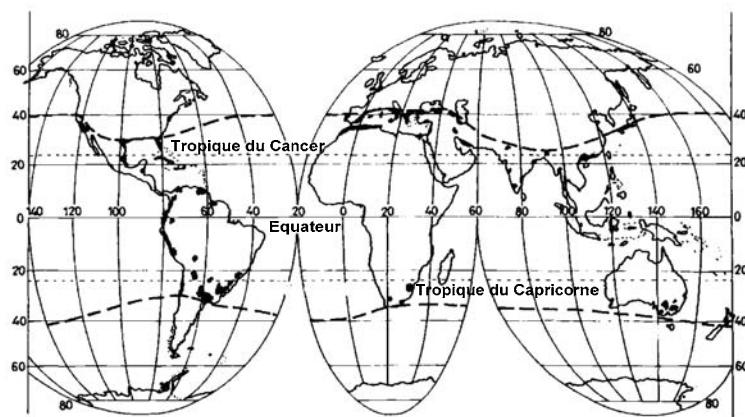


Fig. 19 : Limites climatiques de l'agrumicole et les principales régions productrices dans le monde (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

Tous les fruits des citrus cultivés ont presque la même structure : l'écorce, partie non comestible du fruit est peu développée chez les oranges, les mandarines et les clémentines. Elle constitue en revanche la majeure partie du fruit des cédrats ou du pamplemousse. La pulpe, partie comestible, est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus et qui sont regroupés en quartiers pouvant varier de 5 à 18 (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes (Figure 20) :

- Une peau ou une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (du jaune à l'orange), plus connue sous le nom d'épicarpe (ou *flavedo*), qui recouvre le fruit et le protège des dommages. Ses glandes oléifères contiennent des huiles essentielles qui donnent au fruit son odeur caractéristique.
- Un mésocarpe (ou *albedo*) blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.
- La partie interne, constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et al., 2010).

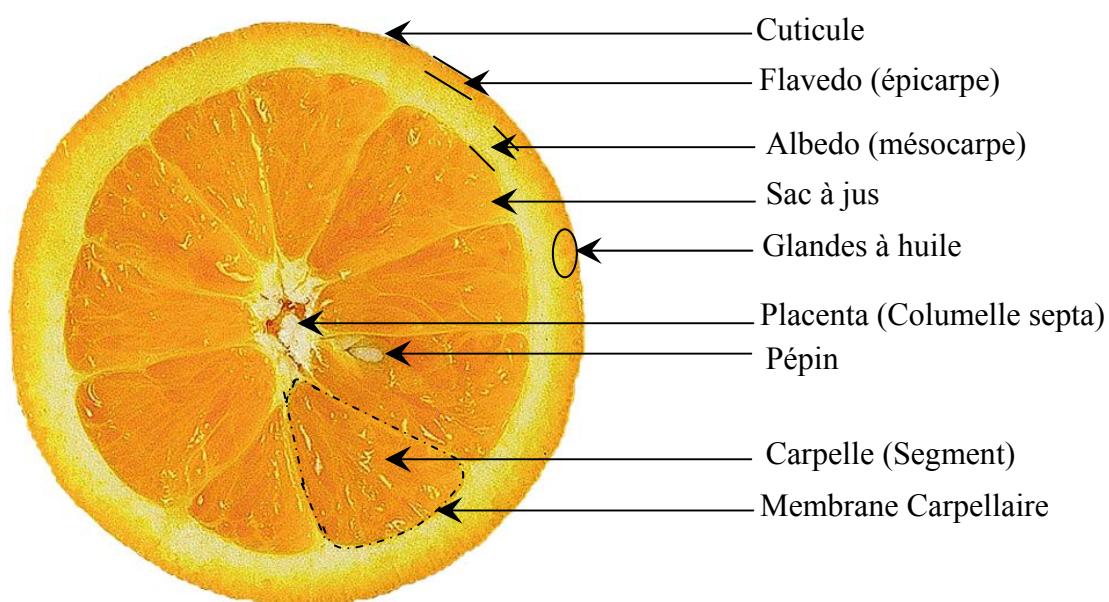


Fig. 20 : Coupe transversale d'une orange (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et al., 2010).

4 – Nouvelle taxonomie des agrumes

Depuis plus de 400 ans, les agrumes ont été source d'intérêt des botanistes du fait que tous les agrumes s'hybrident facilement. Les premières tentatives de classification, menées par Volkamer, Linnaeus, Gallesio et Riso, étaient basées sur l'apparence, la forme de la plante, le tronc, les feuilles et les fleurs, etc.... Ces paramètres continuent d'être utilisés aujourd'hui. Toutefois, au début du XX^{ème} siècle, d'éminents botanistes d'agrumes comme Swingle et Tanaka ont utilisé des méthodes d'analyse et de mesure précises pour arriver à des conclusions scientifiques.

Actuellement, des travaux menés par Mabberley (1997), Mabberley (2008) et Shu et al. (2008), ont donné naissance à une nouvelle classification des agrumes, où seulement trois espèces d'agrumes furent retenus : cédrat, pomelo et mandarine, celles-ci intervenant dans la genèse de plusieurs hybrides comme suit :

- ***Citrus medica* L. (Cédrat)** impliqué dans la formation de 4 hybrides :
 - *Citrus x limon* (Cédrat x Orange amère) : Citron et ses hybrides comme citron Volkamer et Meyer et lime de Palestine.
 - *Citrus x jambin* (Cédrat x mandarine) : Citron âpre et ses hybrides similaires comme lime Rangpur, lime mandarine et des types comme 'Otaheite'.
 - *Citrus x aurantifolia* (Cédrat x Citron x Ichang papeda) : Lime (lime mexicaine) et lime Bearss (Lime x Citron).
 - *Citrus x bergamia* (Cédrat x Orange amère) : Bergamote, considérée comme un citron issu d'un croisement entre le cédrat et l'orange amère.
- ***Citrus x maxima* Burm. (Pomelo)**, impliqué dans la formation de trois hybrides du pomelo :
 - *Citrus x aurantium* (Pomelo x Mandarine) : Bigaradier (orange amère), ayant hérité de plus de caractéristiques du pomelo que de la mandarine.
 - *Citrus x sinsensis* (Pomelo x mandarine) : Orange douce, ayant hérité de plus de caractéristiques de la mandarine que du pomelo. Ce groupe comprend également tous les croisements d'oranges, de mandarines et de pomelos comme les Tangors, l'Ortanique, les Tangelos et leurs rétro-croisements comme Page et Nova.
 - *Citrus x paradisi* (Pomelo x orange) : Pamplemousse.
- ***Citrus reticulata* Blanco** : Mandarine, avec les variétés, Satsuma, Clémentine et Tangerine.

5 – Différentes variétés d'agrumes

Il existe différentes variétés de Citrus, agrumes consommés et utilisés industriellement partout dans le monde :

Les Oranges ; Les Bigarades ; Les mandarines ; Les citrons ; Les Limes ; Les Cédrats ; Les pomelos ; Les pamplemousses ; Les cambavas ; Les Kumquats.

5.1 – Les Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

5.1.1 – L'oranger et sa culture

D'une hauteur de 2 à 3 m et d'une durée de vie de 300 à 400 ans, les orangeraines prospèrent dans les régions tempérées disposant d'un hiver doux. Ils ont besoin de beaucoup de soleil, de chaleur et d'eau. La différence de température entre l'été et l'hiver et entre le jour et la nuit est importante pour le développement correct de la saveur et de la couleur.

5.1.2 – L'orange

Au 17^{ème} siècle, son appellation était Orange du Portugal, Orange douce et le plus populaire Orange de la Chine. Depuis, son nom scientifique est devenu *Citrus sinensis* (agrume chinois). Elle représente l'espèce commerciale de *Citrus* la plus importante dans le monde.

5.1.3 – Composition

L'orange contient en moyenne 12 % de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C (80mg/100g), vitamines P, B₁, B₉, E, provitamine A. Riche en calcium (40 mg /100 g), riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion.

5.1.4 – Les Variétés

D'après la nouvelle classification des agrumes, il y a 5 groupes d'oranges douces :

A – Oranges précoces douces, blondes et oranges communes : Ambersweet, Berna, Cadenera, Castellana, Comuna, Hamline, Jaffa (Jaffa de Florida), Jincheng, Mars, Parson Brown, Pineapple (pomme de pin), Rotuna Island, Salustiana, Shamonti (Jaffa de Palestine), Trovita.

B – Orange de Valence (variétés juteuses) : Valencia, Campbell Valencia, Valencia Panachées Cotidan, Cutter Valencia, Delta Valencia, Dom Joao, Frost Valencia, Harward Late Valencia, Midknight Valencia, Olinda Valencia, Valencia Late.

C – Oranges Navel

C.1 – Oranges Navel précoces : Atwood, Fisher, Navelina, Skagg's bonanza, Thomson Zimmerman.

C.2 – Navel mi-saison : Caracara, Fukumoto, New Hall, Spring, Washington Navel.

C.3 – Navel tardives : Autumn Gold, Barnfield, Chislett, Lane late, Navel Late, Powell, Ricalate, Rhode Navel, Wiffen.

D – Hybrides d'orange douce : Chironja, Nucellar embryony, Poorman orange

E – Oranges sanguines

E.1 – Oranges légèrement sanguines : Caracara, Caracara panachée, Maltaise sanguine, Rhode Valencia rouge, Ruby, Vainiglia sanguigno, Washington sanguine.

E.2 – Oranges complètement sanguines : Delfino, Doble fina, Entrefina, Sanguinello, Sanguinello a Pignu, Sanguinello Moscato, Sanguinello Moscato di Cuscuna.

E.3 – Oranges profondément sanguines : Bream Tarocco, Moro, Sanguinelli, Smith Valencia rouge, Tarocco, Thermal Tarocco.

5.1.5 – Utilisation

En cuisine : écorces d'oranges confites, pâtes de fruits, glaces, eau de fleurs d'oranger, liqueurs à base d'écorces d'oranges douces et amères.

En cosmétologie : elle rentre dans la composition de nombreux parfums et eaux de toilette.

5.2 – Les Bigarades (*Citrus aurantium* L.)

5.2.1 – Le bigaradier et sa culture

Sa grande résistance au froid ne dépasse pas des températures comprises entre – 8°C et – 10°C. Très tolérant au calcaire, il s'adapte à beaucoup de sols mais craint les excès d'eau en sol lourd. Il se reproduit généralement par semis pour être utilisé comme arbre d'ornement dans les régions méditerranéennes.

5.2.2 – La bigarade

Elle est communément appelée « orange amère » mais c'est une espèce différente de l'orange douce. Des appellations plus familières telle que « Pomme du jardin des Hespérides » lui ont été données. Ce fruit est peu ou pas comestible.

5.2.3 – Les variétés

Elles se divisent en deux classes, les variétés d'oranges amères et ses hybrides :

- **Variétés d'Oranges amères :** orange amère commune ; orange de Séville ; Orange Bitterswett du Paraguay, Apepu ; Variété parfumerie Bouquetier ; Orange amère panachée, Abers feuille étroite, Orange amère Willowleaf ; Gou tou (orange amère cuir-tête) ; orange feuilles Myrtle : Chinotto.
- **Hybrides d'oranges amères :** Bergamote ; Smooth flat Séville ; Kikudaidai (*Citrus canaliculata*) ; Yama (*Citrus intermedia*) ; Karna (*Citrus karna*) ; Kithcli (*Citrus maderaspatana*) ; Miaray (*Citrus miaray*) ; Natsumikan (*Citrus natsudaidai*) ; Tusu (*Citrus neoaurantium*) ; Zadaïdai (*Citrus rokugatsu*) ; Sanbokan (*Citrus sulcata*) ; Nanshodaïdai (*Citrus taiwanica*).

5.2.4 – Utilisation

La bigarade fut appréciée dès le Moyen Age pour son écorce à odeur fortement poivrée, son parfum d'une exquise suavité et sa fleur blanche odorante. L'huile essentielle est obtenue par distillation des fleurs de bigaradier. Elle s'appellera plus tard Néroli en hommage à la princesse de Nérole (XVIII^{ème} siècle). L'importance de la bigarade réside dans l'huile essentielle qu'on peut extraire à partir des fleurs, des feuilles, des graines et de l'écorce. Ces huiles donnent l'arôme typique d'orange utilisé dans les épices, les bonbons, les liqueurs ...etc.

Certaines variétés donnent des huiles essentielles rentrant dans la fabrication des parfums, de savons renommés et de lotions après rasage. Elles trouvent également un usage en aromathérapie, et comme principal constituant des boissons gazeuses.

5.3 – Les mandarines (*Citrus reticulata* Blanco.)

Les mandarines ont été cultivées en Chine et au Japon sur une grande échelle depuis le 16^{ème} siècle. C'est le dernier agrume important arrivé en Europe au 19^{ème} siècle. En 1805, deux variétés ont été acheminées en Angleterre en provenance de la région chinoise de Canton. De l'Angleterre, ils ont été introduits dans la région méditerranéenne. En 1850, le fruit fut solidement établi en Italie.

5.3.1 – Les Variétés

Il existe plusieurs variétés de mandarines :

- Mandarine (*Citrus reticulata* Blanco.) :
 - Mandarine commune (*Citrus reticulata* « Ponkan »)
 - Clémentine
 - Tangerine

- Satsumas (*Citrus unshin*) : mandarines précoces, déjà mûres quand la peau est encore verte.
- Mandarines méditerranéennes Willowleaf (*Citrus deliciosa*): les fruits sont sphériques et aplatis aux pôles avec une peau fine, lisse, colorée en jaune orangée. La pulpe, orange clair, est juteuse, tendre, agréablement parfumée mais présentant de nombreux pépins.
- Mandarine king (*Citrus nobilis*).

5.3.2 – Principaux hybrides d'importance commerciale

Les principales variétés hybrides sont :

- **Mandarine** : *Citrus reticulata* Blanco
- **Mandarine commune** : *Citrus reticulata* ‘Ponkan’ ; Ponkan (Suntara) ; Changsha ; Pixie ; Daisy ; Gold Nugget ; Fuzhu ; antillean.
- **Clémentine** : Algérienne ; Carte noire ; Caffin ; Clemenules ; Clémentines hybrides : Fina ; Marisol ; Montreal ; Nour ; Sidi Aïssa ; Oroval.
- **Tangerines** : Beauté (Beauté d'Australie et la Retraite Gley) ; Dancy (Tangerine Rouge, Morgane).
- **Satsumas** : Premières variétés (Wase ; Miyagawa ; Okitsu ; Seto ; Miho ; Kuno). Variétés Unshū tardives (Owari ; Silverhill ; Dobashi Beni ; Kimb rough ; Aoshima). Variétés Satsuma les plus récentes (Amstrong ; Dat North ; Dart South ; Xie Shan).
- **Mandarine méditerranéenne (Willowleaf)**
- **Mandarine King** : Cambodgiens (Yellow king) ; King (de Siam) ; King Japonaise.

Les variétés hybrides issues du croisement entre les mandarines et les mandarines petit-fruits sont :

- **Tangors** : Temple ; Ortanique ; Ellendale ; Murcott ; Dwett ; Ambersweet.
- **Tangelos** : Minneola ; Pearl ; Orlando ; Sunshine ; Allspice ; Mandalo ; Wekiwa ; Ugli.
- **Hybrides Tangelo x Clémentine** : Fairchild ; Lee ; Nova (Clemenvilla) ; Oscelo ; Page ; Robinson.
- **Hybrides King x Mandarine méditerranéenne (Willowleaf)** : Encore ; Kinnow.
- **Hybrides Tangerine x Willowleaf x Tangors** : Tahoe Gold ; Yosemite Gold ; Shasta Gold.
- **Mandarines petits fruits** : Mandarine amère (*Citrus sunki*) ; Cléopâtre (*Citrus resni*) ; Shekwascha (*Citrus depressa*) ; Nasnaaran (*Citrus amblycarpa*) ; Kinokuni (*Citrus kinokuni*) ; *Citrus lycopersiciformis* ; *Citrus oleocarpa*.

5.3.3 – Utilisation

Les mandarines occupent une place de plus en plus importante dans le marché des agrumes frais, du fait que le marché mondial a considérablement changé durant les 20 dernières années avec une préférence accrue des consommateurs vers des mandarines sans pépins, savoureuses dotées d'une peau de belle couleur d'un épluchage facile. Par conséquent, les mandarines sont désormais le plus grand secteur de l'industrie des agrumes frais dans le monde. Le nombre de variétés de mandarines commercialisées est presque égal au nombre de tous les types d'agrumes horticoles.

5.4 – Les Citrons « *Citrus limon* (L.) Burm f. »

L'arbre d'une hauteur de 3 à 4 m, et d'une durée de vie d'environ 40 ans, supporte une température minimale de -2°C. Il produit de 30 à 40 t/ha. Les fruits sont juteux, acides et très parfumés. Les plus estimés sont dits « première fleur » (primofoiri) (récolte d'octobre à décembre) et « seconde fleur » (mars, avril). Ils se conservent de 6 à 8 mois.

Ils sont riches en sels minéraux et en vitamines C (52 mg / 100g) et P, en acides organiques, en sélénium, en fibres... Le citron est reconnu pour ses propriétés diététiques (35 kcal/100g). Il renferme du calcium à un taux relativement élevé (25mg/ 100g). Le jus de citron contient essentiellement trois acides : malique, ascorbique et citrique.

Les principales variétés sont : Bears sicilienne ; Berna verna ; Eureka ; Eureka panachée (citron de chair rose) ; Genova ; Interdonato ; Lisbonne ; Monachello ; Primofiori Fino, Mesero ; Santa Teresa ; Citron sans pépins ; Villa Franca.

Les principaux hybrides sont : Lemonime ; Citron Volkamer (*Citrus volkameriana*) ; Limetta (*Citrus limetta*, Citron doux de la Méditerranée) ; Millsweet limetta ; Citron Poire (*Citrus lumia*) ; Pomme d'Adam (*Citrus lumia var.*) ; Citron Galgal (*Citrus pseudolimon*) ; Citron Pondersa (*Citrus pyriformis*) ; Karna (khatta) (*Citrus karna*) ; Citron Rough (*Citrus jambhiri*) ; Vangasay (*Citrus jambhiri* 'Vangasay') ; Lemmandarin (citron mandarine) ; Lemonange ; Citron Meyer (*Citrus meyerii*) ; Citron neige (*Citrus kulu*) ; Yuzu (*Citrus junos*).

Les citrons ne sont pas consommés frais, mais ils peuvent être présents sur toutes les tables autour de la méditerranée indépendamment du fait qu'on sert de la viande, de la volaille ou du poisson. Le jus de citron est pressé pour parfumer toute grillade ou frites. En cuisine, c'est le zeste du fruit qui est recherché. Le citron pelé ou finement graté donne sa propre saveur qui est très prisée en cuisine et en patisserie, pour la fabrication de la limonade. Le jus de citron est également utilisé pour chasser les fourmis et permet de conserver les fruits et les légumes qui

s'oxydent facilement à l'air. La pulpe restant après extraction du jus commercial est une importante source d'huile essentielle, de pectines et d'acide citrique qui sont utilisés pour des formulations alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

En cosmétologie, le citron est utilisé pour resserrer les pores, il passe pour éclaircir la peau, résorber les comédon et s'utilise en masque antirides ou pour donner de l'éclat aux cheveux.

En médecine, il est utilisé comme antiseptique naturel mais il est aussi connu pour d'autres actions : anti-rhumatismale, anti-scorbique, anti-fatigue, diététique, digestive, expectorante, contre les effets causés par les allergies....

En parfumerie, il entre dans la composition de nombreux parfums.

5.5 – Les Limes « *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle »

La Lime est un petit citron vert, qui peut cependant devenir jaune et être confondu ainsi avec les citrons jaunes. Il s'agit d'une collection variée de certains types les plus acides d'agrumes. Les limes sont parmi les plus petits agrumes cultivés commercialement dont les variétés les plus importantes sont : Lime mexicaine (lime commune, lime clé) ; Lime persique ; Lime kaffir ; Lime italienne ; Lime indienne ; Lime douce Mary Ellen ; Citron Rough ; Vangassay ; Lime mandarine (citron de Canton) ; Lime Rangpur ; Lime Otaheite ; Lime Kusae ; Lime Gingembre (Ada Jamir) ; Lime Winged Blacktwig ; Calamondin.

Les limes sont rarement consommées comme fruits frais. Elles sont pressées pour les jus, et peuvent être utilisées en cuisine et dans l'industrie agroalimentaire : Ecorces de fruits confites, sorbets, cocktails, ...

5.6 – Le Cédrat « *Citrus medica* L.»

Arbre de 3 à 4 m de haut, ses branches sont épineuses et ses fleurs sont présentes toute l'année, en même temps que les fruits. Les jeunes rameaux sont de couleur pourpre chez les espèces à chair acide et de couleur verte chez les espèces à chair douce. On protège les cédratiers du vent avec des haies de cyprès pour éviter que les fruits ne soient piqués par les épines des branchages. Sa récolte s'effectue entre le mois de septembre et le mois de novembre. L'arbre est très sensible à la fois au gel, à la chaleur extrême et à la sécheresse. Les zones les plus importantes de culture sont la Sicile, la Corse, la Crète et quelques petites îles côtières de l'Italie, de la France et de la Grèce.

Le cédrat est un fruit ovale et verruqueux. L'écorce du fruit est très épaisse, jaune pâle et laisse peu de place à la pulpe. L'essence du zeste évoque l'odeur du cèdre. Les fruits produits peuvent

être très gros et atteindre plusieurs centaines de grammes. Les noms de famille Zitrone ou Citroën proviennent de vendeurs de cédrats.

Les importantes variétés sont : Bajoura (Cédrat musqué) ; Balady (Chazon Ish) ; Halperin (Chazon Ish) ; Lefkowitz (Chazon Ish) ; Cerveau ; Braveman ; Kivelevitz ; Main de Buddha (cédrat doight) ; Cedruna ; Corsien (cédrat de commerce) ; Diamante yanover ; Etrog (Cédrat grec) ; Italien ; Mexicain ; Marocain ; Odorata ; Sicilienne ; Yémne (Temoni) ; Yunnan ; Khobs el Arsa.

Les principaux produits du cédrat sont : les confitures, les jus, les boissons gazeuses, la Cédratine de Corse (liqueur), l'eau de fleur de cédrats, les fruits confits, fabriqués essentiellement en France, en Angleterre et aux Etats-Unis.

5.7 – Les Pomelos « *Citrus maxima* »

Cet agrume provient de l'Asie du Sud. Il pousse d'une façon sauvage en Malaisie. Le pomélo fut introduit en Chine au cours du dernier siècle avant J-C. Il arriva aux Caraïbes à la fin du 17^{ème} siècle quand le capitaine Shaddock a apporté des graines, provenant des îles malaises et les a laissées à la Barbade en pensant que le climat était assez chaud. De là, il s'est propagé à la Jamaïque et à Porto Rico. Sous des conditions favorables, le fruit peut avoir 30 cm de diamètre et peser plus de 3 kg lorsqu'il est bien mûr. L'écorce est épaisse et difficile à pelier. Le fruit n'est pas très juteux ni acide ; comparé aux autres agrumes, il peut être très doux.

Le pomelo est le plus grand agrume ; l'arbre peut atteindre 15 m de haut. C'est une espèce sensible au froid. Les principaux pays producteurs sont les Etats-Unis, la Chine, le Japon, la Thaïlande, le Mexique et Israël.

Il est riche en vitamine C : 37 mg /100 g. Sa saveur amère est due à des substances originales : narrigosides, hespérosides et surtout limonoïdes. Son utilisation réside en tant que fruits frais, fruits confits, pâtes de fruits, usage pharmaceutique. Les pépins riches en pectines sont utilisés dans les confitures pour une « bonne prise ».

Les plus importantes variétés existantes sont : Chaudler ; Cocktail ; Cuban Shaddock ; Hirado Buntan ; Miel ; Jaffa rouge ; Mato Buntan ; Pomelit ; Reinking ; Siamese sweet ; Sweetie ; Tahitian sarawak ; Thong Dee ; Valentine ; Ugli.

5.8 – Les Pamplemousses « *Citrus paradisi* (Burm.) merril »

Lors du retour du capitaine Shaddock en Angleterre en 1700, après la conquête de territoires du Pacifique, ce dernier avait laissé quelques graines de pomelo dans l'île de la Barbade. Les arbres

de pomelo se sont alors croisés par pollinisation avec un oranger local et cet hybride a produit le premier pamplemousse. Depuis, sa culture s'est propagée aux autres îles des Caraïbes et en Jamaïque. La production commerciale de ce nouveau produit a commencé en Floride au 19^{ème} siècle.

C'est le fruit du petit déjeuner par excellence ; son jus a augmenté de popularité surtout après sa promotion en tant que boisson diététique. Le pamplemousse peut être divisé en trois grandes catégories selon la couleur de sa chair, son jus et la peau :

- Les variétés jaunes ou de couleur pâle comprennent : Duncan, Marsh, Oroblanco, Goldens, Whenney, Sweetie et Meogold.
- Les variétés les plus courantes sont de couleur rose : Henderson Ruby, Marsh ruby, Ray Ruby, Red Ruby, Thompson et Foster.
- Les pamplemousse montrant souvent une teinte rouge plus foncée sont les suivants : Star Ruby, Red Ruby, Ray, Rio, Rio Star, Red Rio, Sunrise et Jaffa Sunrise.

5.9 – Les Kumquats « *Citrus japonica* Thunb.»

Désormais son nom scientifique n'est plus *Fortunella japonica* Swingle donné en 1915. Il est remplacé par *Citrus japonica* Thunb., nom ré-attribué par Mabberley à l'original en 1998.

Le nom Kumquat (Cumquat) est censée provenir de l'ancien nom chinois connu, *le Menton Kan*, qui se traduit par : "Orange d'or". Il est cultivé depuis des siècles au Japon c'est pour cela qu'il lui est attribué le terme (*japonica*) dans son nom scientifique.

Le Kumquat est un arbuste de petite taille, mais certains spécimens sont aussi grands que les orangers. Ils sont résistants au froid (-15°C)

Les fruits de petites tailles, sont de couleur rouge orangée avec une chair peu juteuse et contenant de gros pépins. C'est le seul agrume qui se mange avec sa peau.

Les différentes variétés trouvées sur les marchés sont : Nagami (Kumquat ovale, à fruits oblongs) ; Centennial panaché ; Nordmann (Sans pépins) ; Marumi (rond) ; Meiwa (doux) ; Hong Kong (le plus petit agrume vrai) ; Fukushu ; Malayan.

6 – Transformation des agrumes

Dotés d'arômes qui ne sont seulement qu'un de leurs produits, les agrumes (*Citrus*) sont un bon exemple de transformation des produits agricoles à grande échelle qui utilise une approche de raffinerie. Une gamme de culture d'agrumes est transformée pour produire des huiles essentielles à double usage aussi bien comme arômes que comme ingrédients de parfum. Il

s'agit notamment de la bergamote, du pamplemousse, du citron, de la lime, de la mandarine, des oranges douce et amère.

L'industrie de la transformation des oranges dans le monde entier a un chiffre d'affaires de plus de 2 milliards de dollars par an. Plus de 400 à 500 millions d'arbres sont cultivés, principalement au Brésil et en Floride, avec respectivement environ 150 et 60 millions d'arbres, et quelques 75 000 tonnes /an de *d*-limonène et d'huile d'orange produites à partir du fruit et également des huiles essentielles spéciales telles que les huiles de petitgrain et de néroli. Ces chiffres donnent une indication de la taille impressionnante de l'industrie (Bovill, 1996), surtout quand on considère que le rendement de *d*-limonène à partir du fruit ne représente que 0,27% seulement, comparativement à un rendement de 53% pour le jus.

Les oranges sont pressées pour en extraire le jus, qui est concentré par évaporation jusqu'à environ 5 à 6 fois son poids avant d'être expédié. La peau d'orange restante est ensuite soumise à pression ou à être râpée pour en extraire la soi-disante « huile pressée à froid » ou "essence d'agrumes", source d'arômes et de nombreuses molécules utiles au parfum. Ces terpènes oxygénés constituent essentiellement une minorité de l'huile, qui est essentiellement composée de limonène et d'autres hydrocarbures terpéniques. Puisque l'oxydation des terpènes peut donner un mauvais goût, l'objectif majeur de la production d'huiles d'agrumes est de réduire sa teneur en hydrocarbures. La méthode traditionnelle est la distillation fractionnée suivie d'un lavage. Il s'agit de prendre une huile concentrée de nombreuses fois et directement la dissoudre dans une solution eau-éthanol. Bien que la distillation soit bon marché, certains constituants aromatiques volatils sont perdus. Une certaine dégradation thermique se produit, et les hydrocarbures sesquiterpéniques ne sont pas éliminés en totalité et restent donc encore disponibles pour une éventuelle oxydation (Cheetham, 2010).

6.1 – Co-produits de la transformation des agrumes

Les produits résultant de la transformation d'agrumes sont les jus de fruits, les huiles essentielles et la peau. Cette dernière, avec la pulpe et les graines, constituent les résidus industriels et comptent pour 40 – 60 % du poids de la matière première. L'utilisation de ce résidu est une exigence fondamentale de l'industrie de transformation de fruits, non seulement pour des raisons économiques, mais aussi pour réduire l'impact environnemental grave que cela pourrait induire en cas d'abandon.

Les principaux sous-produits issus de ce résidu, sont les suivants : l'eau est le principal constituant de ce résidu et représente d'un point de vue quantitatif 80 à 85 % du poids. La matière sèche est constituée principalement de sucres solubles (glucose, fructose, et

saccharose, et de faibles teneurs de pentoses), de sucres insolubles (cellulose, hémicellulose, protopectine), d'acides organiques (citrique, malique, isocitrique, oxalique) et une teneur importante de flavonoïdes (hespéridine dans la majorité des espèces d'agrumes, naringine dans le pamplemousse, bergamote et bigarade, le diosmine (anologue à l'hespéridine) et ériodicitrine dans la peau de citron). Les constituants inorganiques du résidu diffèrent de ceux présents dans le jus, principalement par leur teneur élevée en calcium. Les écorces de lime, de bergamote et de citron sont principalement utilisées dans l'extraction de la pectine alors que les écorces d'autres agrumes sont presque totalement utilisées comme aliments pour animaux. Les huiles essentielles mènent à des sous-produits intéressants tels que les huiles concentrées, les huiles déterpénées et des formulations d'alcool et de *d*-limonène. Parmi les utilisations multiples de *d*-limonène, notons ses applications dans la production de résines synthétiques, son utilisation comme solvant dans la substitution des solvants minéraux et en tant que base pour la synthèse de composés aromatiques (Di Giacomo et al., 1992 ; Kesterson et Braddock, 1976). Les limonoïdes, sont des triterpènes oxydés qui sont responsable du goût amer dans le jus et dans les pépins si par inattention ces derniers sont écrasés sous les dents. Cette amertume est due à la transformation à pH acide du limonine monolactone non-amer en limonine dilactone amère dans le jus issus d'oranges navel (Rodrigo et al., 1985). Cette amertume est plus faible dans les jus issus d'orange Valencia (Sonkar et Ladaniya, 1995). Les limonides trouvent des utilisations thérapeutiques contre la cancérogène en induisant l'activité du glutathion S-transférase. Certains des limonoïdes agissent comme répulsifs contre les insectes et peuvent lutter contre les ravageurs. D'autres produits (comme la pulpe lavée, le jus de pulpe, les cellules entières de jus et des extraits de carotène) peuvent être préparés à partir de la pulpe séparée du jus brut.

6.2 – Huiles essentielles et essences

Les huiles essentielles de la famille des rutacées, notamment les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction et des espèces ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction.

Les agrumes utilisés dans la production des huiles sont présentés dans le Tableau 3. La culture d'agrumes est très répandue partout dans le monde où un climat favorable existe. Les huiles conduisant à la plus grande production comprennent l'orange, le citron, le pamplemousse, la mandarine.

La distillation des fleurs d'agrumes conduit à une huile appelée « huile essentielle de néroli » très sollicitée par les parfumeurs. L'hydrolat qui est un sous produit de cette distillation s'appelle « eau de fleur d'oranger », très appréciée tant à l'échelle ménagère qu'industrielle.

L'écorce des fruits d'agrumes contient une essence récupérée soit par distillation ou par expression à froid. Enfin, à partir des feuilles et des brindilles d'agrumes nous obtenons une huile qui porte le nom d'huile de petitgrain (Peyron, 2002).

Tableau 3 : Les plus importants genres d'huiles essentielles produits dans la famille des Rutaceae.

Nom botanique	Expressé	Distillée	Partie de la plante utilisée
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Essence de lime	Huile de lime distillée	Péricarpe, jus de fruits ou fruits écrasés
<i>Citrus aurantium</i> L., syn. <i>Citrus amara</i> Link, syn. <i>Citrus bigaradia</i> Loisel, syn. <i>Citrus vulgaris</i> Rissso	Essence de bagaradier (orange amère)	Huile de néroli, orange amère, huile de petitgrain	Fleurs, péricarpe, feuille, et brindilles (rameaux) avec quelquefois des petits fruits verts
<i>Citrus bergamia</i> (Risso et Poit.), <i>Citrus aurantium</i> L. subsp. <i>bergamia</i> (Wight et Arnott) Engler	Essence de bergamote	Huile petitgrain de bergamote	Péricarpe, feuilles, et brindilles avec quelques fois des petits fruits verts
<i>Citrus hystrix</i> DC., syn. <i>Citrus torosa</i> Blanco	Essence de lime kaffir, combava	Huile de feuilles kaffir	Péricarpe, feuilles
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Essence de lime type persan		Péricarpe
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. F.	Essence de citron	Huile de petitgrain de citron	Fleurs, péricarpe, feuille, et brindilles avec quelques fois des petits fruits verts
<i>Citrus reticulata</i> Blanco syn. <i>Citrus nobilis</i> Andrews	Essence de mandarine	Huile de petitgrain de mandarine	Fleurs, péricarpe, feuilles et brindilles avec quelques fois des petits fruits verts
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck, <i>Citrus djalonis</i> A. Chevalier	Essence d'orange douce		Péricarpe
<i>Citrus × paradisi</i> Macfad.	Essence de pamplemousse		Péricarpe

7 – Composition des HE et des essences d'agrumes

Les fruits d'agrumes ont des arômes distinctifs car ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité des substances libérées augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances

volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée et les sacs à huiles rompus.

Ces huiles volatiles sont associées aux saveurs et arômes caractéristiques des agrumes. Chimiquement parlant, il s'agit notamment d'hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes), alcools, esters, aldéhydes, cétones et acides organiques volatils (Tableau 4). Ces huiles sont généralement présentes dans l'écorce au flavédo mais se trouvent aussi dans les sacs d'huiles intégrés dans les vésicules de jus. Cependant, la quantité présente dans les vésicules à jus est plus faible que la quantité présente dans le flavédo; de même, leur composition diffère de l'un à l'autre.

Les huiles volatiles d'agrumes comprennent plus de 150 composés. Dans la plupart des cas, ces volatiles doivent être isolés et concentrés par un moyen physique tel que la distillation et/ou par un moyen chimique : extraction par solvant suivie d'un séchage. Les essences sont obtenues par pression à froid ou lors de la concentration du jus congelé d'orange, qui constitue une valeur importante en tant qu'aromatisant (Moshonas et Shaw, 1979).

Les composés volatils soufrés (sulfure d'hydrogène, sulfure de diméthyle, méthanethiol et disulfure de diméthyle) ont également été identifiés (à des concentrations de l'ordre du ppm) en employant la méthode d'extraction analytique « *Headspace* » sur des fruits d'agrumes frais. Durant une saison, la quantité de sulfure d'hydrogène diminue considérablement, le plus souvent avec l'augmentation de la fréquence des gelées nocturnes que par une voie de maturation normale. Notons aussi, que le sulfure de diméthyle peut être un facteur responsable du mauvais goût des jus d'agrumes (Shaw et al., 1981).

L'hydrocarbure monoterpénique (+)-limonène (*d*-limonène) représente une teneur de 80 à 95 % de toutes les huiles d'agrumes. Les terpènes oxygénés, environ 5 % de l'huile, fournissent des arômes propres à chaque espèce (Stanley, 1962). Il existe une variation significative de la composition des substances volatiles des espèces d'agrumes sur le plan qualitatif et quantitatif. Parmi les autres hydrocarbures se trouvent les monoterpènes : α -pinène, α -thujène, camphène, β -pinène, sabinène, myrcène, Δ -3-carène, α -phellandrène, α -terpinène, β -terpinène, p-cymène, terpinolène, p-isopropenyltoluène, et le 2,4-p-menthadiène. Les sesquiterpènes sont : le cubébène, le copaène, l'élémène, le caryophyllène, le farnescène, l' α -humulène, le valencène, et Δ -cardinene (Hunter et Brogden, 1965^a). Le valencène est l'un des plus importants sesquiterpènes (Hunter et Brogden, 1965^b).

Quantitativement, les esters ne représentent qu'une petite fraction d'huiles d'agrumes, mais ils donnent un arôme caractéristique. Les importants esters identifiés sont: le formate d'éthyle, le caprylate d'éthyle, l'acétate de linalyle, l'acétate d'octyle, l'acétate de nonyle, l'acétate

de décycle, l'acétate de terpinyle, l'acétate de géranylyle, l'éthyl-3-hydroxyhétéroxyde, le butyrate de citronellyle, le butyrate de géranylyle, l'antranilate de méthyle, et le méthyl-N-méthylanthranilate. Le butyrate d'éthyle est présent en quantité importante dans l'essence d'orange (Shaw, 1979 ; Wolford et al., 1971; Ikeda et Spitzer, 1964).

Les composés carbonylés (aldéhydes et cétones) apportent une contribution importante aux arômes d'agrumes (Stanley et al., 1961). Les aldéhydes terpéniques, néral et géranal, fournissent un arôme caractéristique des citrons et la cétone sesquiterpène, nootkatone, est un facteur majeur dans l'arôme de jus de pamplemousse (MacLeod et Buigues, 1964). La conversion du Valencène en nootkatone par oxydation du sesquiterpène en présence de chromate de tétrabutyle pour former la cétone sesquiterpénique (Hunter et Brogden, 1965^b). Les importants aldéhydes et cétones identifiés dans l'arôme d'orange sont : le 2-hexenal, le n-octanal, le n-décanal, et le géranal. Des traces d'acétaldéhyde, d'acétone, de n-butyraldéhyde, de n-hexanal, de méthyl éthyl cétone, de n-heptanal, de n-nonanal, de furfural, de méthyle hepténone, de citronellal, de n-undécanal, de n-dodécanal, de néral, de carvone, de périllaldéhyde, de piperiténone et de β-sinensal ont également été signalés.

Les composés alcoolisés sont également présents parmi les substances aromatiques volatiles d'agrumes. Les alcools prédominants de l'huile d'orange et de l'essence sont le linalol et l'octanol. D'importantes quantités de 4-terpinol et d'α-terpinol ont également été trouvées. Le méthanol, l'éthanol, le n-propanol, l'isobutanol, le n-butanol, l'isopentanol, le n-pentanol, le n-hexanol, le 3-hexénol, le n-heptanol, le méthyle hepténol, le 2-nonanol, le n-nonanol, le n-décanol, le citronellol, le nérol, le géraniol, le carvénol, l'undécanol, et le dodécanol sont présents en traces (Attaway et al., 1962; Hunter et Moshonas, 1965). Les mêmes alcools, mais avec des proportions différentes, se retrouvent essentiellement dans les huiles de citron, de pamplemousse et de tangerines (Hunter et Moshonas, 1966).

Les acides organiques volatils de l'essence de jus d'orange sont les acides acétique, n-propionique, n-butyrique, caproïque et caprique (Attaway et al., 1964). Les acides volatils présents à l'état de traces comprennent les acides isovalérique, valérique, isocaproïque, et caprylique.

Tableau 4 : Taux des constituants les plus importants des huiles essentielles issues des peaux de fruits d'Agrumes.

Constituants	Orange	Mandarine Satsuma	Tangerine Dancy	Pamplemousse	Citron	Lime (pressée à froid)	Lime (distillée)
Monoterpènes (Total)	89 – 91 (% de l'huile)	98 (% de l'huile)	- (% de l'huile)	88 (% de l'huile)	81 – 85 (% de l'huile)	69 (% de l'huile)	77 (% de l'huile)
d-limonène	83 – 90	65 – 68	87 – 93	88 – 90	72 – 80	64	60
Hydrocarbures							
α -pinène	0,5	0,8	1,0	1,6	2,0	1,2	0,8
β -pinène	1,0	-	0,4	-	7 – 13	1,2	0,8
Myrcène	2,0	2,0	1,2	1,9	2,0	-	0,8
γ -terpinène	0,1	-	3,4	0,5	10,0	22,0	0,6
p-cymène	-	2,8	0,4	0,4	-	1,9	12,0
Aldehydes	1,8 (% de l'huile)	-	-	1,2 – 1,8 (% de l'huile)	-	-	-
Heptanal	3,0 % des aldéhydes	-	-	4,0 % des aldéhydes	1,0 % des aldéhydes	-	-
Octanal	39,0	-	4,0	16 – 35	4,0	-	0,3
Nonanal	5,0	-	-	7,0	6,0	-	-
Décanal	42,0	5,0	-	43 – 53	3,0	-	0,09
Citral	0,05 – 0,2 (% de l'huile)	-	-	0,06 (% de l'huile)	1,9 – 2,6 (% de l'huile)	3,1 – 5,3 (% de l'huile)	0,3 (% de l'huile)
Alcools	0,9 (% de l'huile)	-	-	0,3 – 1,3 (% de l'huile)	-	-	-
Octanol	2,8	-	-	-	1	-	-
Décanol	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	5,3 (% de l'huile)	2	-	0 – 3 (% fraction déterpénnées)	-	-	-
Esters	2,9 (% de l'huile)	-	-	3 – 4 (% de l'huile)	-	-	-

(Source : Shaw 1979 ; Kefford et Chandler (1970) ; Attaway et al. (1968, 1967) ; Norman et al. (1967) ; Hunter et Brogden (1965) ; Ikeda et Spitzer (1964) ; Kesterson et Hendrickson (1964, 1963, 1962) ; Stanley (1962) ; Yokoyama et al. (1961)).

8 – Aspect économique

Parmi les raisons qui ont donné aux agrumes un poids économique sur la scène internationale figurent leurs bienfaits sur la santé, attribués relativement à la présence de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques (par exemple, les glycosides flavanones, acides hydroxycinnamiques) (Marchand, 2002), la vitamine C (Halliwell, 1996), et les caroténoïdes (Rao et Rao, 2007). Bien que les fruits soient utilisés principalement pour le dessert, ces derniers sont aussi des sources d'huiles essentielles en raison de leurs composés aromatiques (Chutia et al., 2009 ; Minh Tu et al., 2002). Par exemple, les saveurs de la lime sont utilisées dans les boissons, les confiseries, les biscuits et les desserts (Chutia et al., 2009 ; Dharmawan et al., 2007). De nombreux auteurs ont rapporté des propriétés antioxydantes et antiradicalaires des huiles essentielles (Sacchetti et al., 2005) et, dans certains cas, une incidence directe liée à l'alimentation (Madsen et Bertelsen, 1995). Jusqu'à présent, les études sur les composés bioactifs et l'activité antioxydante des agrumes ont principalement porté sur les fruits (écorces, pulpes et jus) et les fractions polaires (Abeysinghe et al., 2007; Gorinstein et al., 2001).

La production d'agrumes est très répandue autour du globe. Cependant, la majeure partie de la production se concentre dans certaines zones géographiques et est cultivée dans l'hémisphère Nord (environ 70 % de la production totale). Les principaux pays producteurs d'agrumes et spécifiquement d'orange durant les trois dernières années sont portés dans la Figure 21. Il s'agit du Brésil, des pays du Bassin Méditerranéen, de la Chine et des Etats-Unis. Ces pays comptent pour plus de deux tiers de la production totale d'agrumes.

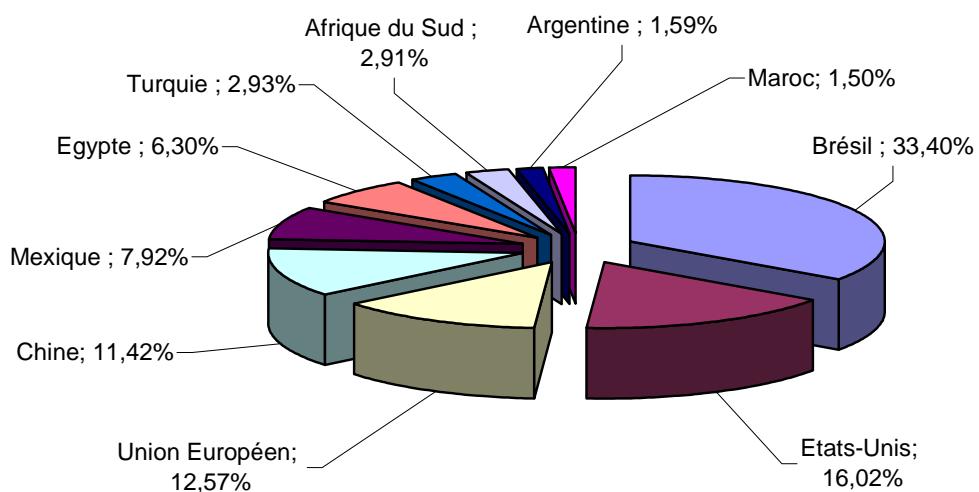


Fig. 21 : Les 10 pays principaux producteurs d'orange dans le monde durant la période 2007 – 2010 (USDA, 2010).

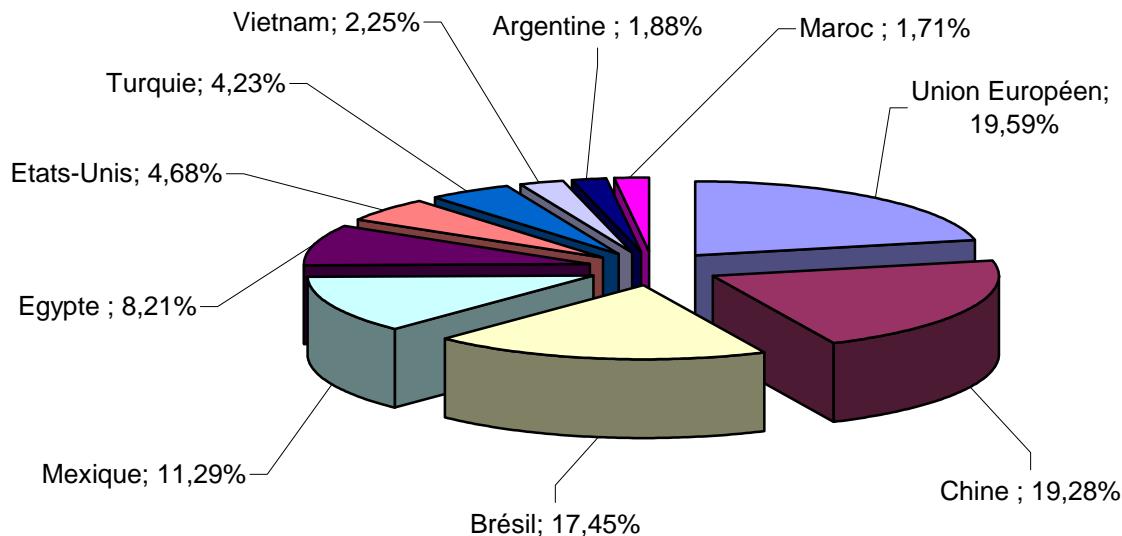


Fig. 22 : Les 10 pays principaux consommateurs d'oranges fraîches dans le monde durant la période 2007 – 2010 (USDA, 2010).

Les exportations d'agrumes frais (Figure 22) représentent environ 8 % de la production mondiale d'agrumes. La majeure partie des exportations d'agrumes frais se situe dans l'hémisphère nord et représente environ 62 % des exportations mondiales d'agrumes frais. La région méditerranéenne joue un rôle prédominant en tant qu'exportateur d'agrumes frais, avec 60 % du volume global. La production est localisée dans 10 pays du pourtour méditerranéen (Turquie, Chypre, Egypte, Israël, Grèce, Italie, France, Espagne, Portugal et Maroc) mais se concentre surtout en Espagne, en Grèce, en Italie, en Turquie, en Israël, en Egypte et au Maroc.

Les pays de l'hémisphère sud, comme par exemple l'Argentine, l'Australie et l'Afrique du Sud ont renforcé leur présence dans le commerce mondial en fournissant aux pays de l'hémisphère nord des agrumes hors-saison. Cette situation a été favorisée par les améliorations apportées tant au niveau du stockage que du transport.

Les fruits livrés à la transformation sont en majorité des écarts de tri du marché du fruit frais donc des sous produits au niveau du marché européen. Il s'agit de fruits qui pour des raisons diverses (calibre, défauts de peau, variétés peu appréciée, etc.) ne sont pas commercialisés, voire commercialisables pour la consommation en frais. Par contre, des variétés hybrides « Spécialité jus » tels que la Valencia sont destinées à la transformation au Brésil ou aux Etats-Unis (Figure 23).

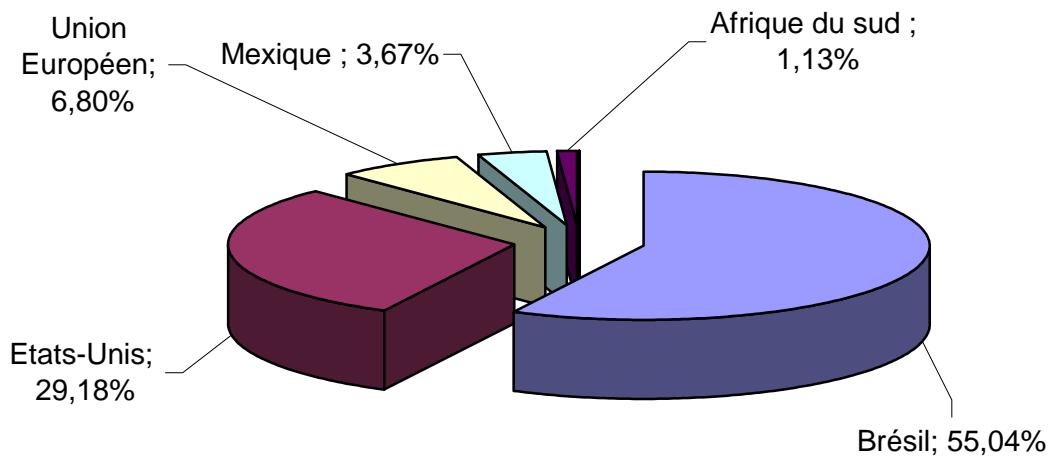


Fig. 23 : Les 5 pays principaux transformateurs d'orange dans le monde durant la période 2007 – 2010 (USDA, 2010).

D'après les statistiques des Nations Unis (2010) du marché mondial des fruits d'agrumes, le Tableau 5 regroupe respectivement les principaux pays importateurs et exportateurs des agrumes durant la dernière saison 2009/2010.

Tableau 5 : Les principaux pays importateurs et exportateurs d'agrumes dans le monde.

Pays importateurs	Valeur marchande (\$ US)	Pays exportateurs	Valeur marchande (\$ US)
France	12 507 615,00	Israël	41 137 000,00
Allemagne	12 413 000,00	Hollande	32 164 180,00
Danemark	10 414 032,00	Zimbabwe	16 445 389,00
Canada	9 501 910,00	Chine	11 545 901,00
Hollande	9 169 013,00	Inde	7 662 604,00
Autres	76 305 983,00	Autres	76 085 275,00
Total des importations	130 311 553,00	Total des exportations	185 040 349,00

(Source : Nations Unis, 2010).

9

CHAPITRE III

Le Romarin

1 – Introduction

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est un arbrisseau de la famille des Labiées, répandu sur toutes les rives de la Méditerranée (Gildemeister et Hoffmann, 1912). Il est dominant dans les communautés arbustives post-feu, principalement dans les sols calcaires. Il s'agit d'un germoir à semences obligatoire et à floraison abondante. Son caractère ensoleillé et son effort de reproduction élevé lui permettent de coloniser les paysages découverts (Sardans et al., 2005).

Le romarin fait l'objet de très nombreuses mentions historiques et légendaires. Les Anciens Grecs lui vouaient une grande vénération. On s'en servait généreusement dans toutes les fêtes, qu'il s'agisse de cérémonies nuptiales, funéraires ou de célébrations profanes. Les mariées portaient des couronnes de romarin, symboles d'amour et de fidélité, tandis que les invités recevaient des branches enjolivées de rubans de soie multicolores. On mettait aussi des brins de romarin sous les oreillers pour chasser les mauvais esprits et les cauchemars.

Les Égyptiens plaçaient des rameaux de romarin dans la tombe des pharaons afin de fortifier leur âme. Le romarin est un symbole du souvenir et de l'amitié. Les étudiants grecs s'en confectionnaient des couronnes, qu'ils portaient durant les examens pour stimuler leur mémoire. Les Romains considéraient également le romarin comme une plante sacrée, comme l'atteste le poète Horace (-65/8 av. notre ère) dans ces vers : "Si tu veux gagner l'estime des dieux, apporte leur des couronnes de romarin et de myrte".

Durant les épidémies de peste, le romarin était très populaire : On en faisait brûler des rameaux pour purifier l'air et on portait des sachets sur soi, que l'on respirait lorsqu'on passait dans les endroits touchés par cette terrible maladie. L'histoire veut aussi que la reine de Hongrie, qui souffrait de rhumatismes chroniques, ait été délivrée de ses problèmes grâce à un remède à base de romarin lorsqu'elle était âgée de 72 ans.

Dans certaines régions rurales, on fait tremper du romarin dans du vin rouge pour obtenir une boisson fortifiante. On utilise aussi le romarin sous forme d'extrait à base d'alcool pour les plaies et sous forme d'onguent ou de baume pour soulager les rhumatismes et les névralgies, tant chez les humains que chez les animaux.

Ajouté à l'eau d'un bain, le romarin stimule la circulation sanguine. Des recherches récentes (Weerakkody et al., 2010 ; Romano et al., 2009) ont démontré que l'huile de romarin avait certaines propriétés antibactériennes. De nos jours, le romarin est surtout utilisé en cuisine, entre autre, avec les viandes, comme l'agneau et le porc, mais aussi en cosmétique comme dans les

shampooings ou encore pour son odeur légère de pin dans les savons, parfums ou eaux de toilette.

L'huile essentielle de romarin est largement utilisée comme composant aromatique dans l'industrie des cosmétiques (savons, parfums, crèmes, etc.), mais aussi dans l'industrie alimentaire (boissons alcoolisées, desserts, bonbons, conservation des lipides, etc.).

2 – Taxonomie

Le romarin tient son nom du latin, *ros*, rosée, et *marinus*, de mer : allusion à son parfum et à son habitat sur les coteaux maritimes. Sa taxonomie botanique est comme suit :

Règne	: <i>Plantae</i>
Division	: <i>Magnoliophyta</i>
Classe	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordre	: <i>Lamiales</i>
Famille	: <i>Lamiaceae</i>
Genre	: <i>Rosmarinus</i>
Espèce	: <i>Rosmarinus officinalis</i> L. 1753
Noms communs	: Romarin, Encensier, Herbe aux couronnes, Rose des marins, Rose de la mer, Rose-marine
Période de floraison:	: Février à Avril
Couleur des fleurs:	: Bleu / mauve
Exposition:	: Soleil
Hauteur:	: 150 cm
Habitat et origine	: Plante vivace, arbustive, originaire des maquis, garrigues et rocailles du bassin méditerranéen, aujourd'hui répandue un peu partout sous les climats tempérés qui connaissent des hivers doux. La plante aime le plein soleil et tolère modérément la sécheresse. Sous les climats plus nordiques, on la traite comme une annuelle que l'on cultive par semis ou par bouturage, car elle ne résiste pas aux hivers rigoureux.

D'après Coste (1937), le romarin est un arbrisseau de 50 cm à 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé ; feuilles persistantes, coriaces, sessiles, linéaires, entières, enroulées par les bords, vertes et chagrinées en dessus, blanches-tomenteuses en dessous ; fleurs subsessiles, rapprochées en petites grappes axillaires et terminales ; calice en cloche, bilabié, pulvérulent, nu à la gorge, à lèvre supérieure ovale entière, l'inférieure à 2 lobes lancéolés ; corolle bilabiée, à tube saillant, à lèvre supérieure en casque, bifide, l'inférieure à 3

lobes, le moyen très large et concave ; 2 étamines, à filets saillants, insérés à la gorge de la corolle, munis vers la base d'une petite dent ; anthères linéaires, à 1 loge ; carpelles obovales, lisses.

On reconnaît facilement le romarin à ses feuilles persistantes sans pétiole (Figure 24), coriaces, plus longues que larges, aux bords légèrement enroulés, vert sombre luisant sur le dessus, blanchâtres en dessous.



Fig. 24 : Photo des feuilles, et des fleurs du romarin.

La floraison commence dès le mois de février (parfois en janvier) et se poursuit jusqu'en avril-mai. La couleur des fleurs, varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches chez *R. officinalis albiflorus*). Comme pour la plupart des Lamiacées, le fruit est un tétrakène (de couleur brune).

Il existe plusieurs espèces de romarin dans le monde : *R. officinallis*, *R. eriocalyx*, *R. laxiflorus* et *R. lavandulaceus*. *R. officinallis* est la seule espèce qui croît naturellement dans les pays du bassin méditerranéen, ainsi que dans les zones qui entourent l'Himalaya. Il a été cultivé depuis l'antiquité en Angleterre, en Allemagne, en France, au Danemark et dans les autres Pays Scandinaves, en Amérique centrale, au Vénézuéla et le Philippines (Tyler et al., 1976).

3 – Constitution d'une huile essentielle

L'huile essentielle est constituée de plusieurs molécules chimiques de synthèse naturelle. Ces molécules sont différentes selon la nature de la plante et le sol dans lequel la plante va croître (Angioni et al., 2004 ; Tucker et Maciarello, 1986), le temps de récolte (Celiktaş et al.,

2007), la partie de la plante (Flamini et al., 2002 ; Parry, 1921), la préparation de l'échantillon (McCormick et al., 2006), ainsi que la méthode d'extraction (Boutekedjiret et al., 2004). Les molécules sont formées à partir de divers atomes puisés par la plante via le sol et via sa synthèse organique. L'ensemble constitue des réactions chimiques donnant naissance aux molécules aromatiques, constituant l'huile essentielle.

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de séparation qui permet d'étudier la composition des huiles essentielles. Elle a révélé la présence de certains constituants parmi les plus abondants dans différents huiles essentielles de romarin tels que l'alpha-pinène, le 1,8-Cinéole, la verbénone et le camphre (Flamini et al., 2002).

4 – Huile essentielle chémotypée et non chémotypée

Par suite de la diversité des molécules contenues dans une huile essentielle, lorsqu'une molécule est présente en fort pourcentage, on l'appelle le "type chimique" ou "chémotype". Par exemple, la verbénone est absente dans quelques HE de romarin par contre dans d'autres, elle représente plus de 20 % de l'essence. De même, le 1,8-Cinéole est détecté avec des teneurs pouvant passer de 1 à 45 % (Sacchetti et al., 2005 ; Angioni et al., 2004 ; Flamini et al., 2002). De ce fait, les huiles essentielles de romarin sont classées en fonction de leur chémotype.

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif présent dans l'H.E. C'est l'élément qui permet de distinguer une huile essentielle extraite d'une même variété botanique mais d'une composition biochimique différente. Cette classification capitale permet de sélectionner les H.E. pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace.

La chimiotaxonomie du romarin a été déjà étudiée par de nombreux auteurs (Manunta, 1985, Falchi Delitala et Soccolini, 1980).

Tuberoso et al. (1998), ont rapporté le fait que les monoterpènes constituaient 50 % de l'huile essentielle de romarin, spécialement l' α -pinène (>30%), camphène et limonène ; alcools ≈ 7% et cétones ≈ 10 %.

Pintore et al. (2002), ont comparé les romarins de Sardaigne et de la Corse et ont pu identifier respectivement les chémotypes α -pinène, verbénone, et acétate de bornyle.

Elmrani et al. (2000), étudièrent la chimiotaxonomie de l'huile essentielle du romarin marocain provenant de différents régions. Ils définirent trois chémotypes : α -pinène (37 – 40 %), camphre (41 – 53 %), et 1,8-Cinéole (58 – 63 %). Ils étudièrent également l'influence du stade végétatif et l'espèce sur la composition de l'essence. Aucune différence n'a été enregistrée.

L'huile essentielle de romarin du Liban (Diab et al., 2002) est caractérisée par le 1,8-Cinéole ($\approx 20\%$), et l' α -pinène ($\approx 18,8 - 38,5\%$). Celle de l'Inde (Jaganmohan et al., 1997) par le 1,8-Cinéole (30 %), et le camphre ($\approx 30\%$), tandis que celle provenant du Japon (Masatoshi et Hiroaki, 1997) est caractérisée par des teneurs élevées de 1,8-Cinéole ($\approx 50\%$) et de faibles teneurs en α -pinène et en camphre ($\approx 10\%$). En outre, le romarin récolté dans le Portugal (Serrano et al., 2002) est riche en myrcène (25 %), en 1,8-Cinéole, et en camphre et est similaire aux huiles d'Argentine et du Brésil (Porte et al., 2000 ; Larran et al., 2001).

Benhabiles et Aït Ammar (2001), étudièrent les essences de deux espèces de romarin provenant d'une région de l'Est Algérien. Ils trouvèrent deux chémotypes différents : *Rosmarinus eriocalyx* à type eucalyptol (1,8-Cinéole = 42,8 %) et *Rosmarinus officinalis* à type β -Caryophyllène (13,9 %), camphre (12,1 %) et bornéol (10,1 %).

Tucker et Maciarello (1986), ont examiné les huiles essentielles de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), provenant de 23 cultivars. Ces auteurs ont montré que ces cultivars dérivaient de cinq variétés botaniques montrant de larges variations dans leur composante principale : α -Pinène (0,06 – 57,45 %), 1,8-Cinéole (3,55 – 42,69 %), Camphre (0,20 – 56,45 %), Acétate de bornyle (0,66 – 21,03 %) et Bornéol (0,40 – 14,69 %). Les essences ont alors été regroupées dans six groupes chimiques (chémotypes) :

- (1) α -Pinène > 1,8-Cinéole,
- (2) 1,8-Cinéole > α -Pinène,
- (3) α -Pinène > Camphre + Camphène > 1,8-Cinéole,
- (4) Camphre + Camphène > α -Pinène > 1,8-Cinéole,
- (5) Camphre + Camphène > 1,8-Cinéole > α -Pinène, et
- (6) Bornéol + Acétate de bornyle > Camphre.

Cette procédure est intéressante lorsqu'on utilise les huiles essentielles en aromathérapie. Le chémotype permet de différencier les propriétés thérapeutiques de plusieurs cultivars ou variétés au nom identique comme dans le cas du romarin et qui se caractérisent par les mêmes formes de feuilles, de tiges, de fleurs, de couleur, et d'odeur.

5 – Usages

5.1 – Usage médicinal (Phytothérapie)

5.1.1 – Voie externe

Pour les traitements externes (entorses, foulures, contusions, torticolis), on emploie les sommités infusés dans de l'alcool. L'extrait alcoolique lui-même agit sur les ulcères, les plaies, les

dermatoses parasitaires. La décoction aqueuse s'utilise en gargarismes (angines) et bains de bouche (aphtes), ou elle est ajoutée à des bains stimulants.

L'huile essentielle de romarin soulage les troubles rhumatismaux et de la circulation sanguine, soigne les blessures, soulage les maux de tête, améliore la mémoire et la concentration, fortifie les convalescents, combat les effets du stress et de la fatigue, traite l'inflammation des voies respiratoires et de la sphère ORL (Dias et al., 2000).

5.1.2 – Voie interne

Le romarin est un stimulant, antispasmodique, cholagogue. On l'indique pour ses qualités stimulantes dans les dyspepsies atoniques, les fermentations intestinales, les asthénies, le surmenage, les états adynamiques des fièvres typhoïdes ou muqueuses, de la grippe. En sa qualité d'antispasmodique, il est bénéfique dans la catarrhe chronique des bronches, la coqueluche, les vomissements nerveux ; c'est un bon cholagogue utilisé dans les cholécystites chroniques, certaines ascites et cirrhoses, les icteres ; c'est aussi un emménagogue (aménorrhée dysménorrhée) et un diurétique (hydropsies) (Chang et al., 1977 ; Aqel, 1991 ; Leung et Foster, 1996 ; Haloui et al., 2000), un anti-VIH (Paris et al., 1993) et anti-carcinogénique (Offord et al., 1995).

5.2 – 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 XVII^{ème} siècle et qui pourrait avoir été conçu dès le XIV^{ème} siècle, dont le romarin était un des principaux composants. Le nom vient de la reine Elisabeth de Hongrie, qui l'aurait utilisé en 1378 à l'âge de 72 ans ; l'eau lui aurait rendu sa fraîcheur à tel point que le roi de Pologne l'aurait demandée en mariage (Le Florentin, 1914, Gildemeister et Hoffmann, 1912).

Le romarin entre dans la composition de parfums surtout masculins, hespéridés aromatiques (eaux de Cologne), boisés et fugères aromatiques, ainsi que dans la formulation des pommades dermiques. Calabres et al. (2000), étudièrent la faculté des extraits de romarin à protégé la peau des lésions cutanées induites par les radicaux libres. Ils ont montré la validité réelle de la biotechnologie des antioxydants naturels dans la gestion de l'antivieillissement de la peau.

5.3 – Usage alimentaire

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 (Ponce et al., 2008 ; Georgantelis et al., 2007 ; Zivanovic et al., 2005 ;

Shylaja et Peter, 2004 ; Dorman et al., 2003 ; Sotelo-Felix et al., 2002 ; Takenaka et al., 1997 ; Richheimer et al., 1996 ; Haraguchi et al., 1995 ; Aruoma et al., 1992, 1996 ; Houlihan et al., 1985 ; Inatani et al., 1983). Il a été reporté qu'il contient y compris l'huile essentielle, des diterpènes phénoliques tels que l'acide carnosique, le carnosol, le rosmanol, l'epirosmanol, l'isorosmanol, le méthylcarnosate et l'acide rosmarinique, qui peuvent être quatre fois plus efficaces que l'action antioxydante de l'hydroxyanisole butylé (BHA) et égaux à l'action de l'hydroxytoluène butylé (BHT) (Zheng et Wang, 2001 ; Cuvelier et al., 1996 ; Houlihan et al., 1985 ; Nakatani et Inatani, 1984). En outre, le BHA et le BHT ont été suspectés d'être cancérogènes et responsables des lésions hépatiques (Wang et al., 2000). De ce fait, il y a eu une tendance de sensibilisation des consommateurs et des organismes de santé pour limiter et éviter l'utilisation des additifs de synthèse dans les produits alimentaires. Cette tendance se reflète également dans l'Union européenne qui a récemment publié la directive 2006/52/CE se référant à la nécessité de réduire l'utilisation des BHA, BHT et de nitrites (Union européenne, 2006). Ces faits montrent la nécessité pour la recherche de mettre au point l'utilisation d'additifs naturels ou d'autres méthodes afin d'étendre la durée de conservation et/ou d'améliorer la sécurité alimentaire. En ce qui concerne la prévention de l'oxydation des lipides et la croissance microbienne, une telle solution pourrait être l'utilisation d'antioxydants naturels, puisque beaucoup d'entre eux présentent aussi une activité antimicrobienne.

Le romarin est utilisé dans l'industrie alimentaire comme alternative aux additifs chimiques pour la préparation de la volaille, de l'agneau, du veau, des fruits de mer, des saucisses et salades ainsi que des soupes et chapelures. Le romarin est également utilisé comme épice dans les croustilles, les chips et des frites françaises (Moino et al., 2008 ; Georgantelis et al., 2007 ; Janz et al., 2007 ; O'Grady et al., 2006 ; Sebranek et al., 2005 ; Djenane et al., 2002 ; Sanchez-Escalante et al., 2001).

6 – Aspect économique

Le romarin est la seule plante épice commercialement disponible pour une utilisation comme antioxydant naturel dans les différentes industries en Europe et aux Etats-Unis (Bozin et al., 2007).

Les Etats-Unis sont l'un des principaux importateurs d'HE au monde. Parmi les HE importées, comme le romarin ne pousse pas naturellement sur son sol, ce pays s'approvisionne à partir des pays du bassin méditerranéen (Maroc, Espagne et Turquie), pour des prix portés dans le Tableau 6 :

Tableau 6 : Prix (\$ US/ pound) de l'huile essentielle du romarin importée par les Etats-Unis.

Provenance	Année	2005	2006	2007
Maroc/Turquie		0,56	0,59	0,60
Espagne		0,85	0,85	0,85

(Source : USDA, 2007)

Les importations des Etats-Unis en huile essentielle de romarin entre 1998 et 2002 sont illustrés comme suit dans le Tableau 7 :

Tableau 7 : Importation (en US \$) de l'HE de romarin par les Etats-Unis durant la période 1998-2002.

HE	Année	1998	1999	2000	2001	2002
HE de Romarin (\$ US)		1 503 000	1 307 000	1 105 000	1 568 000	1 635 000

(Source : USDA, 2003)

Durant l'an 2003 la somme d'argent dépensée par les Etats-Unis uniquement pour l'importation des huiles essentielles a atteint la somme de 1,3 milliard de dollars américains (USDA, 2007) ce qui montre clairement que la part de l'HE de romarin représente 0,12 % du total de ses importations en HE.



Partie Expérimentale



Matériel & Méthodes

1 – Réactifs et Solvants

Les solvants, les réactifs et produits chimiques utilisés dans les différentes investigations, ainsi que leur origine et pureté, sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques des solvants, des réactifs et des produits chimiques utilisés.

Produits chimiques	CAS	Fournisseur	Pureté	M (g/mol)
Ethanol	[64-17-5]	VWR	≥ 98 %	46,07
Pentane	[109-66-0]	Sigma-Aldrich	>99,0 %	77,15
Méthanol	[67-56-1]	VWR	≥ 99,8 %	32,04
Sulfate de sodium	[7757-82-06]	ACROS Organics	99 %	142,04
Eau HPLC	[231-791-2]	LiChrosolv®	99,99 %	18,02
Acide Formique	[64-18-6]	VWR	99,99 %	46,03
Acide acétique	[64-19-7]	VWR	99,99 %	60,05
Acétonitrile	[75-05-8]	PAI-ACS	99,99 %	
Ac. rosmarinique	[20283-92-5]	Sigma-Aldrich	≥ 96 %	360.31
Ac. Carnosique	3650-09-7	Sigma	≥ 91 %	332.43
carnosol	59557-80-2	Sigma	95 %	330.42
Luminol	521-31-3	Sigma-Aldrich	>99 %	177,16

2 – Matières premières

2.1 – Agrumes

Nous avons réalisé un échantillonnage sur les agrumes provenant de la Station Expérimentale de l’Institut des Techniques d’Arboriculture Fruitière (I.T.A.F.) située dans la région de la Mitidja à 40 km au Sud d’Alger (Boufarik, Algérie). En fonction de leurs critères botaniques mais également de leur intérêt économique, nous avons sélectionné huit variétés d’agrumes, citées dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Présentation des variétés étudiées provenant de l'ITAF de Boufarik.

Espèces	Variétés	Dénomination usuelle du fruit
<i>Citrus aurantifolia</i> (Chrism.) Swing	Lime	Citron vert
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Eurêka Citronnier Villa França	Citron
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.	Washington Navel Valancia Late Tarocco	Orange douce
<i>Citrus paradisi</i>	Marsh Seedless	Pomelo
(<i>C. deliciosa</i> Ten ou <i>C. tangerina</i> Hort. ex Tan) X (<i>C. paradisi</i> Macf.)	Tangelo Seminole	Tangelo

2.2 – Romarin

Les feuilles de romarin ont été collectées à l’Institut National Agronomique (INA) d’El-Harrach – Alger et le taux d’humidité des feuilles a été de 60,2 %.

3 – Extraction des huiles essentielles

3.1 – Extraction par Hydrodiffusion assistée par Mico-ondes et Gravité (MHG)

Les extractions par micro-ondes ont été réalisées dans un four micro-ondes ménager puis validées avec le four micro-ondes de laboratoire NEOS-GR, fruit du partenariat entre la l’Université d’Avignon et des Pays de Vaucluse (Avignon, France) et la société Milestone (Bergame, Italie) appareil enregistré sous le brevet européen EP 1 955 749 A1.

Les deux fours ont les mêmes caractéristiques :

- Cavité multimode
- Fréquence de 2,45 GHz
- Magnétrons délivrant une puissance maximale de 1000 W

Le four microondes NEOS-GR, délivre une puissance maximale de 1000 W (variable) par l’intermédiaire de deux magnétrons de 800 W fonctionnant à une fréquence de 2,45 GHz. Le temps et la température peuvent être contrôlés par des programmes pilotés par icônes sur un écran tactile situé sur le front du four, offrant ainsi un contrôle complet des paramètres de la méthode d’extraction. La cavité du four micro-ondes est contrôlée par microprocesseur avec un

système infrarouge pour un contrôle automatique des températures. L'enceinte du four micro-ondes présente une cavité multimode recouverte de polytétrafluoroéthylène (Téflon ou PTFE).

Le montage élaboré est présenté dans la Figure 25. Il est constitué d'un réacteur placé dans l'enceinte du four micro-ondes raccordé au montage situé à l'extérieur de la cavité du four par le biais d'une colonne assurant la liaison avec la partie du montage. Le système de réfrigération est composé d'un réfrigérant à serpentin, orienté verticalement afin de, respecter l'orientation initiale du flux provenant du réacteur, d'assurer une condensation et un refroidissement maximal du fluide hydrodiffusé saturé en molécules aromatiques et d'obtenir un liquide le moins chaud possible pour éviter une dégradation thermique éventuelle des molécules aromatiques. Ce système de refroidissement est raccordé à son tour à un vase florentin où l'huile essentielle se sépare de la phase aqueuse par différence de densité.

Le protocole expérimental de l'extraction par hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité s'articule autour de trois points importants :

- La qualité de la matière végétale traitée,
- La puissance micro-ondes appliquée,
- La durée totale de l'extraction.

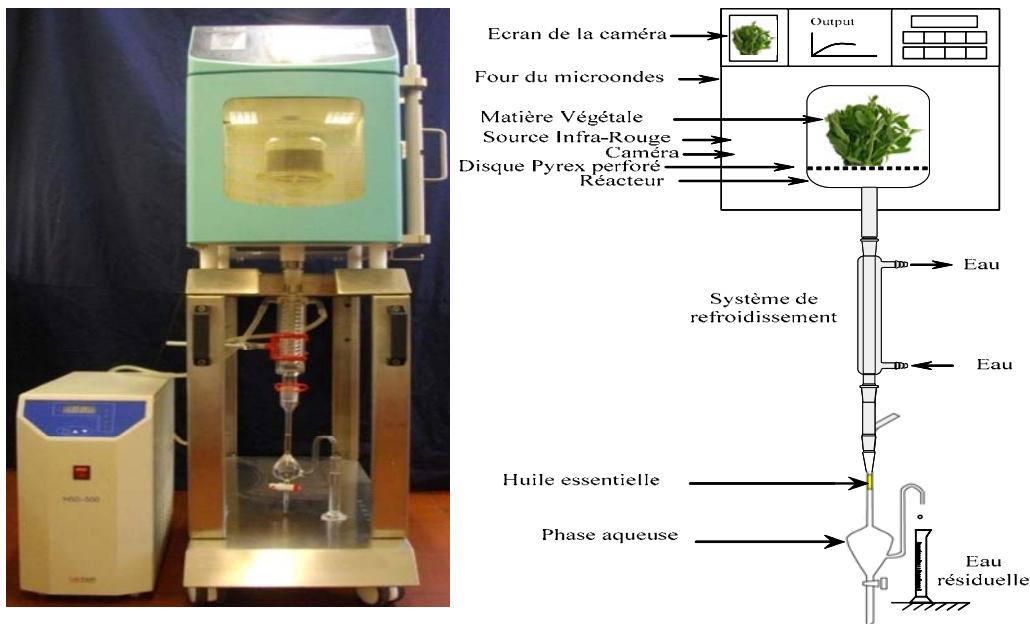


Fig. 25 : Photo et Schéma du montage expérimental de la MHG.

3.2 – Extraction par hydrodistillation (HD)

Une hydrodistillation (Figure 26) est assurée grâce à un appareil de type Clevenger, où 500 g de matière végétale sont introduites avec 3 L d'eau dans un ballon de 5 L. Après installation et fermeture du montage, la mise en marche du chauffe ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée.

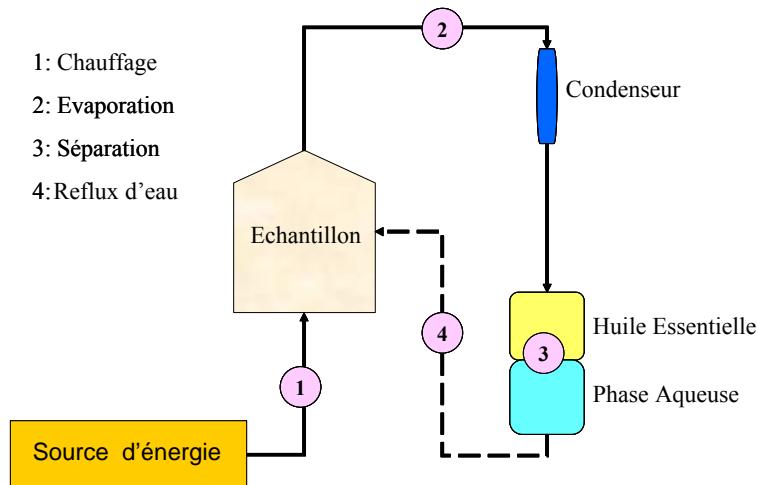


Fig. 26 : Schéma du montage d'hydrodistillation.

La vapeur chargée d'huile essentielle arrive dans le condenseur. La durée totale de l'extraction est estimée à 3 h (jusqu'à ce qu'on obtienne plus d'HE). L'huile essentielle se distingue de l'hydrolat (eau aromatique) par sa différence de densité et de couleur. On la sépare de celui-ci par décantation. Elle est ensuite séchée par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis récupérée et conservée dans des vials de couleur brune, hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière.

3.3 – Extraction par expression à froid (CP)

Les huiles essentielles de zestes de *Citrus* ont été obtenues par expression à froid (Figure 27) à l'aide d'un appareil d'extraction semi industriel (BREVET SCHAUB).

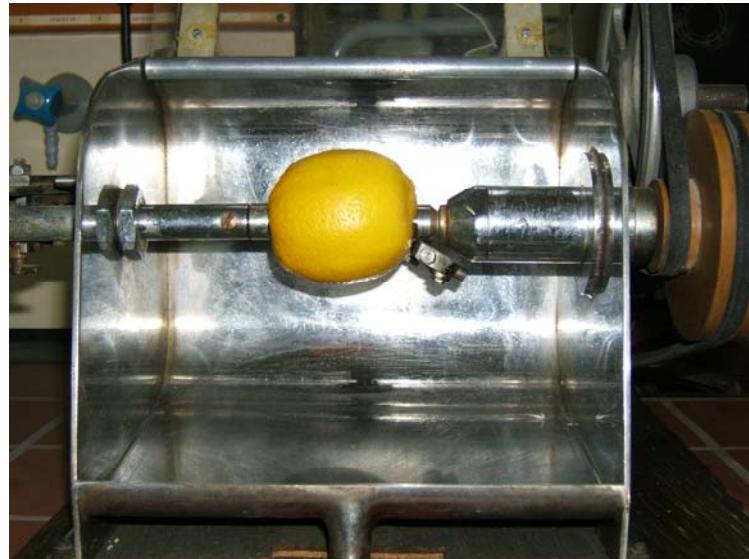


Fig. 27: Photo du montage de l'expression à froid.

L'huile essentielle est collectée à partir de 5 kg de fruits d'agrumes entiers en utilisant une machine automatique. Son principe de fonctionnement est le suivant : l'écorce d'agrume est lacérée par une aiguille qui va créer des zones de compression à l'endroit d'impact (aux alentours de l'aiguille). La création de zones de compression dans la peau, entourées par des zones de basse pression, va inciter l'huile à sortir vers l'extérieur. La durée totale de l'opération d'extraction est de 90 min; la séparation de l'HE se fait par centrifugation; elle est séchée ensuite par du sulfate de sodium anhydre et conservée à l'abri de la lumière à une température de 4°C jusqu'à ce quelle soit analysée.

4 – Méthodes comparatives

4.1 – Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) et par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

Les huiles essentielles récupérées par les trois procédés ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse seule (Tableau 10) sur un appareil de marque Hewlett Packard 6890 et par couplage de celui-ci à la spectrométrie de masse (appareil Hewlett Packard 5973A) (Tableau 11). Deux colonnes capillaires, l'une polaire (Stabilwax) et l'autre apolaire (HP5 MS), ont été utilisées afin d'obtenir des informations satisfaisantes sur la composition des huiles essentielles, puisque Sebastiani et al. (1983), ont démontré qu'avec une phase stationnaire apolaire (de type polyméthylsiloxane) des chevauchements partiels ou complets des pics ont été observés entre l'octanal et l' α -phéllandrine, le 1,8-cinéole et le limonène, le nérol et le citronellol ; avec les phases polaires (de type polyéthylèneglycol) une co-élution été observée entre certains alcools monoterpéniques, esters et hydrocarbures sesquiterpéniques.

Tableau 10 : Conditions opératoires des analyses par chromatographie en phase gazeuse.

Colonne capillaire	HP5 MS	Stabilwax
Longueur	30 m	60 m
Diamètre interne	0,25 mm	0,25 mm
Epaisseur de phase	0,25 μ m	0,25 μ m
Température du détecteur (FID)	320°C	320°C
Gaz vecteur	Azote	Azote
Débit	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Température de l'injecteur	250°C	250°C
Programmation du four	2°C/min de 60°C à 280°C	2°C/min de 60°C à 280°C
	8 min à 60°C	8 min à 60°C
	15 min à 280°C	15 min à 280°C
Concentration des échantillons	pur	pur
Quantité injectée	1 μ L	1 μ L
Mode d'injection	Split 1 :20	Split 1 :20

Tableau 11 : Conditions opératoires des analyses par CG/SM

Colonne capillaire	HP5 MS	Stabilwax
Mode de détection	Impact électronique	Impact électronique
Courant d'ionisation	70 eV	70 eV
Longueur	30 m	60 m
Diamètre interne	0,25 mm	0,25 mm
Epaisseur de phase	0,25 µm	0,25 µm
Température du détecteur (FID)	320°C	320°C
Gaz vecteur	Hélium	Hélium
Débit	0,7 mL/min	0,3 mL/min
Pression en tête de colonne	10^{-7} mbar	10^{-7} mbar
Pression (source, analyseur)		
Température d'interface	280°C	280°C
Température de l'injecteur	250°C	250°C
Programmation du four	2°C/min de 60°C à 280°C	2°C/min de 60°C à 280°C
	8 min à 60°C	8 min à 60°C
	15 min à 280°C	15 min à 280°C
Concentration des échantillons	pur	pur
Quantité injectée	1 µL	1 µL
Mode d'injection	Split 1 :20	Split 1 :20

L'identification des constituants de l'huile essentielle se fait par comparaison du spectre de masse de chaque pic séparé par CG avec ceux reportés comme références dans des librairies spécialisées de spectrométrie de masse.

La fiabilité de la reconnaissance est principalement, donnée par un taux de vraisemblance (supérieur à 90 %) du spectre de masse du soluté inconnu par rapport à celui de la banque de données. Cette présence est confirmée par le calcul des indices de rétention propres à ce composant.

L'indice de rétention d'un soluté donné peut être obtenu à partir d'un chromatogramme complexe de solutés en mélange et d'au moins deux alcanes normaux qui encadrent le soluté d'intérêt. Ceci revient à considérer les alcanes comme des étalons sur lesquels l'échelle des indices de rétention se réfère.

Par définition, l'indice de rétention d'un alcane normal est égal à 100 fois le nombre d'atomes de carbones présents dans le composé indépendamment du remplissage de la colonne, de la température et des autres conditions chromatographiques. Les indices de rétention de tous les composés autres que les alcanes normaux varient souvent de plusieurs centaines d'unités avec les paramètres de la colonne (Skoog *et al.*, 2003).

Le système des indices de rétention de Kovàts, est d'un usage général, a dépassé largement le cadre de l'analyse qualitative pure et simple. Il est utilisé pour caractériser les phases stationnaires (Tranchant *et al.*, 1995). Dans les conditions de montée linéaire de la température de la colonne, Van Den Dool et Kratz (1963), ont donc proposé la formule suivante de calcul des indices :

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

Où :

I_R : Indice de rétention du soluté considéré ;

$(t_R)_i$: Temps de rétention du soluté considéré ;

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

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

n et n+1: nombre de carbones des hydrocarbures paraffiniques (n-alcanes) ;

La préparation de la solution étalon des n-alcanes pour la mesure des indices de Kovats des composés identifiés dans les huiles essentielles a été faite comme suit : Solution des n-alcanes de C₈ à C₂₆ (origine: Aldrich et Fluka Chemicals) à 5% dans le pentane. Soit 0,1 g de chaque alcane dans 20 mL de pentane, conservé au réfrigérateur. L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse expérimentaux de leurs ions-fragments caractéristiques à ceux cités dans la littérature (Adams, 2007) et/ou inventoriés dans les banques de librairies spectrales (Wiley 7, Nist 2002).

4.2 – Analyse par HPLC

Les analyses par HPLC sont effectuées en utilisant un chromatographe liquide de marque Waters (Milford, MA). Le système HPLC est équipé d'une pompe Waters 600E, d'un auto-injecteur Waters 717, d'un détecteur à barrette diodes. La pompe, l'auto-injecteur, la température de la colonne et le système à barrette de diodes sont contrôlés par le logiciel Waters Empower 2. Les longueurs d'ondes utilisées sont de 284 et 329 nm pour la quantification des polyphénols du romarin. La séparation chromatographique s'effectue avec une colonne Purospher Star RP-18 (250 x 4 mm D.I. ; dont la dimension des particules est de 5 µm (VWR)), et est munie d'une pré-colonne RP-18 (4 x 4 mm D.I.). La colonne et la pré-colonne sont toutes deux maintenues à la température de 37°C. La phase mobile dont le débit est de l'ordre de 1 mL /min, est constituée de deux solvants : solution aqueuse (pour hplc) contenant 0,5 % acide acétique (Solvant A) et 100 % d'acetonitrile (Solvant B). La programmation des solvants est la suivante (Tableau 12) :

Tableau 12 : Programmation des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse par hplc.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	90	10
20	70	30
25	65	35
30	65	35
35	90	10

Le volume d'échantillon injecté est de l'ordre de 20 µL. Les analyses sont tri-répliquées et la moyenne seule est reportée. La quantification est effectuée en injectant des standards externes et les concentrations finales sont exprimées en mg/ 100 g.

4.3 – Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé par la méthode de Dean et Stark ou par la méthode physique en introduisant 10 g broyés d'échantillon et placés dans une coupelle tarée, elle-même positionnée dans une étuve réglée à $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Les échantillons sont ensuite pesés avec précision toutes les vingt-quatre heures, après avoir été refroidis à température ambiante dans un dessiccateur, et ce jusqu'à obtention d'un poids constant.

4.4 – Rendement en huile essentielle Rdt_{HE}

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

$$Rdt_{HE} = \frac{M_{HE}}{MVS} \times 100$$

Où :

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

M_{HE} : Masse de l'huile essentielle (g) ;

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

4.5 – Mesure de la densité selon la norme NF T 75-111

Elle est effectuée à l'aide d'un pycnomètre d'un millilitres de volume, à la température de 20°C

4.6 – Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112

Elle est effectuée à l'aide d'un réfractomètre de type Bellinghame permettant avec une précision de $\pm 0,0002$, la lecture directe des indices de réfraction situés entre 1,3000 et 1,7000.

Mode opératoire :

- Réglér le réfractomètre en mesurant les indices de réfraction des produits étalons (eau distillée, d'indice de réfraction 1,3330 à 20 °C) ;
- Vérifier que le réfractomètre est maintenu à la température à laquelle les lectures doivent être effectuées, la température de référence étant de 20 °C ;
- Placer l'échantillon pour essai dans le réfractomètre, attendre que la température soit stable, puis effectuer la mesure.

4.7 – Mesure du pouvoir rotatoire : NF T 75-113

Elle est obtenue à l'aide d'un polarimètre de type JASCO 1010 (réglé de façon à donner 0° et 180° avec l'eau).

- Source lumineuse (lampe à vapeur de sodium), permettant d'obtenir une lumière de longueur d'onde $589,3 \pm 0,3$ nm.
- Tube d'observation de $100 \pm 0,5$ mm de longueur.

Mode opératoire :

- Dilution de l'essence d'écorces d'agrumes : 0,25g/ 100 mL d'éthanol.

- Remplir le tube avec l'échantillon pour essai, en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée.
- Placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil.

5 – Analyse en Microscopie Electronique à Balayage

Les échantillons végétaux, recueillis après extraction de l'HE, selon les procédés HD et MHG ont été examinés à l'INRA d'Avignon, Unité de pathologie végétale (France) à l'aide d'un Microscope Electronique à Balayage de marque Philips XL30.

Les échantillons ont été fixés sur un dispositif métallique, traités à l'azote liquide et coupés au scalpel. Ils ont été ensuite métallisés avec de l'or dans un appareil de pulvérisation de type Balzers SCD 004 pour obtenir une couche de l'ordre de 10 nm. L'observation des échantillons se fait sous vide avec une accélération du voltage de 10kV et en manœuvrant à une distance de l'ordre de 15 mm.

6 – Mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Nous avons appliqué la technique par contact direct de l'aromatogramme pour évaluer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Ce test a été effectué suivant la méthode de Conner et Beuchat (1984^{a,b}), Adam *et al.* (1998) et Chao *et al.* (2000) et en respectant les recommandations établies par le BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) et développées par Andrews (2001).

Ce test est effectué par dépôt d'un disque stérile de cellulose de 9 mm de diamètre (Whatman N°1) imprégné d'une quantité d'HE sur un milieu gélosé préalablementensemencé avec une culture microbienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètres (Figure 28).

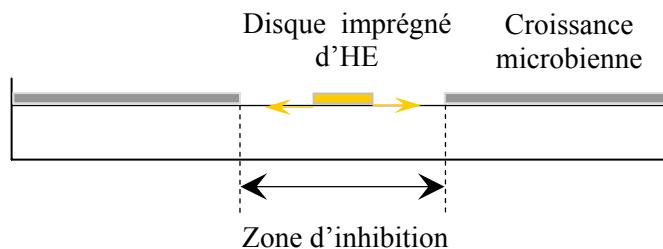


Fig. 28 : Aromatogramme sur boîte de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.

6.1 – Les microorganismes testés

Le nombre de microorganismes testés, lors de cette étude est de 03 : 02 souches bactériennes (01 Gram⁺ et 01 Gram⁻) et une levure, qui appartiennent aux familles : *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Saccharomycetaceae*, provenant de la collection du laboratoire de microbiologie du CRD SAIDAL (Tableau 13). La souche bactérienne Gram positif présente un pouvoir pathogène d'un niveau 2 sur une échelle de 4, établie par l'organisme ATCC (*American Type Collection Culture*). De plus, elle est considérée avec la souche Gram négatif comme souche test d'antibiotiques selon le même organisme (ATCC.org).

La liste des souches est regroupée dans le Tableau 13, l'essai d'inhibition est réalisé sur des cultures pures.

Tableau 13 : Liste et caractéristiques des microorganismes testés.

Nom de la souche	N° ATCC	Gram	Souche Pathogène	Souche Test d'antibiotiques	Famille*
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	X	X	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Escherichia coli</i>	4157	-		X	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601				<i>Saccharomycetaceae</i>

* Selon la seconde édition du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001 »

6.2 – Préparation des suspensions microbiennes

On a effectué un prélèvement des souches test, provenant de l'organisme ATCC sous forme de disques lyophilisés. Ces dernières ont été inoculées dans un bouillon nutritif et incubées à 37°C pendant 24 h. Les cultures ont été soumises à trois transferts successifs afin de déterminer la pureté et la viabilité de chaque souche avant son utilisation. Seules les souches âgées de 18 à 24 h, ont été utilisées.

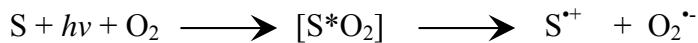
Trois (3) à 4 colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile, et introduites dans un tube contenant de l'eau physiologique. Après une bonne agitation et homogénéisation à l'aide d'un vortex, on a mesuré les transmittances, pour une longueur d'ondes égale à 620 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre de marque Shimatzu (série Visible). Celles-ci étaient comprises entre 22 et 32 % pour les bactéries et 2 à 3 % pour les levures, ce qui correspond à une concentration égale à $10^7 - 10^8$ cfu/mL.

6.3 – Mode opératoire

Le test est effectué en cultivant les bactéries sur un milieu Muller Hinton (Difco®) et les levures sur une gélose Sabouraud (Oxoid®). Chaque boîte de Pétri de 90 mm a reçu 20 mL du milieu de culture et estensemencée avec 1 à 2 µL de la suspension microbienne contenant 10^7 – 10^8 cfu/mL. Les disques stériles imprégnés d'HE sont déposés à la surface du milieu et laissés diffuser sur place pendant 30 min; ensuite, ils ont été incubés, inversés à l'obscurité dans une étuve à une température de 37°C durant 24 h pour les bactéries et à 25°C durant 48 h pour la levure. La lecture des diamètres des zones d'inhibition après incubation est réalisée à l'aide d'un lecteur de zones de marque Read Biotic. Le test est répété trois fois.

7 – Mesure de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des HE est déterminée en utilisant la photochimiluminescence (PCL) basée sur la méthode de Popov et Lewin (1999). Le radical superoxyde est produit par excitation d'un photosensibilisateur S (Luminol) lorsqu'il est exposé à la lumière UV, en présence de O₂ (transfert d'énergie photo-induit) :



Les radicaux superoxydes sont visualisés avec un réactif de détection chimiluminescent tel que le luminol (3-aminophthalylhydrazide) qui sert également de photosensibilisateur. Cette réaction d'oxydation est accélérée d'environ 1000 fois par rapport aux conditions normales.

L'Activité antioxydante de l'HE est mesurée par l'appareil Photochem® en utilisant un kit ACL (*Antioxidant Capacity of Lipophilic soluble compounds*, AnalytikJena, Jena, Germany) normalisé, prêt à l'emploi, fourni par le fabricant. Le mélange des différents réactifs du kit avec la solution de HE (antioxydant) est mené selon le protocole standard, l'intensité de chimiluminescence produite par le dianion 3-aminophthalate, formé à partir du luminol est mesurée à 430 nm.

Le kit ACL comprend le réactif 1 (solvant et réactif de dilution : méthanol), le réactif 2 (solution tampon pH 10,5), le réactif 3 (photosensibilisateur : luminol) et le réactif 4 (standard : Trolox®). Le mode de préparation du milieu réactionnel est présenté dans le Tableau 14 :

Tableau 14 : Préparation du milieu réactionnel du test PCL.

	Réactif 1	Réactif 2	Réactif 3	Standard	Echantillon
Blanc	2 300 µL	200 µL	25 µL	0	0
Standard	2 200 µL	200 µL	25 µL	100 µL	0
Echantillon	2 200 µL	200 µL	25 µL	0	100 µL

Les réactifs 1 et 2 sont prêts à l'emploi et le réactif 3 doit être dissous et agité avec 750 µL du réactif 2. Pendant toute la durée des mesures, le réactif 3 doit être conservé dans la glace et à l'abri de la lumière.

A partir du réactif 4 (standard), une solution stock de Trolox® (10 mMol/L), est préparée à partir de laquelle, différents concentrations sont tirées par dilution et présentées dans le Tableau 15 :

Tableau 15 : Concentrations des solutions standards.

Concentration finale du Trolox® (µMol/L)	Facteur de dilution	Volume de la solution stock de Trolox® (µL)	Volume du Réactif 1 (µL)
50	1 : 200	10	1990
20	1 : 500	10	4990
10	1 : 1000	10	9990
5	1 : 2000	10	19990

Dans le tube de l'appareil Photochem® sont introduits successivement : le réactif de dilution, le tampon et 100 µL du standard ou de l'échantillon. Le dernier réactif à additionner au système est le luminol. Les mesures démarrent immédiatement après une agitation rapide du mélange. Le temps de mesure est de l'ordre de 180 s.

8 – Analyse sensorielle

L'essai de différenciation est effectué par notation comprenant cinq échantillons selon la norme NF V 09-014

9 – Analyses statistiques

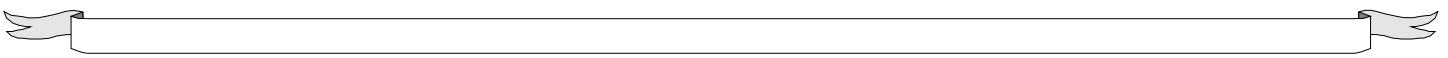
Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT version 2010 addinsoft.



Résultats & Interprétations



Chapitre I : Extraction des agrumes par Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité



1 – Introduction

Dans ce premier chapitre, nous traiterons successivement du rendement, de la cinétique, des études qualitative et quantitative et de l'analyse statistique des huit variétés d'agrumes. Notre but est d'étudier et de comparer l'application de la nouvelle méthode d'extraction par MHG (hydro-diffusion assistée par micro-ondes et gravité) aux autres méthodes conventionnelles HD (hydrodistillation) et CP (expression à froid). Huit variétés d'agrumes appartenant au genre *Citrus* ont été soumises à l'extraction innovante par MHG, réduisant considérablement le temps d'extraction et la consommation d'énergie par rapport aux autres techniques usuelles d'extraction.

2 – Extraction de l'huile essentielle d'orange « Valencia late » : analyse quantitative

Dans une étude préliminaire, nous avons étudié l'influence de la puissance micro-ondes sur l'extraction de l'huile essentielle d'orange (Valencia late). Cependant, le réglage de la puissance ne doit pas compromettre l'évaporation des composés volatils de l'HE déjà extraite. La Figure 29 représente la puissance micro-ondes en fonction du temps total d'extraction.

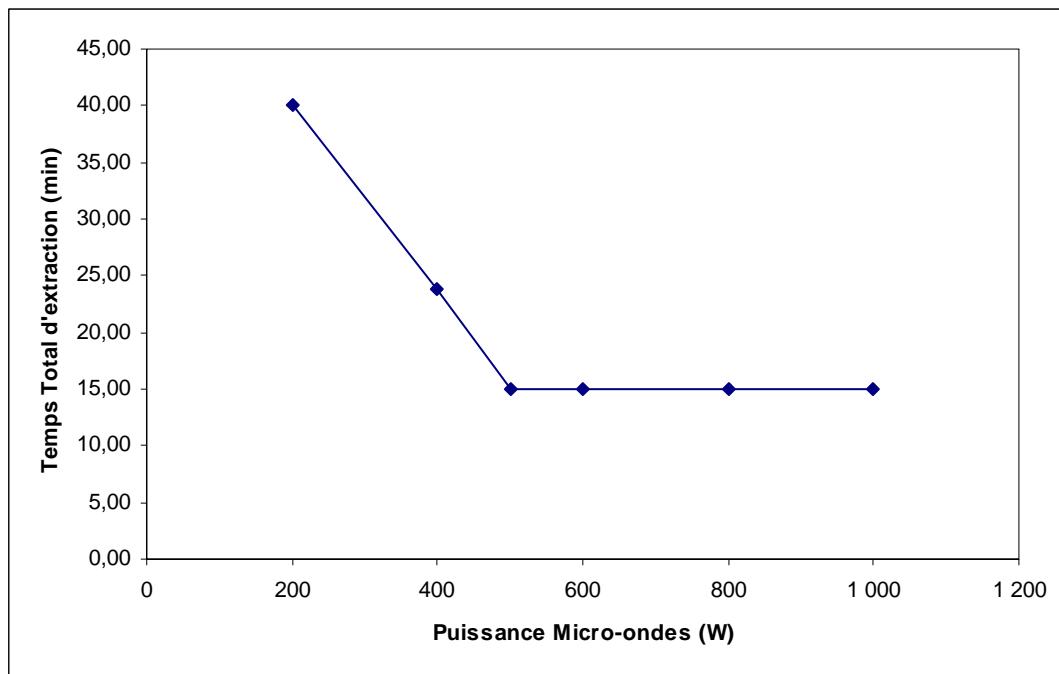


Fig. 29 : Profil de la puissance micro-ondes en fonction du temps total d'extraction.

Une puissance de l'ordre de 500 W d'irradiation micro-ondes a été choisie comme puissance optimale dans un intervalle de temps équivalent à 15 min pour l'extraction complète de l'HE présente dans 500 g de matière végétale. Le Tableau 16 présente les rendements en huile essentielle de l'oranger « Valencia Late » obtenues par hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (MHG), par hydrodistillation (HD) et par expression à froid (CP). La MHG est la méthode d'extraction qui fournit la même quantité d'huile essentielle que celle extraite par HD, mais elle est 12 fois plus rapide. L'expression à froid n'a donné que 0,2 % d'HE. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que la durée d'une MHG n'excède pas 15 minutes alors que l'hydrodistillation et l'expression à froid nécessitent des temps d'extraction de l'ordre respectivement de 180 et de 60 minutes.

Tableau 16 : Rendements en huiles essentielles de la variété Valencia Late selon trois (3) méthodes d'extraction.

	Méthode d'extraction		
	MHG	HD	CP
Temps d'extraction (min)	15	180	60
Rendement (%)	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,03

Lors d'une MHG, la phase de chauffage est relativement faible par rapport à l'hydrodistillation. Cette période de chauffe est toujours de l'ordre de 1,5 à 2 minutes pour la MHG et de 45 minutes pour l'HD. En revanche, l'étape d'extraction proprement dite durant laquelle les molécules aromatiques sont recueillies est nettement plus longue (12,5 à 13 minutes pour la MHG et 3 heures pour l'hydrodistillation) et se traduit par un palier de température de distillation à 100°C. La Figure 30 montre en MHG et HD, l'évolution de la température durant les étapes de chauffage et d'extraction de l'huile essentielle de l'oranger « Valencia Late ». Cette température est initialement voisine de la température ambiante et puis augmente au fur et à mesure pour atteindre 100°C, température d'ébullition de l'eau.

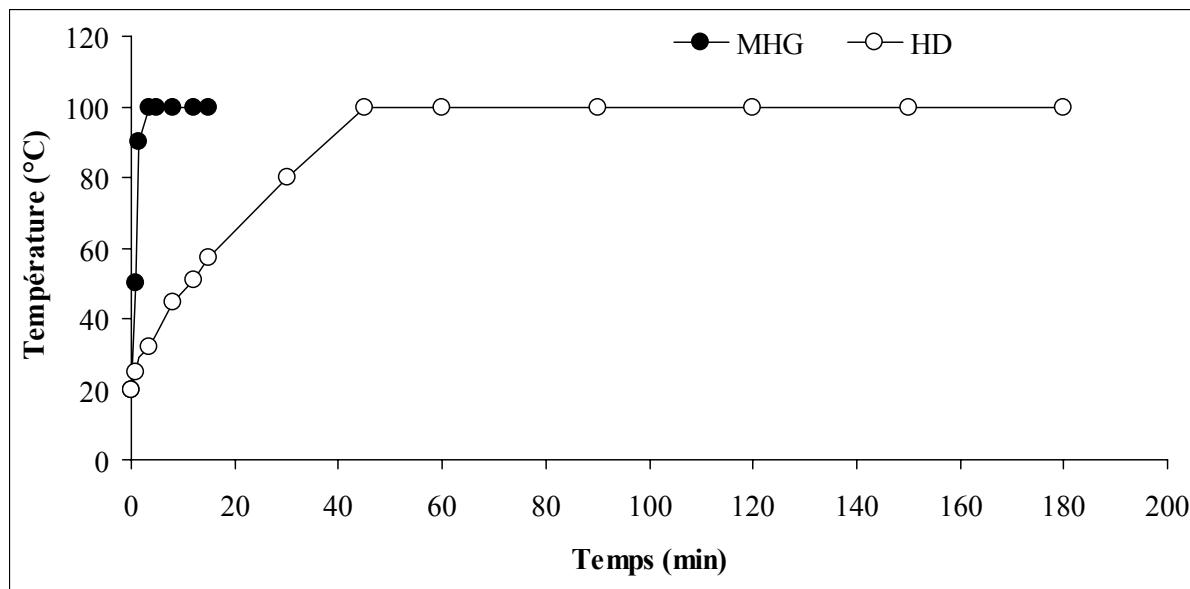


Fig. 30 : Evolution de la température au cours de l'extraction de l'huile essentielle de Valencia Late par MHG et HD.

Pour les essences obtenues par expression à froid, l'utilisation de grandes quantités d'eau, questions nécessaires à l'entraînement de l'essence et à son non réabsorption, a une influence défavorable. En effet, l'essence se trouve alors sous forme de gouttelettes dispersées dans une phase aqueuse. L'action de l'eau peut induire un effet de solubilisation des molécules hydrophiles souvent très odorantes et une diminution graduelle du citral et des alcools terpéniques (Chemat et *al.*, 2007), ainsi que l'hydrolyse de certains esters odorants (acétate de linalyle) et l'activation de certaines réactions biochimiques.

3 – Composition des huiles essentielles d'oranges « Valencia late »

Les huiles essentielles récupérées par les trois procédés ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID) et par couplage de celle-ci à la spectrométrie de masse (GC/MS) en utilisant deux colonnes capillaires l'une polaire (Stabilwax) et l'autre apolaire (HP5 MS). Les conditions opératoires ont été détaillées dans la partie expérimentale. Le Tableau 17 regroupe la composition qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles de l'oranger « Valencia Late » extraites par les trois méthodes : MHG, CP et HD. Nous constatons d'après ce dernier la présence du même nombre de constituants dans l'essence, quelque soit le mode d'extraction choisi.

Tableau 17 : Composition des huiles essentielles de l'orange Valencia Late obtenues par MHG, HD et CP.

N°	Composés ^a	I.R. ^b	I.R. ^c	Valencia Late		
				MHG	HD	CP
Monoterpènes				97.57	98.71	98.55
1	Pinène <Alpha->	926	1023	0.43	0.51	0.52
2	Pinène <Béta->	974	1109	*	*	*
3	Myrcène <Béta->	988	1165	1.64	1.85	1.89
4	Carène <Delta-3->	1101	1290	0.09	0.15	0.20
5	Limonène	1030	1206	94.64	95.48	95.06
6	Terpinène <Gamma->	1103	1285	0.05	0.06	0.01
Monoterpènes oxygénés				0.99	0.56	0.64
7	Linalol	1125	1538	0.62	0.30	0.34
8	Citronellal	1167	1478	0.06	0.03	0.05
9	Terpin-4-ol	1191	1590	0.03	0.06	0.02
10	Terpinoléol <Alpha->	1203	1677	0.09	0.06	0.05
11	Nérol	1237	1781	*	*	*
12	Néral	1268	1670	0.05	0.03	0.06
13	Géraniol	1271	1828	*	*	*
14	Géranial	1284	1714	0.09	0.05	0.09
Sesquiterpènes				0.11	0.12	0.13
15	Elémène <Béta->	1373	1583	0.01	0.01	0.02
16	Caryophyllène <E->	1391	1594	0.02	0.01	0.01
17	Bergamotène <Alpha-Trans->	1437	1577	*	*	*
18	Humulène <Alpha->	1450	1657	0.01	0.02	0.03
19	Farnésène <(E)-Béta->	1453	1650	*	*	*
20	Germacrène D	1477	1696	0.01	0.01	0.01
21	Valencène	1488	1705	0.02	0.04	0.02
22	Bisabolène <(Z)-Alpha->	1498	1761	*	*	*
23	Bisabolène (Béta-)	1508	1718	*	*	*
Sesquiterpènes oxygénés				0.08	0.02	0.07
24	Elémol	1540	1381	0.01	*	*
25	Nérolidol <E->	1555	2026	*	*	*
26	Bisabolol <Alpha->	1684	2212	*	*	*
27	Nootkatone	1799	2250	*	*	*
Autres Composés oxygénés				0.33	0.26	0.38
28	Nonanal <N->	1126	1400	0.01	0.03	0.05
29	Citronellyl Acétate	1342	1645	*	*	*
30	Néryl Acétate	1351	1706	*	*	*
Temps d'Extraction (min.)				15	180	60
Rendement (%)				1.0	1.1	0.2
Composés oxygénés totaux (%)				1.40	0.84	1.09
Composés non oxygénés totaux (%)				97.68	98.83	98.68

^a Composés d'huiles essentielles triés par famille chimique et taux calculés par GC-FID sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^b Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^c Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire polaire CarbowaxTM – PEG.

Le limonène, un hydrocarbure monoterpéniq[ue], est incontestablement le composé le plus abondant dans l'huile essentielle de Valencia Late avec des taux relativement équivalents quelle que soit la méthode d'extraction à raison respectivement de 94,64 %, 95,48 % et 95,06 % dans l'huile essentielle issue d'une MHG, HD et d'une CP. Nos résultats concordent avec les résultats trouvés par Muhoho Njoroge et *al.* (2005), Minh Tu et *al.* (2002), Baaliouamer et *al.* (1992), Shaw (1979), Norman et *al.* (1967). Dans l'application de la MHG, l'irradiation micro-ondes a fortement accéléré le processus d'extraction, mais sans provoquer des changements considérables dans la composition de l'huile volatile, un phénomène qui a déjà été décrit par Paré et Belanger (1997) ; Chen et Spiro (1995).

Quatre composés seulement sont présents avec une teneur notable : l' α -Pinène (0,43% en MHG, 0,51% en HD et 0,52% en CP), le β -Myrcène (1,64 % en MHG, 1,85 % en HD et 1,89 % en CP), le Linalol (0,62 % en MHG, 0,30 % en HD et 0,34 % en CP). Nous observons la présence d'une teneur élevée de Δ -3-Carène (jusqu'à 0,20%) qui peut être utilisé comme indicateur distinctif des oranges douce et amère (Dugo et *al.*, 1996). Notons aussi la présence dans notre huile d'orange du Valencène (taux < 0,04 %) sesquiterpène dont la présence n'est pas appréciée dans l'huile d'orange douce de la Floride (Wolford et *al.*, 1971).

Selon la technique d'extraction utilisée, la Figure 31 illustre les proportions de la fraction oxygénée, la plus aromatique et donc la plus valorisable de l'huile essentielle au niveau olfactif (Cheetham, 2010 ; Phi et *al.*, 2006 ; Sawamura et *al.*, 2004 ; Di Giacomo et Di Giacomo, 2002 ; Gaffney et *al.*, 1996 ; Stanley, 1962). L'analyse des résultats montre que l'huile essentielle obtenue par MHG est la plus riche en composés oxygénés (1,40 %) suivie de la CP (1,09 %) et de l'HD (0,84 %).

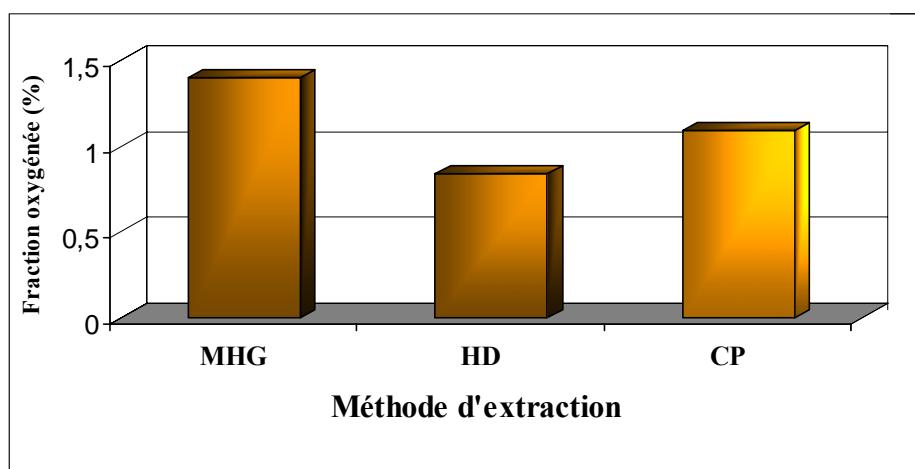


Fig. 31 : Proportion de la fraction oxygénée au sein de l'huile essentielle de Valencia Late après extraction selon trois méthodes.

4 – Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle

La durée d'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus. Lors de cette étude, un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction de l'huile essentielle par HD et MHG. La Figure 32 présente, pour les deux techniques HD et MHG étudiées, l'évolution du rendement en huiles essentielles lors de l'extraction de l'essence de l'oranger Valencia Late.

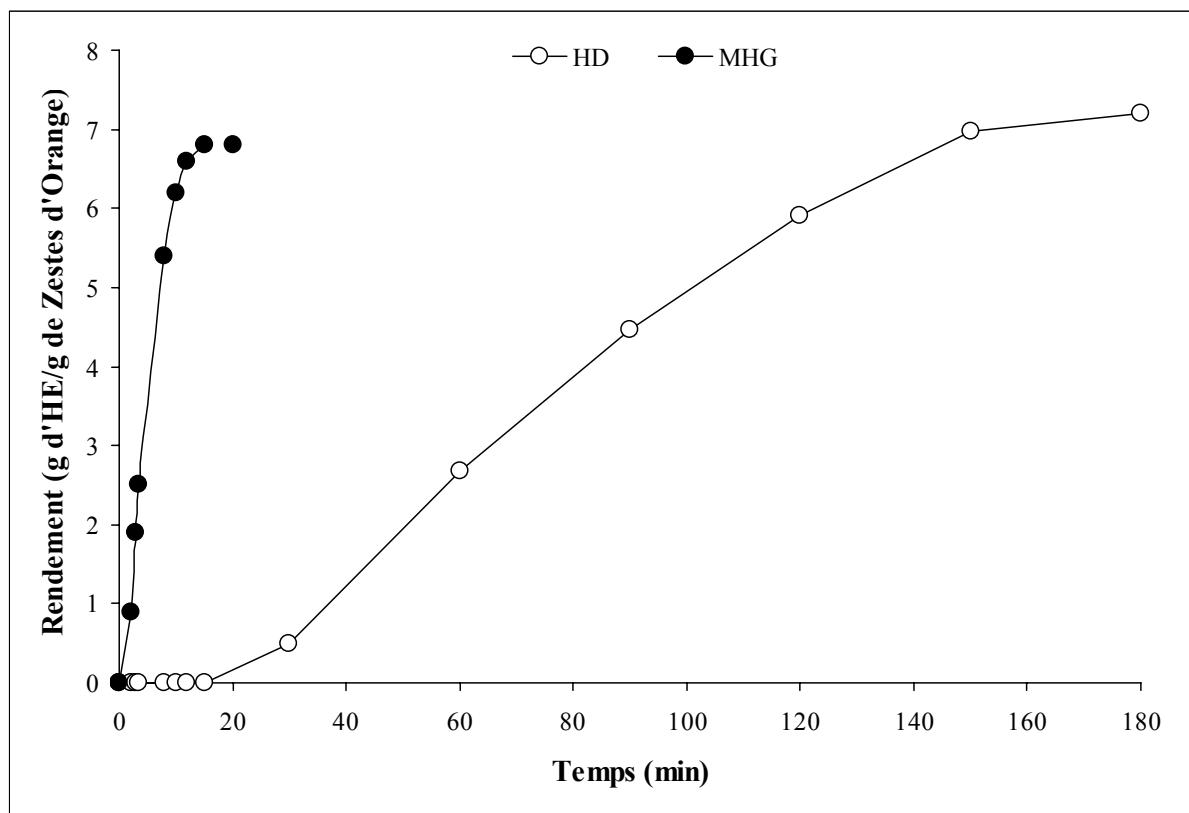


Fig. 32 : Cinétique de l'extraction de l'HE de Valencia Late par MHG et HD.

Comme le montre clairement la Figure 32, l'extraction de l'HE de Valencia Late par la MHG est plus rapide que celle réalisée par la méthode conventionnelle HD. Un temps d'extraction de 15 min avec la MHG nous fournit un rendement comparable à celui obtenu après 180 min avec l'HD, méthode essentiellement citée en référence pour l'extraction des huiles essentielles.

Cette étude cinétique montre l'existence de trois étapes :

- Une première partie relative au chauffage de la matière végétale et correspondant à la montée en température au sein du réacteur, étape durant laquelle aucune extraction d'huile essentielle ne se produit ;
- La seconde étape correspond à une extraction plus ou moins rapide de l'essence selon la technique d'extraction et la matrice traitée ;
- Enfin, au cours de la troisième étape la courbe tend vers un second palier, qui correspond pour une matrice donnée au rendement maximum possible à être atteint dans les conditions expérimentales optimisées.

Du fait des conditions opératoires initiales, la phase de chauffage est beaucoup plus courte pour l'extraction par micro-ondes (MHG) que pour l'hydrodistillation. La durée d'extraction par MHG est relativement courte puisqu'au bout de 15 minutes nous n'observons plus de distillat. Le rendement augmente rapidement durant les six premières minutes où plus de 82 % de l'huile sont extraits, son évolution devient plus lente par la suite.

Par conséquent, pour atteindre un même rendement en huile essentielle, il est nécessaire de chauffer la matière végétale seulement 06 minutes en MHG et plus de deux heures en HD. De cette façon le matériel végétal lors d'une MHG, subira moins les effets du chauffage. Par ailleurs, l'allure des deux courbes suggère que le processus d'extraction est régi par deux lois physiques différentes. Nous tenterons d'apporter des éléments de réponse à ces hypothèses lors de l'étude des phénomènes d'extraction.

5 – Généralisation aux autres variétés de Citrus

Après les bons résultats obtenus pour l'extraction de l'huile essentielle de la variété « Valencia Late » du point de vue du temps d'extraction, du rendement, de la composition chimique, nous avons voulu généraliser la méthode d'extraction par Hydrodiffusion assisté par micro-ondes et gravité de l'huile essentielle de cette variété à d'autres agrumes. Huit variétés d'agrumes provenant de la Station Expérimentale d'Arboriculture de Boufarik ont été étudiées en vue d'en extraire les huiles essentielles par les trois méthodes d'extraction (MHG, HD et CP). Notre objectif est double :

- D'une part, valider une nouvelle méthode d'extraction à des fins analytiques ou bien de production industrielle pouvant servir de référence pour la préparation des huiles essentielles à partir d'agrumes (ou d'autres fruits à huile essentielle);

- D'autre part, permettre une compréhension plus approfondie des phénomènes régissant l'extraction par micro-ondes pour cette catégorie de fruits et examiner les différences ou les ressemblances qui pourraient être décelées entre ces trois méthodes d'extraction.

Cette généralisation est constituée de deux parties : La première s'appuie, à titre de comparaison sur une étude qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles des huit variétés de *Citrus* obtenues par les trois méthodes d'extraction (MHG, HD et CP). La seconde s'articule sur l'examen par analyse de données multidimensionnelles de la composition chimique des HE des 8 Citrus étudiés et obtenues par ces trois méthodes. L'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) a été utilisée pour l'étude statistique de la composition des vingt-quatre huiles essentielles obtenues.

Dans le Tableau 9 (Chapitre Matériel & Méthodes) les espèces et variétés de Citrus étudiées dans ce travail et provenant de la Station Expérimentale de Boufarik ont été citées. Notons que la variété Washington Navel fait partie des oranges blondes Navels ; Valencia appartient aux oranges blondes et la Tarocco fait partie des sanguines. Pour notre part, nous avons choisi comme base, la classification de Mabberley (Mabberley, 2008) qui a résumé les critères et définitions des noms d'agrumes, conformément aux accords internationaux plus récents.

Le Tableau 18 présente les résultats des rendements en huiles essentielles des huit variétés d'agrumes obtenues par les 3 méthodes d'extraction. Les essences obtenues par expression à froid présentent les plus faibles rendements qui sont compris entre 0,10 et 0,30 % seulement. De façon générale, pour les huit variétés étudiées, les rendements en huiles essentielles issues de l'hydrodistillation sont similaires à ceux des huiles essentielles obtenues par MHG. Le Citronnier Villa França est la variété qui, parmi les huit étudiées, offre par MHG d'une durée totale de 15 min, le plus important rendement.

Tableau 18 : Rendement en HE des huit variétés d'agrumes (g d'HE/ g de fruit de Citrus).

Variétés de Citrus	Méthode d'extraction		
	MHG	HD	CP
Villa França	1,60	1,70	0,20
Tarocco	1,20	1,30	0,30
Tangelo Seminole	1,20	1,30	0,30
Valencia Late	1,00	1,10	0,20
Marsh Seedless	1,00	1,10	0,20
Washington Navel	0,90	1,00	0,20
Lime	0,80	0,80	0,20
Eurêka	0,70	0,80	0,10

Les résultats de l'identification des constituants des différentes huiles essentielles sont présentés dans les Tableaux 19 – 22. Les analyses chromatographiques en phase gazeuse (CG) couplées à la spectrométrie de masse (SM) ont été effectuées sur deux colonnes capillaires l'une polaire (Stabilwax) et l'autre apolaire (HP5–MS). La quantification a été effectuée avec l'aide d'un CG–FID. Les conditions opératoires sont précisées dans la partie expérimentale. Les dérivés terpéniques sont présents en très grand nombre dans toutes les huiles essentielles des Citrus étudiés ; parmi eux, le limonène est le dérivé principal. La composition chimique de l'huile essentielle de zestes d'orange a fait l'objet de diverses études. Cependant, les données de la littérature ne sont pas toujours facilement comparables car les conditions d'extraction, la nature du sol, de l'ensoleillement, de l'aire géographique, de la pluviosité sont très souvent différentes.

Tableau 19 : Composition chimique des HE des variétés Eurêka et Villa França extraites par MHG, HD et CP.

N°	Composés ^a	I.R. ^b	I.R. ^c	Eurêka			Villa França		
				MHG	HD	CP	MHG	HD	CP
Monoterpènes				92.10	92.76	93.73	89.68	88.39	93.60
1	Pinène<Alpha->	926	1023	1.60	1.75	1.62	1.53	1.18	1.02
2	Pinène<Béta->	974	1109	10.20	15.35	14.00	6.99	7.08	9.24
3	Myrcène<Béta->	988	1165	1.57	1.33	1.42	1.51	1.52	1.55
4	Carène<Delta-3->	1101	1290	0.11	0.20	0.15	0.16	0.15	0.15
5	Limonène	1030	1206	69.65	65.25	68.81	70.92	71.22	71.86
6	Terpinène<Gamma->	1103	1285	8.25	8.08	7.04	7.70	6.58	8.90
Monoterpènes oxygénés				3.01	3.89	2.65	3.72	3.75	3.65
7	Linalol	1125	1538	0.20	0.18	0.10	0.20	0.35	0.22
8	Citronellal	1167	1478	0.10	0.05	0.08	0.09	0.06	0.07
9	Terpin-4-ol	1191	1590	0.08	0.42	0.03	0.09	0.37	0.02
10	Terpinoléol<Alpha->	1203	1677	0.21	0.56	0.22	0.29	0.53	0.23
11	Nérol	1237	1781	0.26	0.49	*	0.30	0.44	0.09
12	Néral	1268	1670	0.76	0.68	0.77	0.94	0.53	1.06
13	Géraniol	1271	1828	0.24	0.60	*	0.32	0.56	0.07
14	Géranial	1284	1714	1.08	0.89	1.30	1.37	0.85	1.82
Sesquiterpènes				0.85	1.06	1.65	0.99	0.88	2.12
15	Elémène<Béta->	1373	1583	*	*	*	*	*	*
16	Caryophyllène<E->	1391	1594	0.13	0.18	0.24	0.17	0.16	0.35
17	Bergamotène<Alpha-Trans->	1437	1577	0.26	0.28	0.50	0.29	0.20	0.58
18	Humulène<Alpha->	1450	1657	0.03	0.04	0.06	0.03	0.05	0.09
19	Farnésène<(E)-Béta->	1453	1650	0.01	0.02	0.02	*	0.01	0.02
20	Germacrène D	1477	1696	*	*	*	*	*	*
21	Valencène	1488	1705	*	0.04	*	0.01	0.07	0.11
22	Bisabolène<(Z)-Alpha->	1498	1761	0.02	0.03	0.05	0.03	0.02	0.07
23	Bisabolène(Béta-)	1508	1718	0.38	0.44	0.75	0.43	0.31	0.87
Sesquiterpènes oxygénés				0.02	0.03	0.03	0.10	0.24	0.04
24	Elémol	1540	1381	*	*	*	*	*	*
25	Nérololidol<E->	1555	2026	*	*	*	*	*	*
26	Bisabolol<Alpha->	1684	2212	0.01	0.03	0.03	0.09	0.15	0.04
27	Nootkatone	1799	2250	*	*	*	*	*	*
Autres Composés oxygénés				0.95	0.86	0.65	0.75	0.71	0.69
28	Nonanal<N->	1126	1400	0.08	0.09	0.06	0.10	0.02	0.08
29	Citronellyl Acétate	1342	1645	0.02	0.03	0.04	0.02	0.02	0.04
30	Néryl Acétate	1351	1706	0.30	0.26	0.19	0.34	0.36	0.32
Composés oxygénés totaux (%)				3.98	4.78	3.33	4.57	4.70	4.38
Composés non oxygénés totaux (%)				92.95	93.82	95.38	90.67	89.27	95.72

^a Composés d'huiles essentielles triés par famille chimique et taux calculés par GC-FID sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^b Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^c Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire polaire CarbowaxTM – PEG.

Tableau 20 : Composition chimique des HE des variétés Lime et Marsh Seedless extraites par MHG, HD et CP.

N°	Composés ^a	I.R. ^b	I.R. ^c	Lime			Marsh Seedless		
				MHG	HD	CP	HD	MHG	CP
Monoterpènes				88.70	92.50	95.80	97.93	97.03	97.27
1	Pinène<Alpha->	926	1023	1.86	1.94	1.62	0.41	0.45	0.27
2	Pinène<Béta->	974	1109	11.60	13.09	14.00	*	*	*
3	Myrcène<Béta->	988	1165	1.40	1.46	1.42	1.73	1.81	1.55
4	Carène<Delta-3->	1101	1290	*	*	*	*	*	*
5	Limonène	1030	1206	60.56	63.44	68.81	95.05	94.21	94.54
6	Terpinène<Gamma->	1103	1285	11.91	11.17	8.90	0.01	0.03	0.01
Monoterpènes oxygénés				5.11	4.91	3.71	0.45	0.51	0.36
7	Linalol	1125	1538	0.25	0.36	0.22	0.17	0.18	0.07
8	Citronellal	1167	1478	0.05	0.05	0.08	0.05	0.02	0.03
9	Terpin-4-ol	1191	1590	0.08	0.19	0.03	0.02	0.09	0.02
10	Terpinéol<Alpha->	1203	1677	0.38	0.37	0.23	0.06	0.08	0.05
11	Nérol	1237	1781	0.20	0.13	0.09	*	*	*
12	Néral	1268	1670	1.66	1.55	1.06	0.04	0.03	*
13	Géraniol	1271	1828	0.12	0.07	0.07	0.02	0.02	*
14	Géranial	1284	1714	2.23	2.05	1.82	0.03	0.04	0.04
Sesquiterpènes				3.56	1.92	1.98	0.49	0.50	1.88
15	Elémène<Béta->	1373	1583	*	*	*	0.06	0.04	0.08
16	Caryophyllène<E->	1391	1594	0.56	0.31	0.35	0.17	0.20	0.72
17	Bergamotène<Alpha-Trans->	1437	1577	1.00	0.54	0.58	*	*	*
18	Humulène<Alpha->	1450	1657	0.13	0.06	0.09	0.04	0.04	0.17
19	Farnésène<(E)-Béta->	1453	1650	0.03	0.06	0.02	*	*	0.03
20	Germacrène D	1477	1696	0.05	*	*	*	*	*
21	Valencène	1488	1705	*	*	*	*	*	*
22	Bisabolène<(Z)-Alpha->	1498	1761	0.10	0.05	0.07	*	*	*
23	Bisabolène<Béta->	1508	1718	1.51	0.81	0.87	*	*	*
Sesquiterpènes oxygénés				0.02	0.02	0.03	0.10	0.16	0.26
24	Elémol	1540	1381	*	*	*	0.01	0.01	0.04
25	Nérolidol<E->	1555	2026	*	*	*	0.01	0.01	0.02
26	Bisabolol<Alpha->	1684	2212	0.02	0.02	0.03	*	*	*
27	Nootkatone	1799	2250	*	*	*	0.07	0.13	0.15
Autres Composés oxygénés				1.19	0.82	0.59	0.52	0.74	0.38
28	Nonanal<N->	1126	1400	*	*	*	0.04	0.04	*
29	Citronellyl Acétate	1342	1645	0.04	0.02	0.04	0.01	0.01	0.05
30	Néryl Acétate	1351	1706	0.87	0.60	0.19	0.01	0.01	0.05
Composés oxygénés totaux (%)				6.32	5.75	4.33	1.07	1.41	1.00
Composés non oxygénés totaux (%)				92.26	94.42	97.78	98.42	97.53	99.15

^a Composés d'huiles essentielles triés par famille chimique et taux calculés par GC-FID sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^b Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^c Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire CarbowaxTM – PEG.

Tableau 21 : Composition chimique des HE des variétés Tarocco et Valencia late extraites par MHG, HD et CP.

N°	Composés ^a	I.R. ^b	I.R. ^c	Tarocco			Valencia Late		
				MHG	HD	MHG	HD	MHG	HD
Monoterpènes				98.02	98.11	98.10	97.57	98.71	98.55
1	Pinène<Alpha->	926	1023	0.46	0.49	0.50	0.43	0.51	0.52
2	Pinène<Béta->	974	1109	*	*	*	*	*	*
3	Myrcène<Béta->	988	1165	1.85	1.87	1.89	1.64	1.85	1.89
4	Carène<Delta-3->	1101	1290	0.02	0.06	0.01	0.09	0.15	0.20
5	Limonène	1030	1206	95.19	94.68	94.94	94.64	95.48	95.06
6	Terpinène<Gamma->	1103	1285	0.01	0.05	0.01	0.05	0.06	0.01
Monoterpènes oxygénés				1.11	0.60	0.61	0.99	0.56	0.64
7	Linalol	1125	1538	0.88	0.17	0.49	0.62	0.30	0.34
8	Citronellal	1167	1478	0.04	0.02	0.02	0.06	0.03	0.05
9	Terpin-4-ol	1191	1590	*	0.12	*	0.03	0.06	0.02
10	Terpinoléol<Alpha->	1203	1677	0.06	0.05	0.04	0.09	0.06	0.05
11	Nérol	1237	1781	*	0.06	*	*	*	*
12	Néral	1268	1670	0.05	0.01	0.02	0.05	0.03	0.06
13	Géraniol	1271	1828	*	*	*	*	*	*
14	Géranial	1284	1714	0.05	0.03	0.03	0.09	0.05	0.09
Sesquiterpènes				0.19	0.45	0.26	0.11	0.12	0.13
15	Elémène<Béta->	1373	1583	*	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02
16	Caryophyllène<E->	1391	1594	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
17	Bergamotène<Alpha-Trans->	1437	1577	*	*	*	*	*	*
18	Humulène<Alpha->	1450	1657	*	*	0.01	0.01	0.02	0.03
19	Farnésène<(E)-Béta->	1453	1650	*	*	*	*	*	*
20	Germacrène D	1477	1696	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01
21	Valencène	1488	1705	0.12	0.28	0.12	0.02	0.04	0.02
22	Bisabolène<(Z)-Alpha->	1498	1761	*	*	*	*	*	*
23	Bisabolène<Béta->	1508	1718	*	*	*	*	*	*
Sesquiterpènes oxygénés				*	0.05	*	0.08	0.02	0.07
24	Elémol	1540	1381	*	*	*	0.01	*	*
25	Nérolidol<E->	1555	2026	*	*	*	*	*	*
26	Bisabolol<Alpha->	1684	2212	*	*	*	*	*	*
27	Nootkatone	1799	2250	*	*	*	*	*	*
Autres Composés oxygénés				0.23	0.24	0.30	0.33	0.26	0.38
28	Nonanal<N->	1126	1400	0.06	0.02	0.05	0.01	0.03	0.05
29	Citronellyl Acétate	1342	1645	*	*	*	*	*	*
30	Néryl Acétate	1351	1706	*	0.01	*	*	*	*
Composés oxygénés totaux (%)				1.34	0.89	0.91	1.40	0.84	1.09
Composés non oxygénés totaux (%)				98.21	98.56	98.36	97.68	98.83	98.68

^a Composés d'huiles essentielles triés par famille chimique et taux calculés par GC-FID sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^b Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^c Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire CarbowaxTM – PEG.

Tableau 22 : Composition chimique des HE des variétés Washington Navel et Tangelo Seminole extraites par MHG, HD et CP.

N°	Composés ^a	I.R. ^b	I.R. ^c	Washington Navel			Tangelo Seminole		
				MHG	HD	CP	MHG	HD	CP
Monoterpènes				98.33	96.24	98.45	97.48	97.80	97.24
1	Pinène<Alpha->	926	1023	0.45	0.53	0.50	0.52	0.83	0.91
2	Pinène<Béta->	974	1109	*	*	*	0.36	0.38	0.37
3	Myrcène<Béta->	988	1165	1.78	1.76	1.90	1.83	1.79	1.88
4	Carène<Delta-3->	1101	1290	0.25	0.23	0.28	*	*	*
5	Limonène	1030	1206	95.20	93.16	95.00	90.25	90.34	89.38
6	Terpinène<Gamma->	1103	1285	*	*	*	3.65	3.78	3.90
Monoterpènes oxygénés				0.67	0.64	0.29	0.81	1.16	0.57
7	Linalol	1125	1538	0.41	0.27	0.15	0.29	0.62	0.27
8	Citronellal	1167	1478	0.03	0.02	0.04	0.08	0.04	0.08
9	Terpin-4-ol	1191	1590	0.01	0.12	*	0.05	0.08	0.01
10	Terpinoléol<Alpha->	1203	1677	0.06	0.09	0.02	0.18	0.16	0.10
11	Nérol	1237	1781	*	*	*	*	*	*
12	Néral	1268	1670	0.07	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01
13	Géraniol	1271	1828	*	*	*	*	*	*
14	Géranial	1284	1714	0.07	0.03	0.04	*	*	*
Sesquiterpènes				0.18	0.29	0.38	0.23	0.24	0.35
15	Elemène<Béta->	1373	1583	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03	0.04
16	Caryophyllène<E->	1391	1594	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01
17	Bergamotène<Alpha-Trans->	1437	1577	*	*	*	*	*	*
18	Humulène<Alpha->	1450	1657	*	*	*	0.01	*	0.01
19	Farnésène<(E)-Béta->	1453	1650	*	*	*	0.01	0.02	0.04
20	Germacrène D	1477	1696	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.08
21	Valencène	1488	1705	0.13	0.13	0.26	0.15	0.12	0.10
22	Bisabolène<(Z)-Alpha->	1498	1761	*	*	*	*	*	*
23	Bisabolène<Béta->	1508	1718	*	*	*	*	*	*
Sesquiterpènes oxygénés				0.02	0.03	0.02	0.02	0.04	0.05
24	Elémol	1540	1381	*	*	*	*	*	0.01
25	Nérolidol<E->	1555	2026	*	*	*	*	*	*
26	Bisabolol<Alpha->	1684	2212	*	*	*	*	*	*
27	Nootkatone	1799	2250	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Autres Composés oxygénés				0.43	0.31	0.18	0.06	0.07	0.03
28	Nonanal<N->	1126	1400	0.06	0.04	0.02	*	*	*
29	Citronellyl Acétate	1342	1645	*	*	*	0.01	0.01	0.01
30	Néryl Acétate	1351	1706	*	*	*	0.01	0.03	0.01
Composés oxygénés totaux (%)				1.12	0.98	0.49	0.89	1.27	0.65
Composés non oxygénés totaux (%)				98.51	96.53	98.83	97.71	98.04	97.59

^a Composés d'huiles essentielles triés par famille chimique et taux calculés par GC-FID sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^b Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^c Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire CarbowaxTM – PEG.

La composition chimique des huiles essentielles des trois variétés de *Citrus sinensis L. Osbeck* est principalement constituée de composés hydrocarbonés, le Limonène et le β -Myrcène étant les plus abondants. L' α -Pinène, et le Δ -3-Carène sont identifiés dans la quasi-totalité des variétés. La fraction oxygénée, très minoritaire, est principalement composée de Linalol, de deux aldéhydes (Néral, Géranial) dont les teneurs ne dépassent pas 0,14% et de l' α -Terpinéol. La composition chimique de l'huile essentielle de zestes du pomelo « Marsh Seedless » est caractérisée par une teneur en Limonène très importante à raison respectivement de 95,05 %, 94,21 % et 94,54% dans l'huile issue d'une MHG, HD et CP. Les autres constituants hydrocarbonés présents en quantité souvent appréciable sont le β -Myrcène (1,73-1,81-1,55%), l' α -Pinène (0,41 – 0,45 – 0,27 %), et le (E)-Caryophyllène (0,17 – 0,20 – 0,72 %). En ce qui concerne les composés oxygénés, le Linalol est identifié dans tous les échantillons (0,17 – 0,18 – 0,07 %), ainsi que la Nootakone dans les proportions suivantes : 0,07 – 0,13 – 0,15%.

Une des principales caractéristiques des agrumes est leur capacité d'hybridation. Ainsi il existe de nombreux hybrides interspécifiques ou intergénériques. Parmi les plus utilisés, les tangelos sont issus du croisement entre *Citrus deliciosa* Ten ou *Citrus tangerina* Hort. ex Tan et *Citrus paradisi* Macf. La composition des huiles essentielles de la variété « Tangelo seminole » étudiée dans ce travail se caractérise par de très fortes teneurs en Limonène (90,25 – 90,34 – 89,38 %). Les autres hydrocarbures monoterpéniques présents dans la quasi-totalité des échantillons sont d'une part, le β -Myrcène (1,83 – 1,79 – 1,88 %), le γ -Terpinène (3,65 – 3,78 – 3,90) identifiés avec des teneurs appréciables et d'autre part, l' α -Pinène (0,52 – 0,83 – 0,91 %), le β -Pinène (0,36 – 0,38 – 0,37 %) présents en de très faibles teneurs. La fraction oxygénée, très minoritaire, est composée principalement de Linalol (0,29 – 0,62 – 0,27 %), de l' α -Terpinéol dont les teneurs ne dépassent pas 0,18 % respectivement dans chacune des 3 extractions MHG, HD et CP.

Nous remarquons une très grande similitude dans la composition chimique des huiles essentielles de zestes de la variété « Villa França », et de celle de la variété « Eurêka ». Les monoterpènes cycliques constituent de 92,10 à 93,73% de la composition globale de l'Eurêka et de 88,39 à 93,60 % de la variété Villa França. Après le Limonène qui a atteint son plus grand taux suite à une extraction par MHG chez l'Eurêka (69,65 %) et par CP chez Villa França (71,86 %), nous trouvons des composés dont les teneurs varient de 0,11 à 15,35% : γ -Terpinène avec la plus grande teneur (8,25%) obtenue par MHG pour l'Eurêka et par CP pour le Villa França (8,90 %). Par contre, le β -Pinène a eu son plus grand taux par HD (15,35 %) pour l'Eurêka et par CP (9,24 %) pour le Villa França. Le β -Myrcène a une teneur beaucoup moindre (1,57 % par MHG/Eurêka et 1,55 % par CP/Villa França). Il en est de même pour l' α -Pinène (1,75 % par

HD/Eurêka et 1,53 % par MHG/Villa França). La fraction oxygénée ne dépasse pas 4,78 %. A coté du Géranial (1,30 % par CP/Eurêka et 1,82 % par CP/Villa França), on trouve le Néral (0,77 % par CP/Eurêka et 1,06 % par CP/Villa França) et le Linalol (0,20 % par MHG/Eurêka et 0,35 % par HD/Villa França).

Nous notons l'absence totale de p-Cymène dans toutes les huiles des variétés d'agrumes testées. Quinetero et *al.* (2003), ont considéré que le procédé d'extraction est adéquat uniquement lorsque l'huile essentielle obtenue ne contient pas de p-Cymène, considéré comme un bon indicateur de l'oxydation des monoterpènes dans les HE d'agrumes.

Selon la technique d'extraction utilisée, les huiles essentielles de zestes sont dominées par le Limonène tandis qu'une importante variabilité a été observée dans les teneurs relatives à la fraction oxygénée. La Figure 33 permet de comparer, selon le procédé d'extraction, les pourcentages en composés oxygénés. Nous remarquons surtout la forte diminution de la concentration en aldéhydes et en alcools des essences obtenues par expression à froid. Pour les essences distillées, le décalage par rapport aux essences obtenues par MHG est moins accentué. Les plus fortes teneurs en fractions oxygénées ont été enregistrées dans les variétés de citrons avec le lime en première place suite à une extraction de son huile essentielle par MHG suivi par l'Eurêka qui a conduit à une grande teneur par le biais de l'HD et enfin le Villa França qui a eu des teneurs presque similaires entre les trois méthodes d'extraction. Pour le reste des variétés d'agrumes, on a enregistré des teneurs identiques chez la Valencia Late et le Tarocco avec la technique MHG, et chez la variété Marsh Seedless et Tangelo Seminole avec le mode HD.

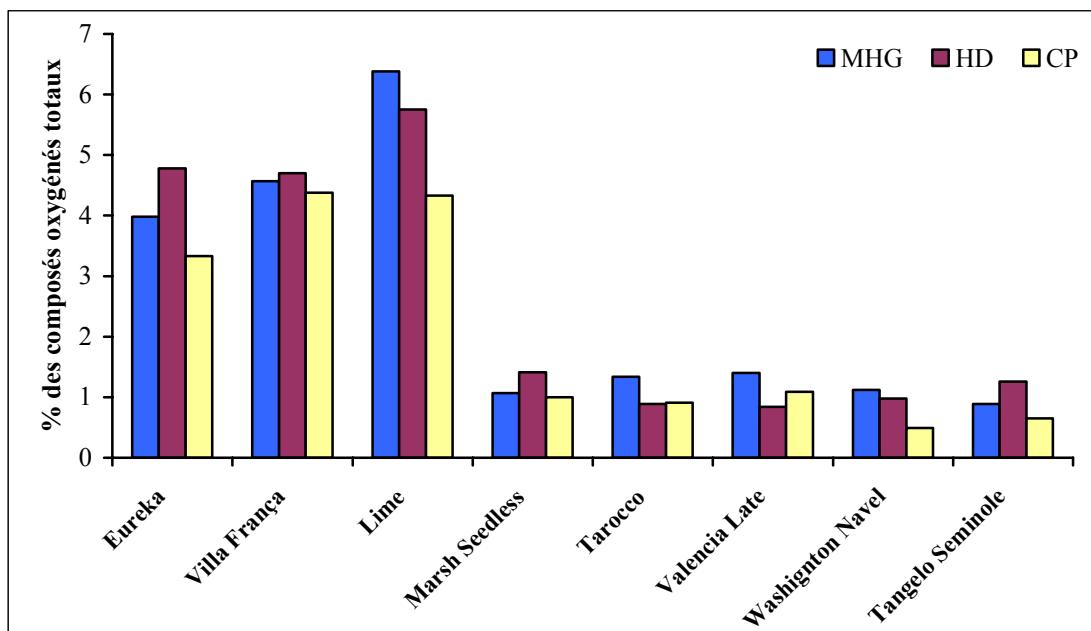


Fig. 33 : Proportion de la fraction oxygénée au sein des huiles essentielles de 8 variétés d'agrumes.

6 – Classification des huiles essentielles par Analyse de données multidimensionnelles

Nous avons utilisé deux méthodes d'analyse de données multidimensionnelles : l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) d'une part pour l'étude statistique de la composition des vingt quatre huiles essentielles obtenues et d'autre part pour pouvoir différencier les trois techniques d'extraction MHG, HD et CP (Mouly et al., 1995 ; 1996). L'ACP est une méthode descriptive qui permet d'extraire les composantes principales en donnant le maximum d'informations. Elle décrit et classe les échantillons étudiés dans des espaces de dimensions plus réduites afin d'observer l'homogénéité ou l'hétérogénéité des individus et d'en connaître la cause. L'ACP consiste à exprimer un ensemble de variables en un ensemble de combinaisons linéaires de facteurs non corrélés entre eux, ces facteurs rendant compte d'une fraction de plus en plus faible de la variabilité des données. La représentation des données dans des espaces de faible dimension – deux dimensions dans notre cas – en facilite considérablement l'analyse.

L'Analyse Factorielle Discriminante (AFD) est une méthode permettant de modéliser l'appartenance à un groupe d'individus en fonction des valeurs prises par plusieurs variables, puis de déterminer le groupe le plus probable pour un individu, connaissant uniquement les valeurs des variables qui le caractérisent. L'AFD peut être considérée comme une extension de la régression multiple dans le cas où la variable à expliquer est une variable qualitative décrivant des groupes. L'AFD permet d'obtenir une meilleure séparation des groupes préalablement constitués, grâce à des caractères discriminants qui véhiculent le maximum d'informations. Elle permet, en outre, d'affecter les individus aux groupes dont ils sont les plus proches. L'ACP mène donc à L'AFD bien qu'il s'agisse de deux démarches distinctes, mais complémentaires (Stafford et Bodson, 2006 ; Saporta, 2006 ; Smadja, 1987).

Pour le traitement des résultats, nous avons opté pour le logiciel XLSTAT. Le type d'ACP choisi est Pearson, ce qui signifie que les calculs seront basés sur une matrice composée des coefficients de corrélation de Pearson, coefficients de corrélation classiquement utilisés. Le premier graphique particulier à la méthode est le cercle des corrélations (figure 34). Il correspond à une projection des variables initiales sur un plan à deux dimensions constitué par les deux premiers facteurs. Lorsque deux variables sont loin du centre du graphique :

- si elles sont proches l'une de l'autre, alors elles sont significativement corrélées positivement (r proche de 1).
- si elles sont orthogonales l'une par rapport à l'autre, alors elles sont significativement non corrélées (r proche de 0).

- si elles sont symétriquement opposées par rapport au centre, alors elles sont significativement corrélées négativement (r proche de -1).

- lorsque les variables sont relativement proches du centre du graphique, alors toute interprétation est hasardeuse et il est nécessaire de se référer à la matrice de corrélations à d'autres plans factoriels pour interpréter les résultats.

Dans notre étude, nous pourrions déduire, de la Figure 34 représentant le cercle des corrélations des variables des huiles essentielles, que les axes F1 et F2 véhiculent respectivement 56,74 % et 13,82 % de l'information totale. Le cercle des corrélations est aussi utile pour interpréter la signification des axes. Nous constatons que l'axe F1 est fortement corrélé positivement avec les variables myr (+0,939), limo (+0,986), lina (+0,348), et négativement avec pina (-0,953), citro (-0,709), terpo (-0,509), terpi (-0,894), nera (-0,907), cary (-0,594) et nona (-0,226). L'axe F2 est corrélé positivement avec la variable pina (+0,090), myr (+0,133), lina (+0,485), citro (+0,266), terpo (+0,237), terpi (+0,179) et nona (+0,721) et négativement avec limo (-0,047), nera (-0,088) et cary (-0,658).

Ces tendances sont particulièrement intéressantes pour l'interprétation du graphique des individus. Pour confirmer le fait qu'une variable est fortement liée à un facteur, il suffit de consulter la table des cosinus : plus le cosinus est élevé (en valeur absolue), plus la variable est liée à l'axe. Plus le cosinus est proche de zéro, moins la variable est liée à l'axe. Dans notre cas, nous avons 6 variables fortement liées à F1 pina (0,909), myr (0,882), limo (0,972), citro (0,503), terpi (0,800) et nera (0,823) ; et 2 variables sont liés à l'axe F2 : cary (0,433) et nona (0,520).

La Figure 35 correspond à l'un des objectifs de l'ACP. Elle permet de représenter les individus sur une carte à deux dimensions et ainsi d'identifier les tendances. Nous voyons dans notre exemple que sur la base des variables dont on dispose, les variétés d'agrumes étudiés se répartissent selon 2 groupes suivant l'axe F1. Le groupe II, est numériquement très important puisqu'il est constitué de 5 variétés (Marsh Seedless, Tangelo Seminole, Valancia Late, Washington Navel, Tarocco).

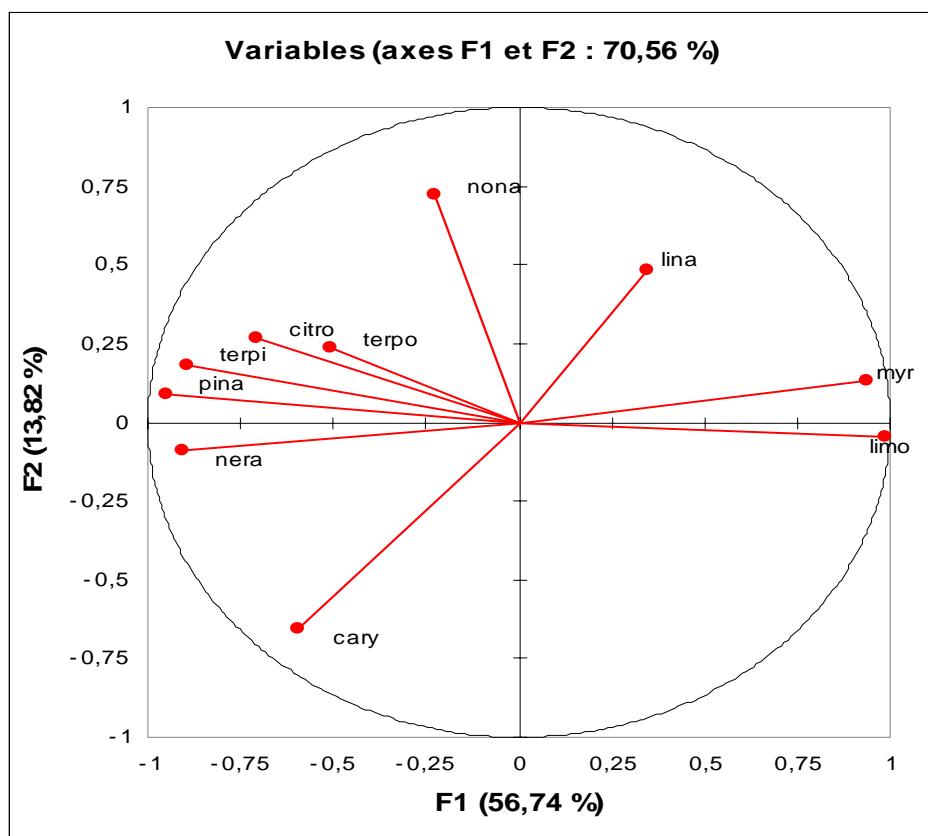


Fig. 34 : Cercle des corrélations des variables des huiles essentielles.

Nombre de variables 10 : α -pinène (pina), limonène (limo), myrcène (myr), linalol (lina), citronellal (citro), terpin-4-ol (terpo), α -terpinéol (terpi), néral (nera), E-caryophyllène (cary), n-nonanal (nona).

La composition des huiles essentielles est dominée par le limonène (comprise entre 93,16% et 95,48%). Le groupe I, est constitué de 3 variétés seulement de citron, le lime, Villa França et l'Eurêka. En comparant ces données, nous voyons que la teneur en limonène ne dépasse pas 71,86%. En revanche nous observons que d'autres composés sont très discriminants. Ainsi, la teneur en α -pinène est supérieure à 1% dans le groupe I alors qu'elle est inférieure ou égale à 0,53 % dans le groupe II. De même, l' α -terpinéol varie de 0,21 à 0,53% dans le groupe I alors qu'il ne dépasse pas 0,09 % dans le groupe II. Nous remarquons également que le taux de néral fluctue de 0,53 à 1,66% dans le groupe I alors que ce composé intervient avec de très faibles teneurs (<0,07%) dans la composition de tous les échantillons du groupe II. Enfin, le géranal du groupe I se distingue du précédent par un taux plus élevé (0,85-2,23%) alors qu'il ne dépasse pas 0,09 % dans le groupe II.

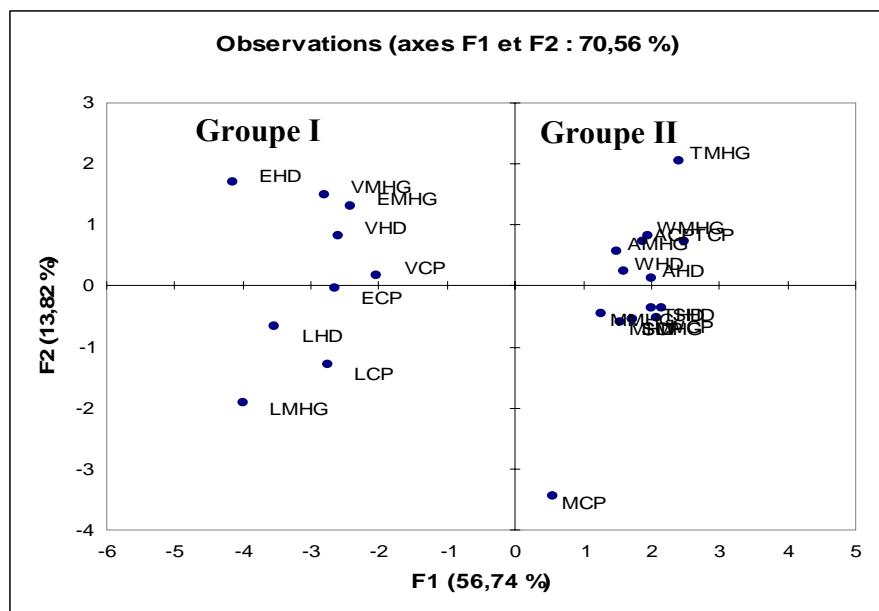


Fig. 35 : La projection des individus des HE de 8 agrumes issues des trois méthodes d'extraction MHG, HD et CP. Variétés : Lime (L), Eurêka (E), Villa França (V), Valancia Late (A), Tangelo Seminole (S), Marsh Seedless (M), Tarocco (T), Washington Navel (W).

L'objectif de cette méthode AFD est de produire de nouvelles variables (axes factoriels appelés également variables discriminantes) qui séparent au mieux les groupes à partir d'un ensemble d'individus répartis dans des groupes décrits par plusieurs descripteurs.

L'AFD a été réalisée sur les huit variétés d'agrumes étudiées en considérant, les groupes relatifs aux méthodes d'extraction afin de mettre en évidence l'influence de chaque méthode sur l'ensemble des variétés. Dans notre cas, nous constatons que deux axes factoriels ont été produits. Le Tableau 23 représente les valeurs propres et le pourcentage de variance correspondant. Notons que 87,53% de la variance est représentée par le premier facteur.

Tableau 23 : Valeurs propres et pourcentage de variance

	F1	F2
Valeur propre	2,96	0,42
% Variance	87,53	12,47
% Cumulé	87,53	100,00

Sur la Figure 36, les individus sont affichés sur les axes factoriels. Ce graphe permet de confirmer que les individus sont bien discriminés sur les axes factoriels obtenus à partir des variables explicatives initiales. Il ressort de cette étude que les huiles essentielles de zestes de huit variétés d'agrumes obtenues par MHG, HD et CP sont caractérisées par une grande variabilité tant par la nature des produits identifiés que par leurs proportions relatives. En effet,

les vingt quatre huiles essentielles analysées se répartissent selon trois groupes distincts représentant chacun une technique d'extraction parmi MHG, HD et CP.

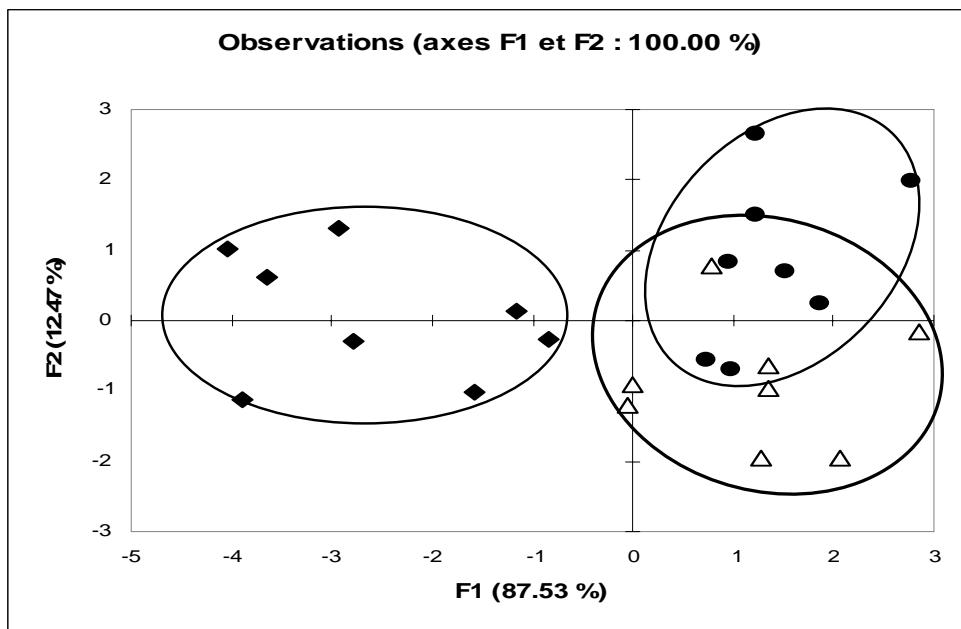
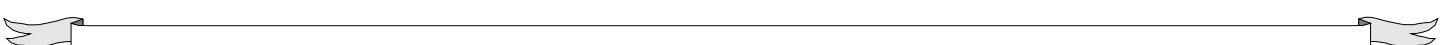


Fig. 36 : Analyse factorielle discriminante mesurée sur huit variétés d'agrumes en considérant les méthodes d'extraction MHG (●), HD (◆) et CP (Δ) en tant que variable dépendante et les 10 composés volatils comme variable explicative.

Nous observons que l'AFD montre une intersection entre les deux groupes MHG et CP. Cela signifie que les variables présentent des caractéristiques semblables dans ces deux méthodes. Par conséquent, nous constatons que la méthode MHG fournit des résultats comparables à la CP, cette dernière ayant toujours été considérée comme la méthode de référence pour l'extraction des essences d'agrumes.



Chapitre II : Extraction par Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité du Romarin

1 – Introduction

Dans ce chapitre sur l'extraction du romarin par hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (MHG), nous avons tout d'abord optimisé les conditions expérimentales d'extraction pour les comparer tant sur les plans qualitatif que quantitatif avec les résultats précédemment obtenus par la méthode conventionnelle HD. Ensuite, nous avons évalué et comparé les pouvoirs antimicrobiens et antioxydants de ces HE.

Enfin, pour une meilleure compréhension du phénomène encouru dans l'extraction MHG une étude sensorielle et une examination des surfaces des feuilles de romarin par microscopie électronique à balayage avant et après chaque traitement ont été effectuées.

2 – Extraction de l'huile essentielle de romarin par la méthode MHG

Le choix de la puissance d'irradiation micro-ondes est important pour s'assurer d'une extraction rapide de l'huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.). Pour cela, différentes puissances (200, 400, 600, 800 et 1000 W) d'irradiation micro-ondes ont été testées. Toutefois, comme, nous avons obtenu des résultats similaires à ceux trouvés dans le chapitre précédent des citrus, nous avons alors opté dans cette étude, pour une puissance de 500 W d'irradiation micro-ondes pour l'extraction de l'HE présente dans 500 g de romarin et uniquement pour un interval de temps équivalent à 15 min.

Le Tableau 24 présente les rendements en huile essentielle de romarin « *Rosmarinus officinalis* L. » obtenue respectivement soit par MHG, soit par HD. Après seulement 15 minutes, la méthode MHG a fourni une quantité d'huile essentielle équivalente à celle obtenue par HD après 180 minutes.

Tableau 24 : Rendement en HE de romarin selon deux méthodes d'extraction.

	Méthode d'extraction	
	MHG	HD
Temps d'extraction (min)	15	180
Rendement (%)	0,33 ± 0,09	0,35 ± 0,07

3 – Composition de l'huile essentielle de feuilles de romarin collectées à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach – Alger (Ex-INA)

Les résultats des analyses par GC et GC/MS des huiles essentielles (méthodes MHG et HD) sont présentés dans le Tableau 25 dans lequel les composés sont identifiés par leurs indices de rétention et selon leur ordre croissant d'élution. L'analyse quantitative a atteint les taux de 96,63% et 99,55% respectivement pour les méthodes HD et MHG avec un total de 32 composés identifiés.

La plupart des composés volatils actifs identifiés, dans cette essence sont : l'alpha-pinène, le camphre, la verbénone et le camphène, mais leur proportion dépend de la technique d'extraction utilisée. Des taux de composés oxygénés légèrement plus grands sont présents dans l'essence de romarin isolée par la méthode MHG que par HD. Les hydrocarbures monoterpéniques (alpha-pinène...etc.) sont présents en quantités équivalentes dans les deux essences (MHG et HD), mais l'huile obtenue par MHG est un peu plus concentrée en composés oxygénés. L'huile essentielle isolée des feuilles de romarin, soit par MHG ou HD contient le même élément dominant : l'alpha-pinène, est le composant principal abondant dans l'huile essentielle extraite de *Rosmarinus officinalis L.* avec des teneurs équivalentes (43,6% et 44,05%, respectivement pour MHG et HD).

Le camphre principal composant oxygéné existe avec des teneurs différentes, pour les deux méthodes d'isolement : 8,6% par la méthode MHG et 7,82% par la méthode HD.

Les hydrocarbures monoterpéniques ont une importance commerciale moins marquée que les composés oxygénés par suite de la meilleure contribution de ces derniers à l'odeur de l'huile essentielle. Inversement, les composés oxygénés sont très odorants donc plus précieux (Cheetham, 2010 ; Phi et al., 2006 ; Smith et al., 2005 ; Sawamura et al., 2004 ; Arctander, 2003; Di Giacomo et Di Giacomo, 2002). Une plus grande proportion de composés oxygénés a été détectée dans l'huile essentielle issue de la méthode MHG, due sans doute à la diminution des effets thermiques et hydrolytiques par rapport à la méthode HD où une grande quantité d'eau est utilisée. Les huiles essentielles contiennent des composés organiques qui absorbent fortement le rayonnement micro-ondes. De plus, les composés, avec des moments dipolaires élevés ou faibles peuvent être recueillis dans des proportions diverses, après une extraction assistée par micro-ondes.

Tableau 25 : Composition des huiles essentielles de Romarin obtenues respectivement par MHG et par HD.

N°	Composés ^a	I.R. ^b	I.R. ^c	Romarin	
				MHG	HD
Monoterpènes				68.60	68.56
1	Tricyclène	921	1011	0.26	0.26
2	Pinène <Alpha->	936	1023	43.60	44.05
3	Camphène	951	1103	6.48	6.14
4	Verbénène	955	1121	1.11	0.77
5	Pinène <Béta->	980	1109	2.20	2.61
6	Myrcène	995	1149	1.82	1.94
7	Phéllandrène <Alpha->	995	1165	0.34	0.31
8	Carène <Delta-3->	1014	1290	0.1	0.08
9	Terpinène <Alpha->	1020	1083	1.00	0.86
10	Para-Cymène	1025	1250	1.50	1.27
11	Limonène	1030	1206	5.53	5.48
12	Terpinène <Gamma->	1052	1251	3.01	3.08
13	Terpinolène	1092	1287	1.65	1.71
Monoterpènes oxygénés				28.10	24.87
14	Linalol	1106	1538	2.39	2.00
15	Campholénal <Alpha->	1122	1471	1.32	1.24
16	Camphre	1149	1514	8.60	7.82
17	Pinocarvone	1160	1548	1.81	1.33
18	Bornéol	1173	1679	2.71	2.57
19	Terpin-4-ol	1184	1590	2.11	2.07
20	Terpinoléol <Alpha->	1198	1677	0.87	0.77
21	Verbénone	1207	1696	7.65	6.37
22	Géraniol	1279	1828	0.64	0.70
Sesquiterpènes				1.41	1.91
23	Caryophyllène <E->	1425	1470	0.76	0.95
24	Humulène <Alpha->	1450	1657	0.35	0.42
25	Curcumène <Gamma>	1469	1738	0.04	0.04
26	Bisabolène <Béta->	1508	1714	0.22	0.43
27	Sesquiphéllandrène <Béta->	1519	1776	0.04	0.07
Sesquiterpènes oxygénés				0.25	0.26
28	Caryophyllène oxide	1570	1977	0.11	0.10
29	Bisabolol <Alpha->	1684	2022	0.14	0.16
Autres Composés oxygénés				1.19	1.03
30	Bornyl acétate	1263	1579	0.95	0.81
31	Méthyl eugénol	1397	2032	0.13	0.12
32	Z-Methyl jasmonate	1635	2349	0.11	0.10
Temps d'Extraction (min.)				15	180
Rendement (%)				0.33 ± 0.09	0.35 ± 0.07
Composés oxygénés totaux (%)				29.54	26.16
Composés non oxygénés totaux (%)				70.01	70.47

^a Composés d'huiles essentielles triés par famille chimique et taux calculés par GC-FID sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^b Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire non polaire HP5MSTM.

^c Indices de rétention calculés sur une colonne capillaire polaire CarbowaxTM – PEG.

Les composés organiques, tels que les composés oxygénés, qui ont un moment dipolaire élevé vont interagir plus vigoureusement avec l'irradiation micro-ondes et l'on peut extraire plus facilement, au contraire, des composés aromatiques qui ont des moments dipolaires faibles (comme les hydrocarbures monoterpéniques).

Plusieurs études récentes ont montré que la variabilité de la composition et du rendement en huile essentielle de romarin est due à des facteurs intrinsèques (génétique, sous-espèces et âge de la plantation) ou à des facteurs extrinsèques comme le climat et les conditions de culture (origine géographique) ou à la méthode d'extraction. Özcan et Chalchat (2008), ont étudié la composition de l'huile essentielle de romarin provenant de Turquie et identifié 20 composés, avec le para-cymène (44 %), le linalol (21%), le gamma-terpinène (17 %), le béta-pinène (3,6 %), l'alpha-pinène (2,8 %), le 1,8 Cinéole (2,6 %) et le thymol (1,8 %) qui sont des composés majoritaires.

Différentes espèces de romarin existent dans le monde : *R. officinalis*, *R. erviocalyx*, *R. laxiflorus* et *R. lavandulaceus* ; Cependant, *R. officinalis* est l'espèce la plus répandue dans le bassin méditerranéen. Varela et al. (2009), ont étudié 87 populations spontanées de *R. officinalis* collectées en Espagne et les ont classées en prenant en considération la composition chimique de leurs huiles essentielles. Parmi tous les échantillons, trente-huit (38) d'entre eux ont une teneur élevée en 1,8 cinéole (> 24%) et un rendement en huile essentielle supérieur à 2% ; six populations ont présenté un rapport 1,8 Cinéole / linalol élevé ; trois échantillons ont une teneur élevée en linalol, et seulement deux échantillons présentent des teneurs élevées en verbénone (\approx 5%).

L'huile essentielle issue des feuilles fraîches de romarin étudiée dans ce travail, peut être considérée comme un chémotype à alpha-pinène puisque ce dernier présente des teneurs assez élevées dépassant les 43 %. Les résultats des travaux de Flamini et al. (2002), corroborent les nôtres où ils ont trouvé le taux le plus élevé en alpha-pinène (30,3 %) dans les essences extraites des feuilles séchées de la partie inférieure de la population de romarin appartenant à l'écotype Cevoli (Cevoli di Lari, Province Pisa - Nord d'Italie) par rapport aux huiles essentielles issues des feuilles de l'apex et des fleurs. De plus, ils ont cueilli leur matière végétale à partir de cultures de romarin âgé de plus de 10 ans, choix similaire au nôtre pour l'extraction des huiles essentielles. La principale différence existant avec nos échantillons, est la fraîcheur des feuilles. Diaz-Maroto et al. (2007), ont démontré que, relativement aux herbes fraîches, les herbes séchées perdaient faiblement et aisément leurs qualités durant le stockage et leur transport. De plus, la déshydratation des herbes qui peuvent être améliorées en employant différents méthodes

et en même temps peuvent affectées les différents activités du romarin ainsi que sa composition aromatique (Jaloszynski et al., 2008).

4 – Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle

Les résultats du suivi de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de romarin par la méthode MHG et HD sont représentés respectivement dans les figures 37 (a) et (b) ci-dessous.

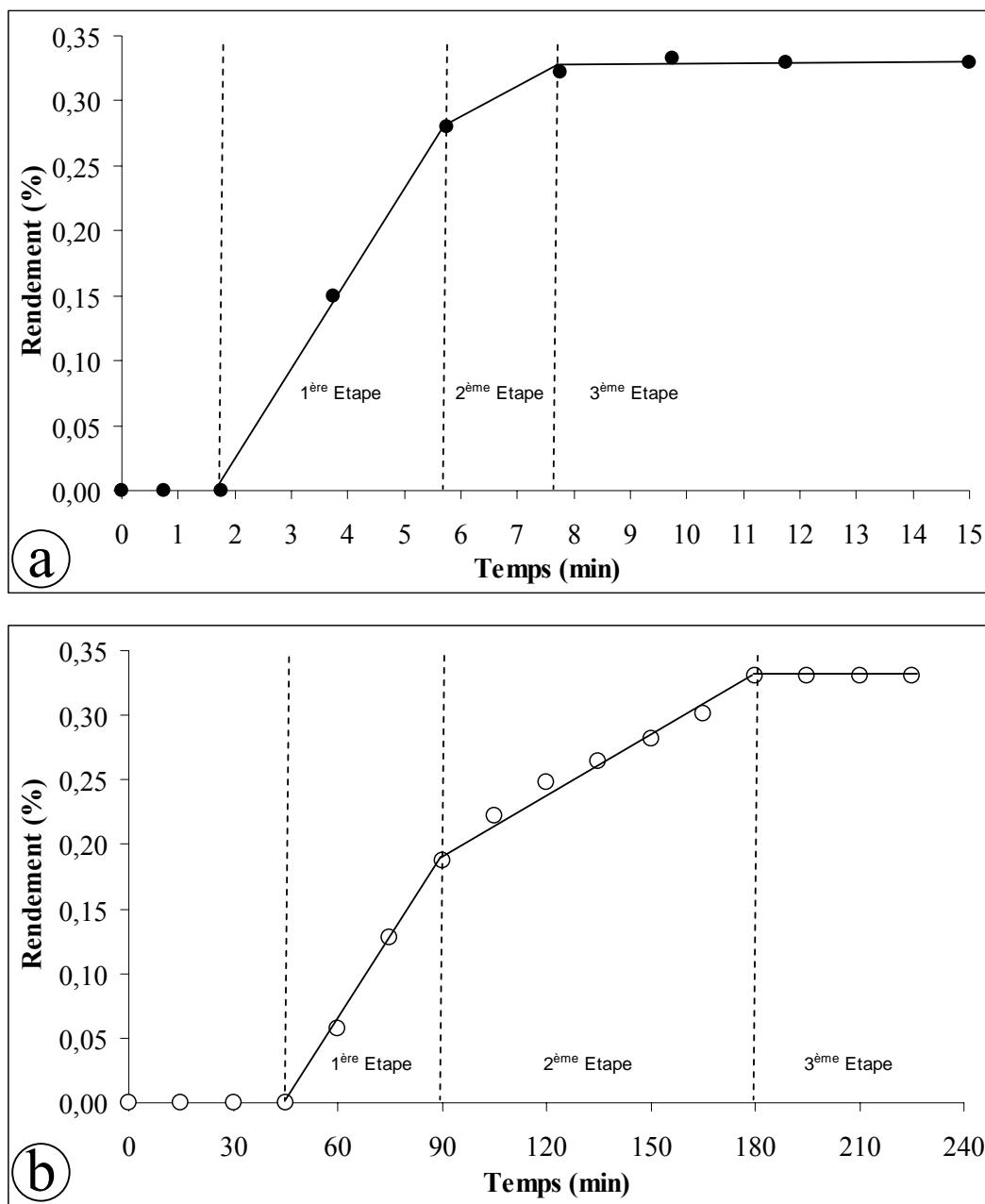


Fig. 37 : Cinétique de l'extraction de l'HE des feuilles de romarin par MHG (a) et HD (b).

Les rendements en huile essentielle extraite de romarin *Rosmarinus officinalis L.* avec les différentes méthodes d'isolement sont respectivement de $0,35 \pm 0,07\%$ et $0,33 \pm 0,09\%$ pour HD et MHG. Comme le montre les Figures 37 (a) et (b), un temps d'extraction de 15 minutes avec

MHG fournit des rendements similaires à ceux obtenus après 180 min par le biais de la HD, qui est l'une des méthodes de référence d'extraction d'une huile essentielle. Trois phases sont observées dans le processus de l'extraction assistée par micro-ondes (Figure 37, a). L'étape "0" représente la phase de chauffage de la température ambiante à 100°C. La première étape (étape 1) est représentée par une ligne croissante qui caractérise les premières quantités d'huile essentielle extraite, situées à la surface des particules végétales. Elles représentent approximativement 82% du rendement obtenu en 5,5 min. Cette phase est suivie d'une deuxième ligne croissante (étape 2), représente la diffusion interne de l'huile essentielle du milieu des particules vers le milieu extérieur concerné par le réchauffement de l'eau biologique située dans les cellules végétales. Dans cette étape (réalisée en 8 min), la quantité d'huile extraite représente près de 18% du rendement global. La troisième partie (étape 3) correspond à une ligne horizontale qui marque la fin du processus d'extraction. Benkaci-Ali et al. (2006), ont effectué une extraction d'huile essentielle de graines de *Nigella sativa L.* par micro-ondes et ont trouvé un profil de rendement similaire à nos résultats. Le profil de la technique d'extraction classique HD présent également trois étapes similaires mais avec des phases différentes de celles obtenues par MHG ; la première étape conduisant, en 93 min à 60% du rendement obtenu. La fin du processus d'extraction est atteinte après 180 min.

5 – Constantes physiques

Les huiles essentielles de romarin ont été analysées selon la méthode standard AFNOR afin de déterminer les constantes physiques habituelles définissant l'huile essentielle extraite soit par MHG, soit par HD : densité relative, indice de réfraction et le pouvoir rotatoire. Le Tableau 26 regroupe les résultats propres à la mesure de ces indices physiques.

Tableau 26 : Propriétés physiques de l'huile essentielle de romarin extraite par MHG et par HD.

Propriétés physiques	MHG	HD	Norme AFNOR*
Densité relative à 20°C d_{20}^{20}	0.9	0.9	0.907 – 0.920
Indice de réfraction à 20°C n_D^{20}	+ 1.468	+ 1.470	$+1.4640 \leq n_D^{20} \leq +1.4700$
Pouvoir rotatoire à 20°C $[\alpha]_D^{20}$	+ 2°	+3°	- 2° $\leq [\alpha]_D^{20} \leq +5°$

* Norme : NF ISO 1342 – Mars 2001.

La comparaison de nos résultats à ceux de la norme NF ISO 1342 – Mars 2001 relative à l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) a montré clairement que les huiles essentielles

issues des deux méthodes d'extraction (HD et MHG) sont d'une part conformes à la norme ISO et que, d'autre part, il n'y a pas de différence significative entre les constantes physiques des huiles essentielles obtenues par ces méthodes.

6 – Activité antioxydante

La détermination de l'activité antioxydante (capacité ou potentiel) des divers échantillons biologiques est généralement basée sur l'inhibition d'une réaction particulière en présence d'un antioxidant.

Dans les matrices alimentaires, les cibles les plus oxydables sont les lipides, plus précisément les acides gras polyinsaturés (LH). L'auto-oxydation des lipides est généralement initiée à l'interface des émulsions alimentaires eau-lipide par transition des traces de métaux (Fe^{2+} , Cu^+) à faible valence (Coupland et McClements, 1996). Ces espèces pro-oxydantes peuvent :

- S'auto-oxyder pour devenir des métaux de haute valence (Fe^{3+} , Cu^{2+}) avec la formation immédiate du radical superoxyde (O_2^\cdot) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- Déclencher le clivage homolytique des hydroperoxydes (peroxydes d'hydrogène, des traces d'hydroperoxydes lipidiques) avec la formation subséquente des radicaux hydroxylées (HO^\cdot , LO^\cdot) qui sont très réactifs.

Un antioxydant qui inhibe la peroxydation lipidique peut agir en fonction de plusieurs mécanismes (Larson, 1997). Les plus importants sont :

- Le piégeage rapide des radicaux lipidiques peroxydes (LOO^\cdot) qui propagent la chaîne de peroxydation (inhibition de la propagation). Ces antioxydants sont appelés antioxydants coupeurs de chaînes. L'exemple le plus courant est l' α -tocophérol (vitamine E) qui selon Huang et al. (1996) transfert son atome d'hydrogène (H-phénolique) à LOO^\cdot , et est simultanément transformé en un radical à résonance stabilisé, contrairement à LOO^\cdot , qui n'est plus en mesure de réagir avec une seconde molécule LH pour propager la chaîne.
- Le piégeage des espèces oxydantes hydrophiles formées dans la phase aqueuse agissent comme initiateurs de la peroxydation (par exemple : O_2^\cdot , HO^\cdot). Les antioxydants hydrophiles tels que les ascorbates et les polyphénols peuvent se comporter comme des inhibiteurs de l'initiation.
- La régénération d'un puissant antioxydant coupeur de chaîne par réduction du radical correspondant. Plusieurs travaux ont montré que les ascorbates et les polyphénols sont capables de régénérer l' α -tocophérol à l'interface eau-lipide.

- La formation de complexes inertes de métaux de transition et qui sont incapables de produire un générateur de radicaux comme celui mentionné ci-dessus. L'acide citrique et les polyphénols ayant un groupe catéchol (1,2-dihydroxy) peuvent agir éventuellement selon ce mécanisme.

A partir de cette vue d'ensemble simplifiée, il est clair qu'une attribution exacte de l'activité antioxydante à certains composés ou petits groupes de composés des extraits de plante est une tache difficile du fait que l'activité effective dépend de plusieurs paramètres, tels que : le type de matrice, la concentration, les formes isomériques ou l'interaction synergétique avec d'autres composés, pour l'antioxydant, son activité réductrice (capacité de livrer rapidement des atomes d'hydrogène et/ou des électrons), sa localisation dans les systèmes biphasiques eau-lipides (prédition de la balance hydrophile-lipophile (BHL)), et sa capacité de liaison au métal. Pour ces raisons, plusieurs méthodes ont été développées pour l'évaluation de l'activité antioxydante d'un extrait indépendamment de la teneur quantitative du composé individuel à qui l'activité anti-oxydante est attribuée. Plusieurs méthodes existent, simples, de coût abordable et qui ont l'habileté d'identifier l'activité effective d'un composé particulier ou d'un extrait complexe.

Les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante peuvent être classées en trois groupes :

- Méthodes indirectes : phénols totaux, réduction du Fe^{3+} , pouvoir antioxydant réduisant le fer ferrique (FRAP : *the Ferric Reducing/ Antioxidant Potential*), réaction Briggs-Rausher (BRR) et le linoléate de méthyle.
- Méthodes utilisant les métabolites de l'oxydation lipidique : rancimat, produits volatils, acides thiobarbituriques (TBA) ;
- Méthodes basées sur le piégeage d'un radical : TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*), ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), DPPH (*DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl*), PCL (*PhotoChimiLuminescence*), spectroscopie RMN¹⁹F.

Parmi la grande variété de méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante, seules quelques-unes (TEAC, DPPH, PCL, ORAC) sont aisément adaptables à la détermination de l'activité des molécules hydrophiles et des molécules lipophiles. En outre, la plupart de ces tests déterminent l'activité antioxydante dans la gamme de concentration micromolaire ; seul le test PCL est capable d'analyser l'activité antioxydante dans la gamme nanomolaire.

La photochimiluminescence est une méthode basée sur l'inhibition par des antioxydants de l'oxydation photo-induite du luminol, de plus, c'est une méthode facile, rapide à réaliser et

qui présente de nombreux avantages : elle ne nécessite pas de températures élevées pour générer des radicaux et permet de mesurer rapidement (quelques minutes) et dans le rang du nanomolaire, l'activité antiradicalaire des antioxydants liposolubles comme les huiles essentielles.

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles extraites par MHG et HD est mesuré par la période d'induction de la chimiluminescence induite par le radical superoxyde après consommation de l'antioxydant. Le signal de chimiluminescence est enregistré pendant 180 s ; les signaux produits sont exposés dans la Figure 38 et les résultats sont présentés en équivalents Trolox® dans le Tableau 27.

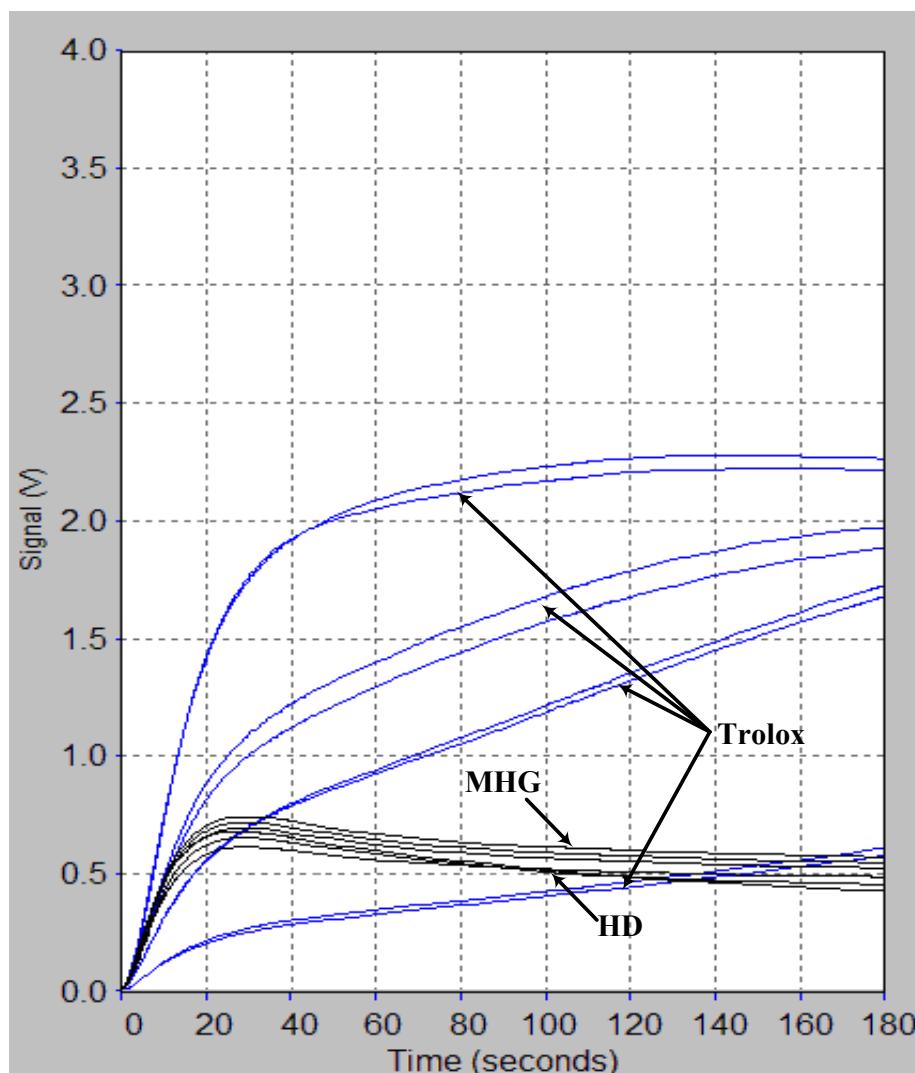


Fig. 38 : Courbes de mesures de l'activité antioxydante de différentes concentrations du standard (Trolox®) et de l'huile essentielle de romarin extraite par MHG et HD.

La Figure 38 représente les tensions proportionnelles à la luminescence produite par le dianion 3-aminophthalate formé à partir du luminol en fonction du temps.

En utilisant l'inhibition en tant que paramètre pour évaluer le potentiel antioxydant, l'inhibition est calculée grâce à l'intégration de l'aire sous la courbe. La capacité antioxydante est déterminée en comparant les résultats obtenus pour l'échantillon à ceux du standard, et en se basant sur la courbe de calibration de ce dernier. Les résultats s'expriment en unités de concentration équivalentes de Trolox®. Les calculs sont effectués automatiquement par le logiciel PCLsoft.

Tableau 27 : Résultats de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de romarin obtenu par MHG et HD.

	MHG	HD
µmol Trolox/L	4.53 ± 0.02	3.68 ± 0.06

Globalement, les activités antioxydantes de l'essence (MHG) sont supérieures à celle (HD). Les résultats obtenus avec le test PCL sont difficilement comparables à ceux de la littérature puisque d'une part, les concentrations et les temps de mesure sont assez différents entre eux et d'autre part, peu de travaux ont utilisé simultanément le test PCL et l'huile essentielle de romarin comme antioxydant.

En utilisant trois tests différents (DPPH, β-carotène, PCL), Sacchetti et *al.* (2005), ont comparé l'activité antioxydante de plus de 11 huiles essentielles, dont celle du romarin. Ils ont constaté que le test PCL confirmait bien les bons résultats trouvés pour l'activité antioxydante de l'essence de romarin ou celle des 10 autres huiles testées avec les deux autres méthodes de mesure. Cependant, ces auteurs, ont donné la valeur de $66,0 \pm 4,2$ µmol de Trolox/L par le test PCL, valeur, de loin, plus importante que la notre. Toutefois, un regard sur la composition de l'huile de romarin employée par Sacchetti et *al.* (2005) : [α -pinène (6,65 %), camphène (2,29%), 1,8-cinéole (7,26%), Linalol (2,18%), camphre (14,6 %), verbénone (21,76%), géraniol (5,75%), acétate de bornyle (12,3%), Bornéol (10,4%), β -caryophyllène (6,17%)], montre que cette essence appartient au chémotype [Bornéol + acétate de bornyle > camphre], selon la classification de Tucker et Maciarello (1986), tout à fait différent ce celui propre à notre échantillon. De plus, ces auteurs n'ont pas précisé dans leur mode opératoire, les concentrations du Trolox employé et le signal de chimiluminescence n'avait été enregistré que pendant 130 s.

7 – Activité antimicrobienne

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, la technique utilisée est celle de l'aromatogramme, identique à celle de l'antibiogramme pour les

antibiotiques. C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et, en pratique, on utilise un milieu d'ensemencement solide du fait qu'il est le plus simple et plus facilement reproductible. Pour cela, après avoir ensemencé le milieu de culture avec la suspension microbienne, et en déposant un disque stérile imprégné d'huile essentielle, on incube les boîtes de Pétri dans les conditions prédéfinies. Après un temps de latence de 24h pour les bactéries et de 48h pour la levure, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, nommée aussi zone d'inhibition de la croissance microbienne, montre la destruction des germes et donne une indication précise sur l'activité antimicrobienne des huiles utilisées. Les résultats des mesures sont regroupés dans le Tableau 28 et illustrés par la Figure 39.

Tableau 28 : Diamètre des zones d'inhibition en mm des micro-organismes testés.

Micro-organismes testés	N° ATCC	Gram	MHG	HD
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	17.0 ± 0.5	12.5 ± 0.4
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	19.0 ± 0.5	15.5 ± 0.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601		24.0 ± 0.6	20.0 ± 0.6

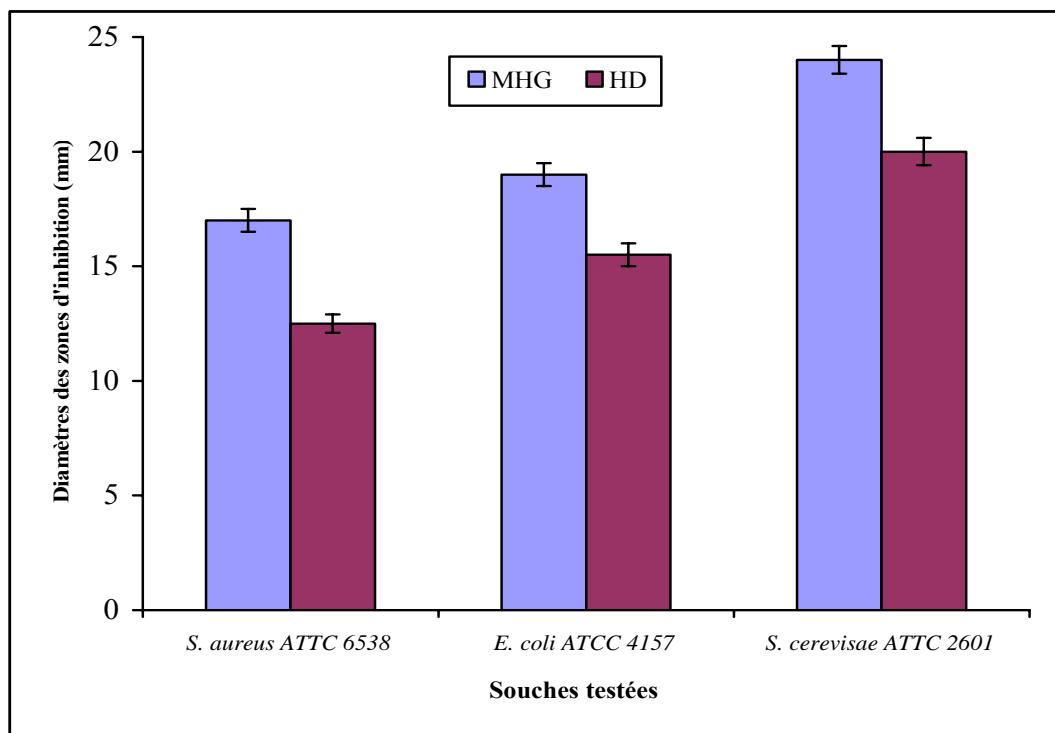


Fig. 39 : Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de romarin extraites par les méthodes MHG et HD.

Une classification des huiles essentielles en rapport avec leur spectre d'activité antimicrobienne peut être établie en fonction de l'importance du halo d'inhibition.

Une échelle de mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles fut émise par Ela *et al.* (1996) et Meena et Sethi (1994), en ordonnant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 04 classes :

- Fortement inhibitrice lorsque : $\varnothing \geq 28$ mm de la zone d'inhibition ;
- Modérément inhibitrice lorsque : $28 \text{ mm} > \varnothing > 16$ mm de la zone d'inhibition ;
- Légèrement inhibitrice lorsque : $16 \text{ mm} > \varnothing > 10$ mm de la zone d'inhibition ;
- Non inhibitrice lorsque : $\varnothing < 10$ mm de la zone d'inhibition.

Le choix des bactéries a été porté sur deux souches (*S. aureus* et *E. coli*), fréquentes en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes (Gram positif et Gram négatif). L'efficacité des produits testés ainsi que leur mode de pénétration dans la bactérie sont différents.

Ces deux espèces bactériennes sont souvent responsables d'infections nosocomiales qui constituent un problème majeur de santé publique. L'émergence de la multirésistance chez ces bactéries est une des principales causes d'échec thérapeutique.

Les résultats obtenus sont en général en accord avec les études précédemment rapportées dans la littérature. Au contact des Gram négatifs et Gram positifs, l'huile essentielle extraite des feuilles fraîches de romarin montre une action légèrement inhibitrice de la croissance de *S. aureus* et *E. coli* pour l'huile extraite par HD, mais son action devient modérément inhibitrice pour l'essence extraite par MHG. Pour la levure *S. cerevisiae*, l'HE extraite par les deux méthodes présente une action modérément inhibitrice. Par contre, la zone d'inhibition mesurée pour l'HE extraite par MHG est légèrement plus grande que celle de l'huile extraite par HD.

Dans la littérature, les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques et leurs modes d'action sur les souches microbiennes appartiennent aux Labiaceae: Thym, Origan, Sarriette, Lavande, Menthe, Romarin, Sauge et Hysope.

Zaika (1988) et Hussein (1990), ont montré que les bactéries à Gram positifs résistent mieux aux huiles essentielles, que les bactéries à Gram négatifs, ce qui est contraire aux résultats trouvés par Farbood *et al.* (1976), Farag *et al.* (1989), Jay (1996), Outtarar *et al.* (1997), Smith-Palmer *et al.* (1998), Marino *et al.* (1999), Mangena et Muyima (1999), Inouye *et al.* (2001), auteurs qui ont révélé que les bactéries à Gram positifs sont généralement plus sensibles aux huiles essentielles

que celles à Gram négatifs. De plus, parmi les bactéries Gram positifs une plus grande résistance a été décelée pour celles qui produisent de l'acide lactique.

Chao *et al.* (2000), ont expliqué que les bactéries à Gram négatifs sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une assise externe constituée de lipopolysaccharides et de protéines. Cette structure peut empêcher la prise d'huiles ou protéger la couche peptidoglycane vis-à-vis des huiles. La membrane externe de lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatifs constitue une barrière d'imperméabilité aux substances hydrophobes, susceptibles d'entrer et d'empêcher la croissance des bactéries à Gram positifs. Dans ces dernières, la couche peptidoglycane se situe à l'extérieur, permettant ainsi à ces bactéries d'être plus disponibles à entrer en contact avec les huiles (Leclerc *et al.*, 1995 ; Raven *et al.*, 2000 et Chao *et al.*, 2000).

Elgayyar *et al.* (2001) et Delaquis *et al.* (2002) sont en désaccord avec ce rapport, car pour ces auteurs, il est très difficile de faire de telles généralisations du fait que chaque essence est unique dans sa composition et chaque bactérie à Gram positif diffère considérablement l'une de l'autre en structure et en fonctionnalité.

Deans et Ritchie (1987), Deans *et al.* (1995) et Dorman et Deans (2000), ont proposé que la susceptibilité des bactéries envers les huiles essentielles, ne semble avoir qu'une petite influence sur l'inhibition de la croissance microbienne.

Dans ce travail, les huiles essentielles testées sur les différentes bactéries à Gram positifs et négatifs ont montré une action légèrement variable. L'action de nos huiles extraites par les deux méthodes sur les deux souches de test *S. aureus* (Gram⁺) et *E. coli* (Gram⁻), a montré que les HE de romarin, semblaient être préférentiellement plus actives sur les Gram⁻, tout en exerçant une activité inhibitrice plus grande contre *E. coli* pour les deux essences (HD et MHG).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles serait reliée à la nature de ses constituants majoritaires. En effet, les HE avec des teneurs élevées en hydrocarbures monoterpéniques sont rapportés être très actives vis-à-vis des microorganismes. Des hypothèses favorisant des effets nuisibles sur l'intégrité de la membrane bactérienne ont été émises par Muller et Del Moral (1966) et Lorber et Muller (1976). Cependant, la rupture de la membrane par des terpènes ont été montrées sur des bactéries à Gram positifs et négatifs (Helander *et al.*, 1998 ; Lis-Balchin *et al.*, 1998 ; Griffin *et al.*, 1999 ; Ultee *et al.*, 1998, 2000 ; Mann *et al.*, 2000 et De Feo *et al.*, 2003). Par ailleurs, le mode d'action des composants mineurs des huiles essentielles est inconnu. Delaquis *et al.* (2002), suggèrent que ces composés induisent des différences dans l'enveloppe des cellules des bactéries à Gram positifs. Leur action est fortement limitée dans les bactéries à Gram négatifs.

Conner et Beuchat (1984), ont suggéré que le mode potentiel de l'action de ces composés contre les levures pourrait être dû à l'affaiblissement des processus enzymatiques impliqués dans la production énergétique et dans la synthèse des composantes structurales. Nychas (1995), avait décrété que les phénols affectaient des bactéries en affaiblissant ou en détruisant la barrière de perméabilité de la membrane des cellules (ce qui conduisait au dégagement des constituants cellulaires), ou en changeant la teneur et la composition en acides gras et en phospholipides des bactéries, ce qui concourerait à perturber le métabolisme énergétique, le transport d'électron ou la prise d'éléments nutritifs, et à affecter la synthèse des acides nucléiques. Fondé sur ces observations, il s'avère que les composés phénoliques n'ont pas une cible simplement liée à l'activité microbienne ou à un mécanisme commun d'action (Cutter, 2000).



Chapitre III : Compréhension des phénomènes mis en jeu et mécanisme d'extraction par Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (MHG)

1 – Modifications structurales du végétal

Les observations par microscopie électronique à balayage (M.E.B.) servent d'une part, à localiser et à connaître avec grande précision, les sites producteurs d'huiles essentielles, et d'autre part, à visualiser la moindre modification après chaque opération d'extraction. En effet, les résultats de l'investigation expérimentale sur des feuilles de *Rosmarinus officinalis* L. (romarin) par M.E.B. ont montré la présence de nombreux trichomes non glandulaires appelés communément poils tecteurs, sur les veines et les extrémités des feuilles (Figure 40). Certains poils tecteurs (Figure 41) ont une forme unicellulaire, simple et de forme conique, d'autres sont pluricellulaires et ramifiés (Bottega et Corsi, 2000 ; Werker et al., 1985).

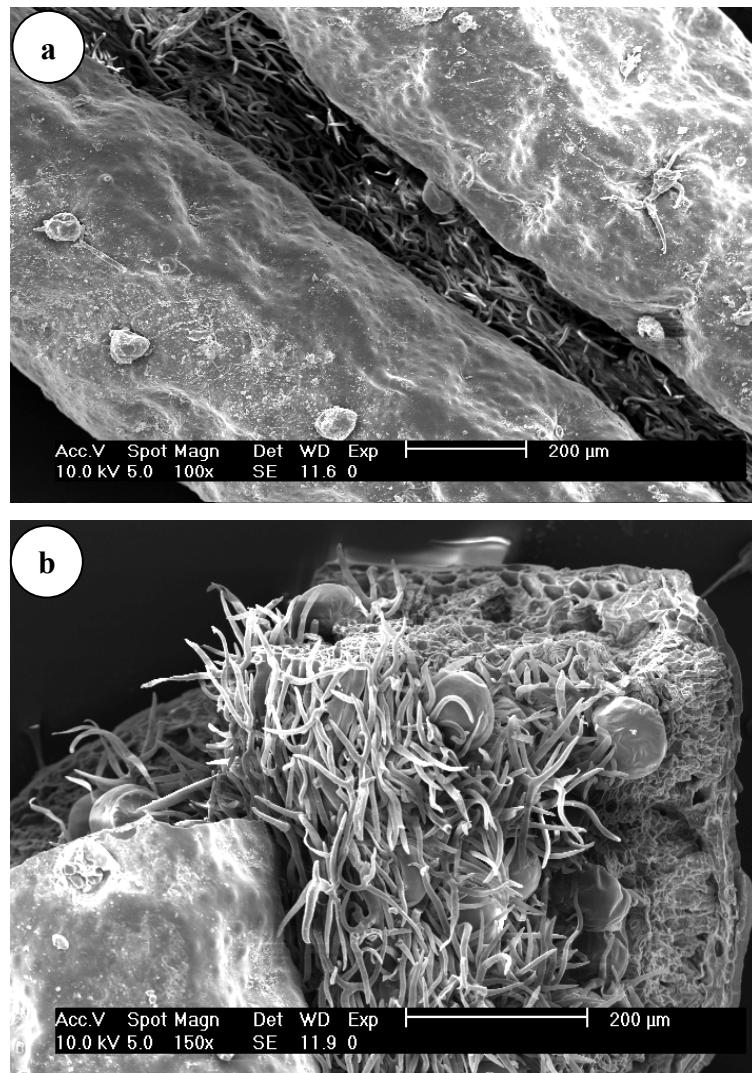


Fig. 40 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée (a) : Veine de la feuille, (b) : Extrémité de la feuille.

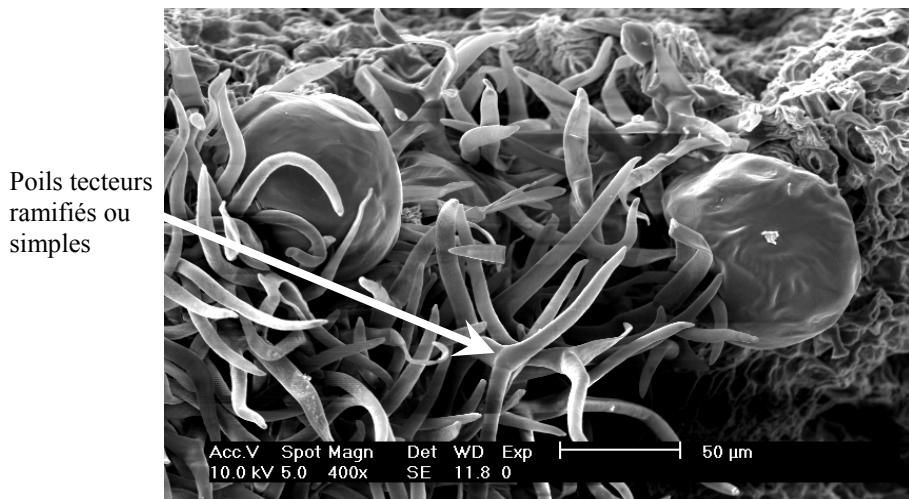


Fig. 41 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la prédominance des poils tecteurs.

Cependant, uniquement les trichomes glandulaires (poils sécréteurs) peuvent synthétiser et contenir l'huile essentielle. Deux types sont cités : les trichomes peltés et les trichomes capités (Bottega et Corsi, 2000 ; Deysson, 1978). Ces derniers (voir Figure 42), nommés aussi poils glandulaires, sont retrouvés sur la surface adaxiale et abaxiale de la feuille de romarin. Ils sont d'une part, plus nombreux que les trichomes peltés, et constituent, d'autre part, des poils sécréteurs spécifiques aux lamiacées, famille contenant le romarin (Marin et al., 2006 ; Bottega et Corsi, 2000 ; Werker et al., 1985). Les poils glandulaires sont constitués d'une seule cellule basale encrée dans l'épiderme de la feuille, d'un cou porteur court unicellulaire ou bicellulaire et d'une large tête sécrétrice constituée d'une ou de huit cellules sécrétrices disposées en rosaces. Les cellules sécrètent l'huile biosynthétisée sous la cuticule protectrice. La récupération de son contenu en huile essentielle ne se fera que par rupture de la cuticule (Wagner et al., 2004 ; Sharma et al., 2003 ; Turner et al., 1999 ; McCaskill et al., 1992 ; Gershenson et al., 1992 ; Deysson, 1978).

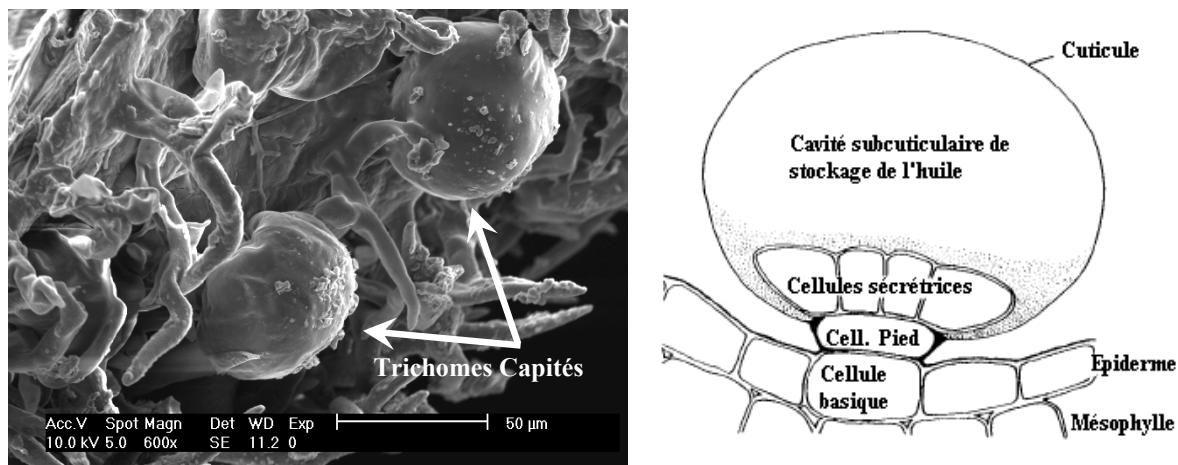


Fig. 42 : - A gauche : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la forme d'un trichome capité.

- A droite : Schéma du trichome capité d'après Wagner et al., 2004 ; Turner et al., 1999.

Les trichomes peltés (Figure 43) sont des poils glandulaires unicellulaires et à pied long. Ils prédominent les surfaces abaxiales et se localisent sur les dépressions épidermiques. Ils sont composés d'une cellule basale épidermique, de deux à trois cellules constituant le pied qui porte à son bout, une cellule sécrétrice. Les modes de sécrétion et d'excrétion des huiles essentielles sont identiques à ceux rapportés précédemment pour les trichomes capités.

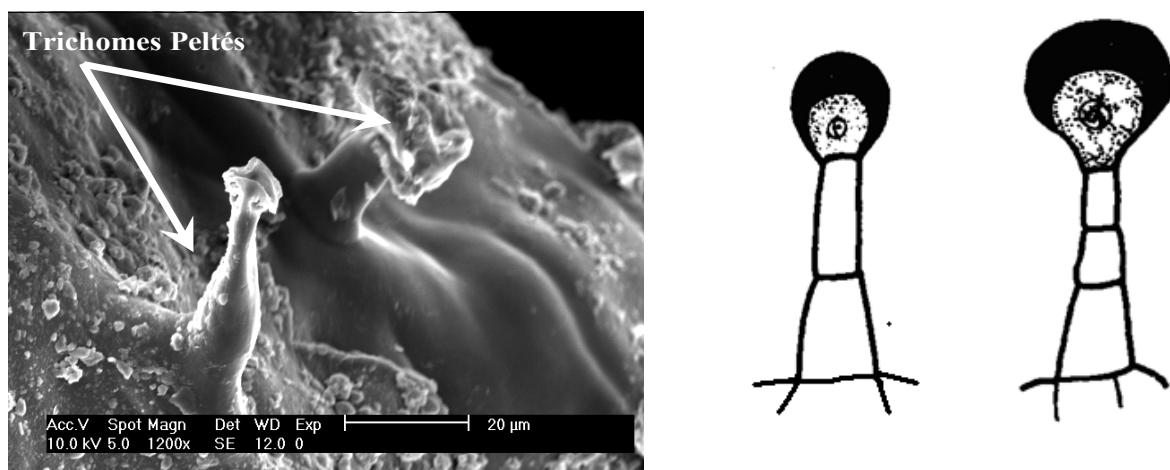


Fig. 43 : - A gauche : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin fraîche et non traitée montrant la forme des trichomes peltés,

- A droite : Schéma des trichomes peltés d'après Deysson, 1978.

Les différentes méthodes d'extraction (MHG, HD) ont conduit à des changements physiques clairement observés sur la matière végétale. Les Figures 44 (a – c) illustrent bien la comparaison des micrographies relatives à la feuille de romarin.

Dans le cas de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles fraîches de romarin par la méthode MHG, nous constatons qu'un traitement d'une durée de 15 minutes, a suffi pour engendrer des dégâts sur les cellules et sur leurs parois. Nous observons dans la Figure 44 un éclatement des parois de la cuticule d'un poils glandulaire et une déshydratation des feuilles. Ceci peut être expliqué par une élévation brutale et soudaine de la température *in-situ* des structures cellulaires, situation qui a induit d'une part, une augmentation de la pression interne de ces cellules et qui a généré d'autre part, leur destruction tout en les vidant de leur contenu.

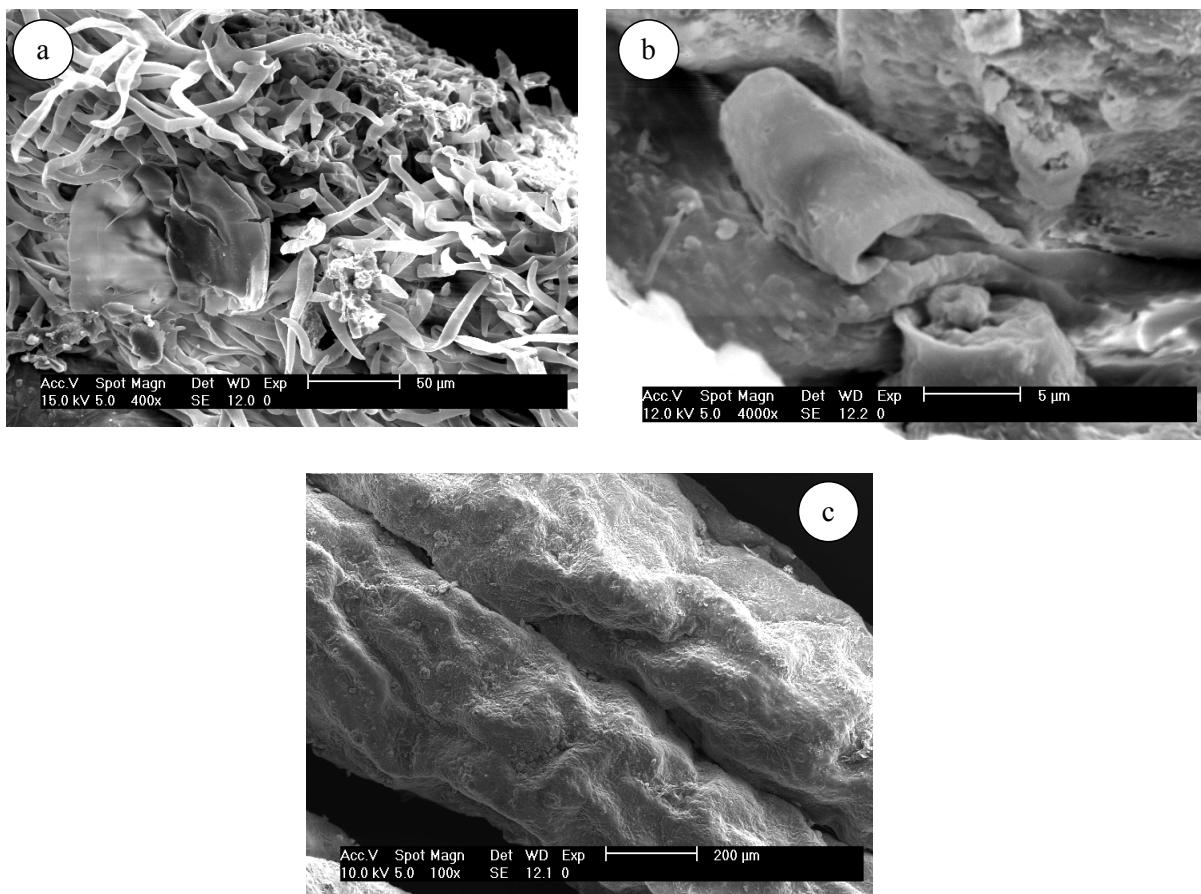


Fig. 44 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille de romarin après extraction par MHG ; (a) : trichome capité après MHG ; (b) : trichome pelté après MHG ; (c) : feuille de romarin après MHG.

En revanche, le matériel végétal soumis à l'hydrodistillation (3 heures) semble être très similaire à des matières non traitées. On peut constater une destruction partielle des glandes et une partie d'entre elles, demeurent encore remplies (Figure 45). Les changements observés pour l'extraction MHG sont nettement différents de ceux observés par HD, montrant clairement que les cellules sont brisées ou endommagées pendant le traitement par micro-ondes. Cela indique que les contraintes mécaniques induites par la décompression rapide et la vaporisation violente de l'eau ont deux effets principaux - l'effet de déshydratation et un changement ultérieur de la pression superficielle de la paroi glandulaire, amenant la cellule à se détériorer voire à éclater (Figure 44 (a)). Des effets similaires ont été rapportés par Paré et Bélanger (1997) et par Chen et Spiro (1995) au cours de l'extraction assistée par micro-ondes de feuilles de romarin en présence d'hexane. Lorsque les glandes ont été soumises à un stress thermique plus sévère et à des pressions localisées élevées, comme dans le chauffage micro-ondes, une montée de pression dans les glandes pourrait avoir dépassé leur capacité d'expansion et causer une rupture plus rapide que dans l'extraction conventionnelle.

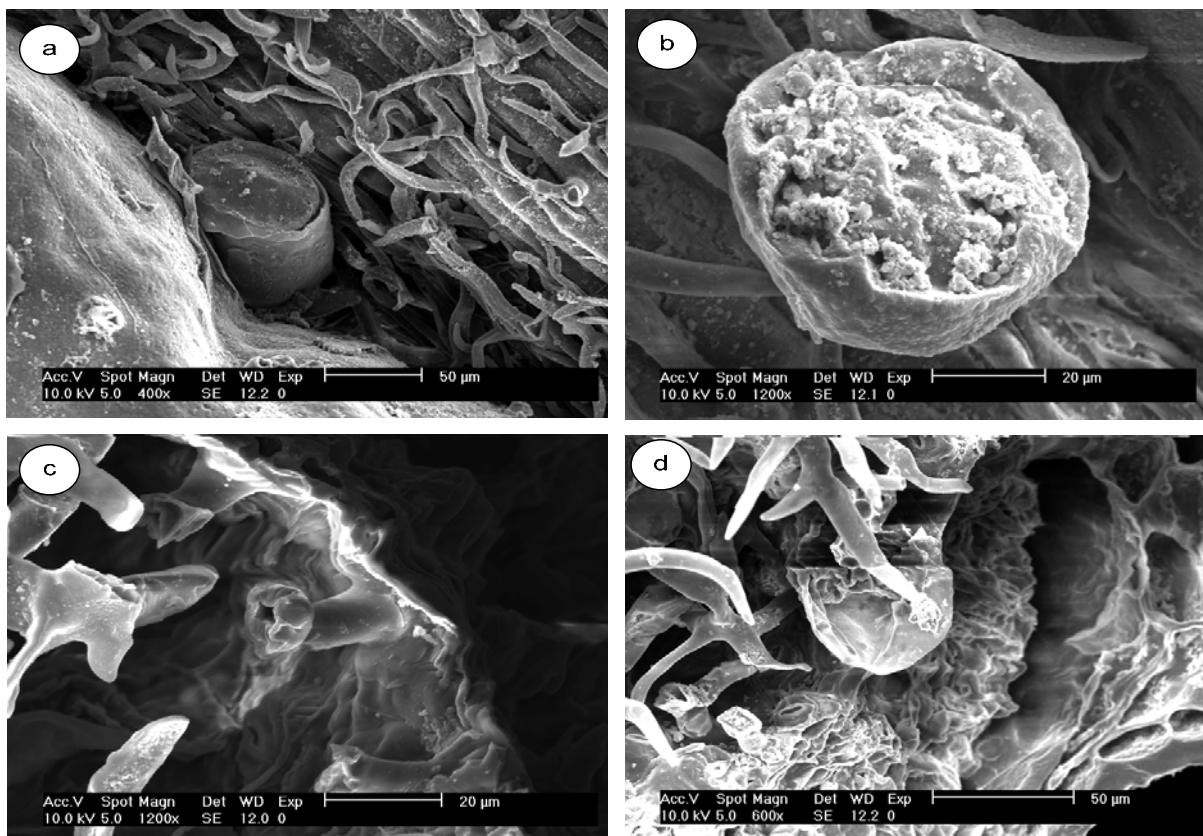


Fig. 45 : Micrographie par microscopie électronique à balayage de la feuille du romarin après extraction par HD ; (a, b) : trichome capité après HD ; (c, d) : trichome pelté après HD.

2 – Analyse sensorielle

Les résultats de l'évaluation sensorielle réalisée par un panel sur les huiles essentielles de romarin extraites par la méthode MHG et HD sont présentés dans le Tableau 29.

Les deux huiles extraites par MHG et HD liquides, présentent la même couleur jaune pâle, leur senteur présente une nuance citronnée. Ce caractère commun est dû à la présence des hydrocarbures terpéniques tels que les pinènes (α et β), le myrcène et le limonène qui ensemble offrent une teneur globale dépassant les 53% (MHG) et 54 % (HD) de la composition totale de l'huile essentielle. Cette nuance est renforcée par la présence du linalol qui couvre un taux dépassant les 2% pour les deux huiles.

Le panel a qualifié l'huile essentielle extraite par HD d'odeur de bouillie et différente de celle provenant des fruits frais. Par contre, il caractérise l'huile essentielle extraite par MHG d'une odeur ferme d'herbes aromatiques fraîches, qualificatif qui présente l'essence de romarin (MHG) avec un profil aromatique nouveau par rapport à celui de l'essence HD et ouvre aux parfumeurs une nouvelle voie de création.

Tableau 29 : Evaluation sensorielle des huiles essentielles de romarin extraites par HD et MHG.

Evaluation sensorielle	MHG	HD
Couleur	Jaune pâle	Jaune pâle
Odeur	Fraîche, légèrement camphrée avec une légère note citronnée, odeur ferme d'herbes aromatiques fraîches	Légèrement camphrée et rappelant l'odeur des citrus, odeur de bouillie, différente de celle provenant des fruits frais
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile

L'huile essentielle issue de la méthode MHG possède une note olfactive proche de l'arôme originel du romarin avec une note fraîche et une odeur ferme d'herbes aromatiques.

3 – Modélisation des données cinétiques

Nous avons observé que les courbes de la cinétique d'extraction (MHG et HD) de l'huile essentielle de romarin (Figure 46) suivent toutes deux trois étapes distinctes mais qui se

différencient par la durée de l'extraction. Cependant, la diffusion du soluté de la matière végétale dans le solvant (vapeur d'eau) constituent généralement l'étape limitante (Cacace et Mazza, 2003 ; Gertenbach, 2001). Le modèle de diffusion appliqué à l'extraction solide-liquide, proposé par Crank (1975), est dérivé de la seconde loi de Fick :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

Où : C est la concentration du soluté dans la matière végétale à un l'instant (t), à une distance x (mm) de la demi-épaisseur de la feuille (L). Les conditions initiales et aux limites sont :

- $t = 0 \quad -L \leq x \leq L \quad C = C_0$
- $\forall t > 0 \quad x = \pm L \quad C = C_i = 0 \quad$ Teneur constante à l'interface
- $\forall t > 0 \quad x = 0 \quad \frac{\partial C}{\partial x} = 0 \quad$ Symétrie du système

La solution générale de cette équation décrite par Crank (1975) ; Spiro et Kandiah (1989) ; Kandiah et Spiro (1990) ; Stangler et al. (2003) ; Cretnik et al. (2005) peut être exprimée comme suit :

$$\ln \frac{c_\infty}{c_\infty - c_t} = K_i t + a$$

Avec :

c_∞ : concentration maximale du soluté extraite ;

c_t : concentration extraite à l'instant t ;

K_i : Constante de vitesse d'extraction ;

a : Abscisse à l'origine.

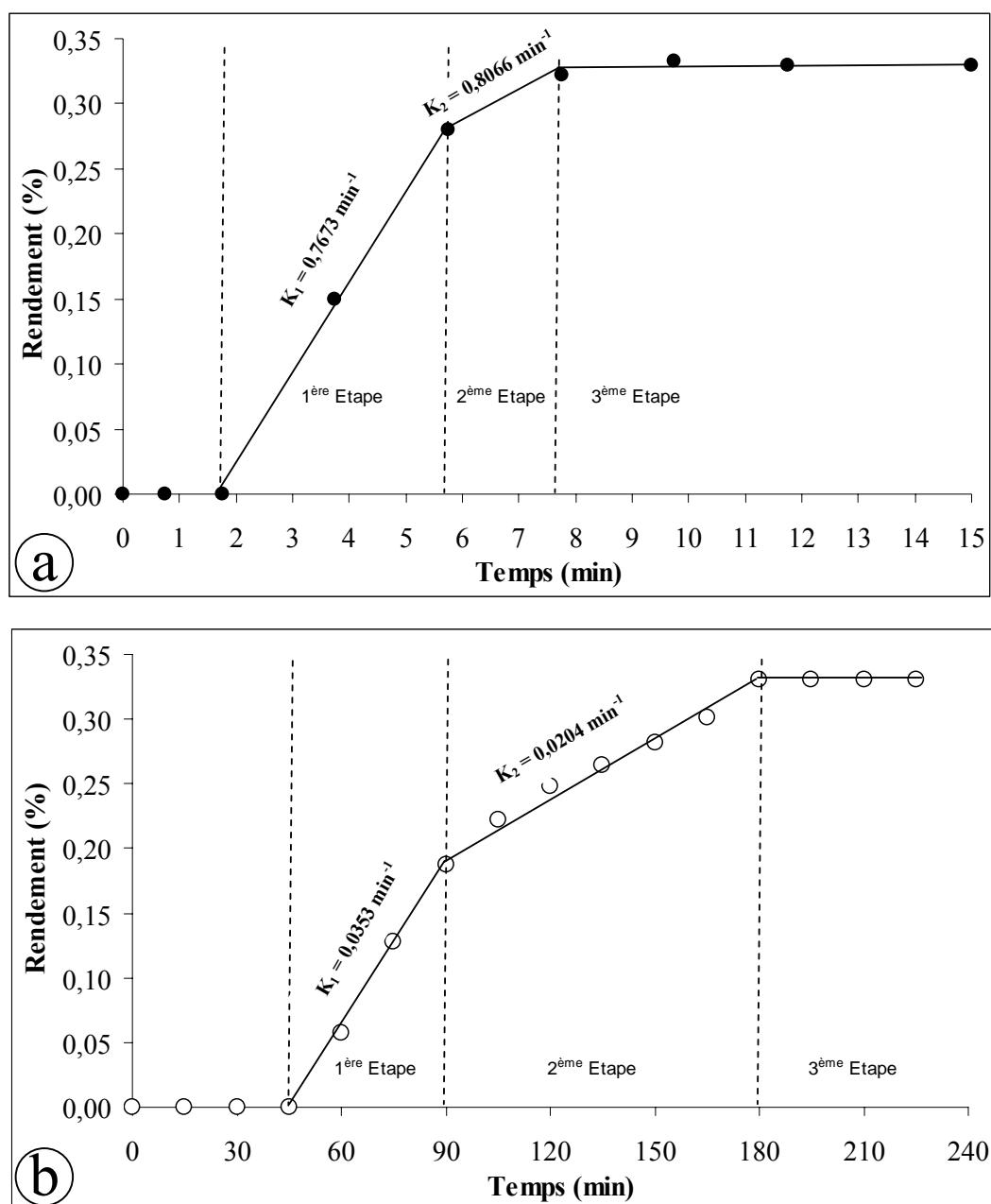


Fig. 46 : Illustration des constantes de vitesse au cours de la cinétique d'extraction de l'HE des feuilles de romarin par MHG (a) et HD (b).

Tableau 30 : Résultats de la modélisation de la cinétique d'extraction.

Méthode Paramètres	MHG	HD
Rdt étape 1 (%)	0,28	0,19
Rdt étape 2 (%)	0,05	0,14
$k_1 (\text{min}^{-1})$	0,7673	0,0353
$k_2 (\text{min}^{-1})$	0,8066	0,0204

Les résultats issus de la modélisation de l'extraction par MHG indiquent que la totalité du rendement (84,85%) est récupérée durant la première étape (4 min), alors que 57,58 % est observé pour HD durant 45 min. Pour la seconde étape. Il suffit uniquement de 2 min pour la méthode MHG pour récupérer 15,15 % du rendement et atteindre le palier. Par contre, avec la HD, il faut écouler 90 min pour pouvoir distiller 42,42 % du rendement de l'HE. En analysant les constantes de vitesse d'extraction, décrites dans le Tableau 30, nous remarquons la présence de deux périodes :

- La première est relative à un domaine où la constante de vitesse d'extraction par MHG est ≈ 14 fois plus importante que HD, ce qui conduit à un taux d'extraction constant et très rapide appelé processus de lavage. Un état constant de transfert de masse a lieu, et une résistance du film végétal contrôle la vitesse.
- La deuxième est relative à un domaine où la constante de vitesse d'extraction (k_2) pour HD, diminue graduellement par rapport à k_1 de $0,0353 \text{ min}^{-1}$ pour atteindre la valeur de $0,0204 \text{ min}^{-1}$. Au contraire, la MHG se caractérise par une augmentation de la constante de vitesse k_2 en dépassant celle de la première période ($k_2 > k_1$), et qui est en même temps ≈ 41 fois supérieure à celle de HD. Pour la technique MHG, une diminution du temps d'extraction de moitié par rapport à la première période est observée. Cette seconde période constitue un domaine où l'extraction, beaucoup plus lente, avec un état instable du transfert de masse, et où la diffusion intra-particule contrôle la vitesse du processus pour la HD et une diffusion intra-particule plus rapide par la technique MHG a vu son

taux d'extraction diminuer du fait que le chauffage est totalement différent par rapport à la HD : il commence du cœur de la matière végétale pour aller vers sa périphérie.

Par conséquent, la méthode d'extraction par MHG se présente comme une méthode innovante remarquable du fait qu'elle en ayant pu extraire plus de 84 % d'essence en 4 minutes seulement, alors que l'HD nécessite plus de 105 minutes pour un même taux de rendement en HE de romarin.

4 – Mécanisme d'extraction

Les informations recueillies à partir de l'étude morphologique et de la modélisation de la cinétique d'extraction peuvent expliquer la rapidité d'extraction par MHG en comparaison à la technique HD, mais elles ne peuvent expliquer ni prévoir la composition chimique de l'huile essentielle extraite et pourquoi nous avons un taux de composés oxygénés plus important par MHG.

Nous présentons dans le Tableau 31 la structure, la température d'ébullition et les teneurs de deux molécules principales et majoritaires dans chacune des huiles essentielles de romarin extraites par les méthodes MHG et HD. Les températures d'ébullition des composés ont été évaluées par le logiciel de calcul spécifique « ACD boiling point » (2004).

Tableau 31 : Caractéristiques de deux composés de l'HE de romarin extraites par MHG et HD.

	α-Pinène	Camphre
Structure		
Formule Chimique	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₆ O
Masse molaire (g . mol⁻¹)	136,24	152,24
N° CAS	80-56-8	76-22-2
T° d'ébullition	157,9°C	207,4°C
Solubilité dans l'eau (g/l)	0,0001 g/L	0,92 g/L
Teneur (%) / MHG	43,60	8,60
Teneur (%) / HD	44,05	7,82

L'huile essentielle de romarin obtenue par HD est nettement dominée par l' α -pinène (44,05%) dont la température d'ébullition est de 157,9°C. En revanche, dans l'huile essentielle obtenue par MHG, ce dernier est présent en proportion inférieure (43,60%).

L'autre composé majoritaire de l'essence de romarin est le camphre, composé oxygéné, dont le point d'ébullition (207,4°C) est nettement plus élevé que celui de l' α -pinène (157,9°C). Ce composé carbonylé présente une faible teneur dans l'huile essentielle (HD) comparativement à celle obtenue par MHG.

D'une manière générale, le mode MHG permet une meilleure extraction des composés oxygénés par rapport aux composés aromatiques non oxygénés, bien que leur température d'ébullition soit plus élevée. Dans le mode MHG l'extraction se déroule en 15 minutes alors que l'HD nécessite au minimum 3 heures. Compte tenu de ces temps, nous pouvons imaginer que les composés oxygénés, à point d'ébullition généralement élevé n'auront pas le temps d'être totalement extraits à partir du système rapide d'extraction sans solvant, sans eau et assistée par micro-ondes. La majorité des composés extraits sont supposés être de nature non oxygénée avec des températures d'ébullition plus basses.

Les micro-ondes permettent de libérer plus rapidement l'huile essentielle contenue dans la matrice végétale grâce à l'ouverture quasi instantanée des glandes sécrétrices. Lors d'une MHG ou d'une HD, la quantité de molécules aromatiques, oxygénées ou non, est nettement inférieure à la quantité d'eau présente dans la matrice végétale. La température d'ébullition du mélange eau + composés aromatiques est donc imposée par la température d'ébullition de l'eau c'est-à-dire 100°C et ne dépend en aucun cas de la température d'ébullition des composés de l'huile essentielle.

L'explication de la différence de composition chimique entre les procédés d'extraction par HD et MHG ne peut être supportée uniquement par les températures d'ébullition des composés oxygénés ou non oxygénés extraits. Nous pensons que, pour cette raison, la solubilité de ces composés dans l'eau a un effet significatif sur la différence de composition chimique des huiles essentielles.

Cependant, Koedam (1982), en reprenant les théories méconnues de Von Rechenberg publiées en 1910, a pu montrer en prenant le cas du carvi que le point d'ébullition d'un composé organique n'explique pas à lui seul le phénomène de distillation, et qu'il faut introduire la notion de solubilité. En effet, la carvone étant soluble dans l'eau, contrairement au limonène, dès lors que l'on commence à chauffer le milieu réactionnel, se solubilise et est entraînée par les premières vapeurs d'eau. Une fois le milieu épuisé en carvone, et plus généralement en

molécules solubles dans l'eau, le limonène et les autres terpènes commencent alors à être entraînés par la vapeur d'eau. Bien que la carvone ait un point d'ébullition très élevé, ce produit est extrait en priorité en raison de sa solubilité élevée dans l'eau. Pour le limonène, son insolubilité dans l'eau est un obstacle à l'entraînement de ce produit bien que son point d'ébullition soit plus bas.

La durée d'une HD étant importante, chaque molécule a le temps d'être distillée quasi totalement. Du fait de la courte durée d'extraction par MHG, le phénomène d'extraction s'appuiera plus sur la solubilité que sur la température d'ébullition. Le phénomène de vaporisation serait ainsi guidé non pas, par la température d'ébullition des composés mais par leur solubilité ; c'est ce que nomme Von Rechenberg « le phénomène d'hydrodiffusion ». Pratiquement, lors de la mise en œuvre d'une hydrodiffusion assistée par microondes et gravité (MHG), nous ne rajoutons en aucun cas de l'eau à la matière végétale ; seule l'eau interne de la plante (au maximum 95% en masse de la matière végétale pour les plantes fraîches) va entrer en jeu. Alors que pour l'HD, pour traiter 250 g de matière végétale, 2,5 litres d'eau environ ont été rajoutés au milieu. Les composés aromatiques qui constituent l'huile essentielle sont contenus sur les surfaces des feuilles qui se trouvent, directement dans le cas de l'HD, ou indirectement dans le cas du MHG, dans un milieu aqueux. Ces composés aromatiques, une fois libérés de la matrice vont ensuite être solubilisés dans le but de former un mélange eau-composés aromatiques qui va être vaporisé, condensé et séparé.

Le camphre possède une solubilité de 0,92 g par litre d'eau qui est beaucoup plus élevée que celle de l' α -pinène (voisine de zéro). Ainsi, la difficulté de certaines molécules à se solubiliser va donc entraîner une certaine sélectivité. Il semblerait donc que cette eau disponible, plus faible en MHG, favorise surtout l'entraînement des molécules les plus solubles, alors qu'en HD la quantité d'eau plus importante permet à chaque type de molécules de distiller de façon plus équitable.

Par ailleurs, une autre spécificité de la méthode d'hydrodiffusion assistée par microondes et gravité (MHG) est son mode de chauffage et de fonctionnement où les micro-ondes ne génèrent pas de la chaleur par conduction ou convection comme un chauffage classique, mais par la perte diélectrique (Metaxis et Meredith, 1988). Le facteur de perte diélectrique (ϵ'') et la constante diélectrique (ϵ) d'un matériau sont deux facteurs déterminants de l'efficacité de transfert de chaleur vers l'échantillon. Leur rapport (ϵ''/ϵ) est le facteur de dissipation ($\tan \delta$), qui traduit l'aptitude d'un support ou d'un matériau à absorber rapidement les micro-ondes lorsqu'elles les traversent et à les dissiper dans le milieu sous forme de chaleur (Metaxis et

Meredith, 1988). Plus cette valeur sera élevée, plus cette aptitude sera grande. Dans le cas inverse, le facteur de dissipation tendra vers 0. Pour illustrer ce phénomène, les composés polaires sont des diélectriques à fortes pertes. L'énergie micro-ondes sera dissipée donc sous forme de chaleur grâce au phénomène de polarisation diélectrique.

Il existe deux principaux mécanismes par lesquels les matériaux dissipent l'énergie micro-ondes, à savoir la rotation dipolaire et la conduction ionique (Neas et Collins, 1988) : La rotation dipolaire fait référence à l'alignement des molécules qui ont un moment dipolaire, avec le champ électrique. Sous l'effet du champ électrique alternatif, les dipôles s'orientent dans un sens, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens lors du renversement de la polarité du champ (Figure 47). L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. Cette dernière est transformée partiellement en chaleur : l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules (les forces de liaisons par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals). A 2450 MHz, le champ oscille $4,9 \times 10^9$ fois par seconde, ce qui contraint l'agitation des molécules et donc génère de la chaleur. L'efficacité de la production de chaleur grâce à la rotation dipolaire dépend du temps de relaxation diélectrique caractéristique de l'échantillon, qui à son tour dépend de la température et de la viscosité. Le deuxième grand mécanisme de dissipation est la conduction ionique, qui représente l'aptitude du milieu à permettre au courant de circuler. La migration des ions conducteurs dissous avec le champ électrique oscillant et la production de chaleur est due à des pertes de frottement qui dépendent de la taille, de la charge et de la conductivité des ions ainsi que de leurs interactions avec le solvant.

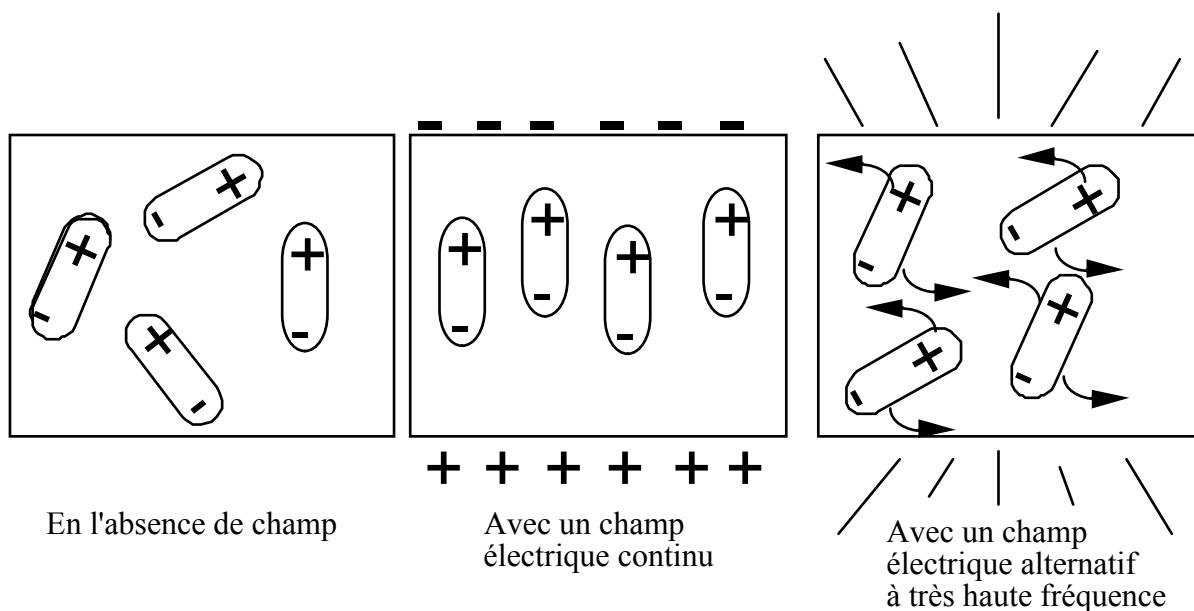


Fig. 47 : Rotation des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes.

5 – Qu'est ce qu'on trouve dans la phase aqueuse ?

Le romarin est une plante contenant des niveaux élevés d'antioxydants naturels tels que les acides carnosique et rosmarinique, le carnosol...etc. L'extraction de ces antioxydants à partir des feuilles de romarin permettrait ainsi d'avoir des produits naturels plutôt que de synthèse et qui sont utilisés comme additifs dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmacologique (Shylaja et Peter, 2004 ; Arouma et al., 1992).

De plus, après avoir extrait l'HE de romarin par la technique d'hydrodiffusion assistée par microondes et gravité (MHG), nous avons récupéré l'eau résiduelle que nous avons lyophilisée ultérieurement, et analysée ensuite par HPLC (Figs. 49 – Fig. 52) pour voir son contenu. Pour comparaison, une analyse de la composition des feuilles fraîches de romarin en polyphénols a été effectuée selon l'organigramme montré dans la Figure 48. Les résultats trouvés sont regroupés dans le Tableau 32.

Tableau 32 : Proportions des polyphénols dans le romarin frais et dans l'eau résiduelle après extraction par MHG.

	Ac. Rosmarinique (%)	Ac. Carnosique (%)	Carnosol (%)
Romarin frais	2,38	15,55	2,12
Eau résiduelle lyophilisée	0,82	-	-
Prix de 1g (€)	1350	845	3860

Les principaux composés responsables de l'activité antioxydante du romarin dans les fractions non-volatiles sont l'acide carnosique, le carnosol et l'acide rosmarinique (Cuvelier et al., 1996). Leur pouvoir antioxydant a été classé par Pearson et al. (1997) durant l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de faible densité comme suit : Carnosol > Ac. Rosmarinique > Ac. Carnosique. Ces polyphénols ont également d'importantes activités biologiques *in-vitro* en tant qu'agents anti-tumoraux, agents de chimioprévention et anti-inflammatoires (Cheung et Tai, 2007 ; Shuang-sheng et Rong- liang, 2006 ; Danilenko et al., 2003 ; Al Sereiti et al., 1999). Il a été proposé que les polyphénols de romarin puissent grandement augmenter la fonctionnalité des aliments pour la santé et le bien-être (Shahidi et Naczk, 2004).

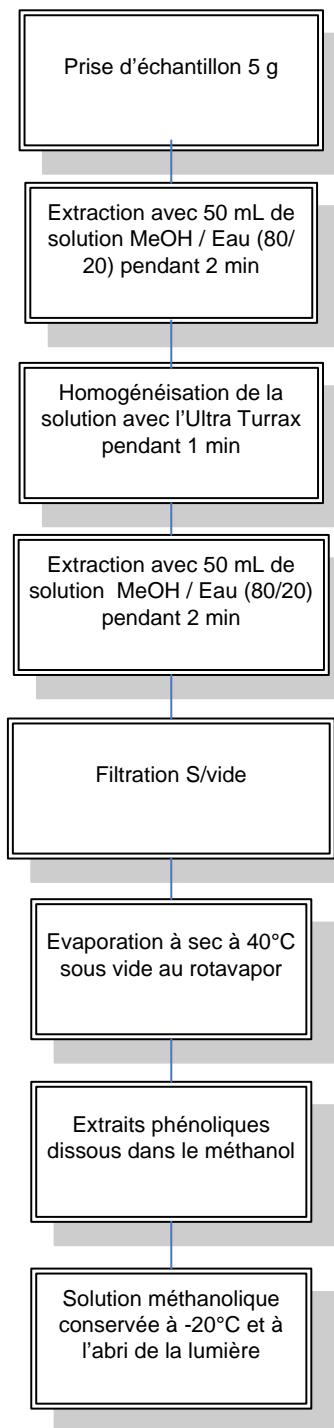


Fig. 48 : Organigramme d'extraction des polyphénols à partir de feuilles fraîches de romarin.

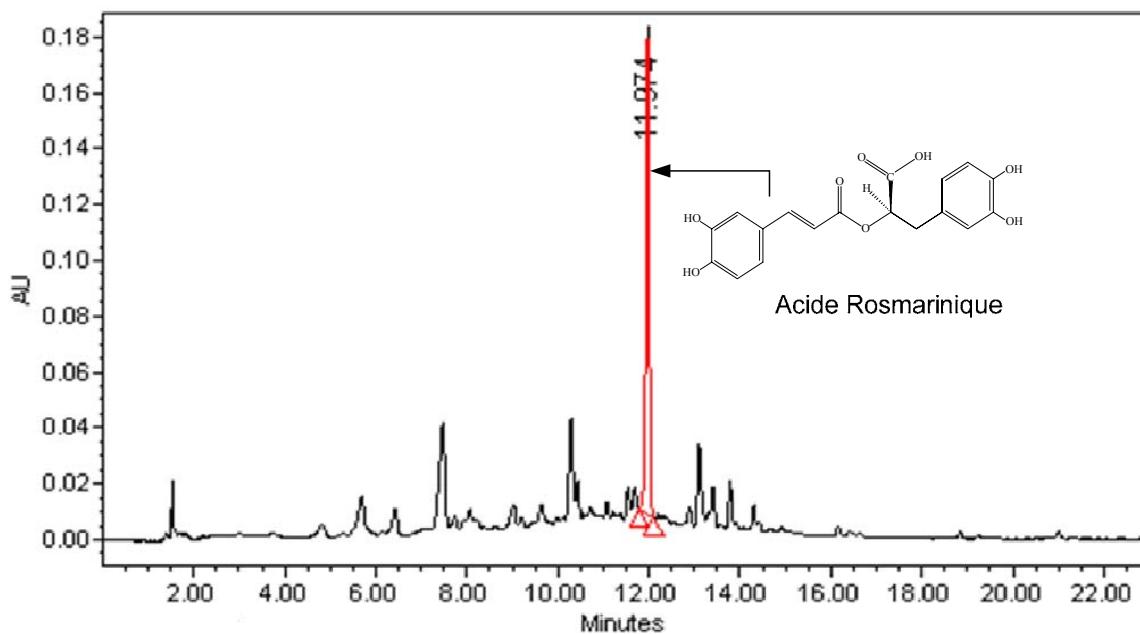


Fig. 49 : Chromatogramme de l'eau résiduelle après extraction par MHG montrant le pic de l'acide rosmarinique à la longueur d'onde 329 nm.

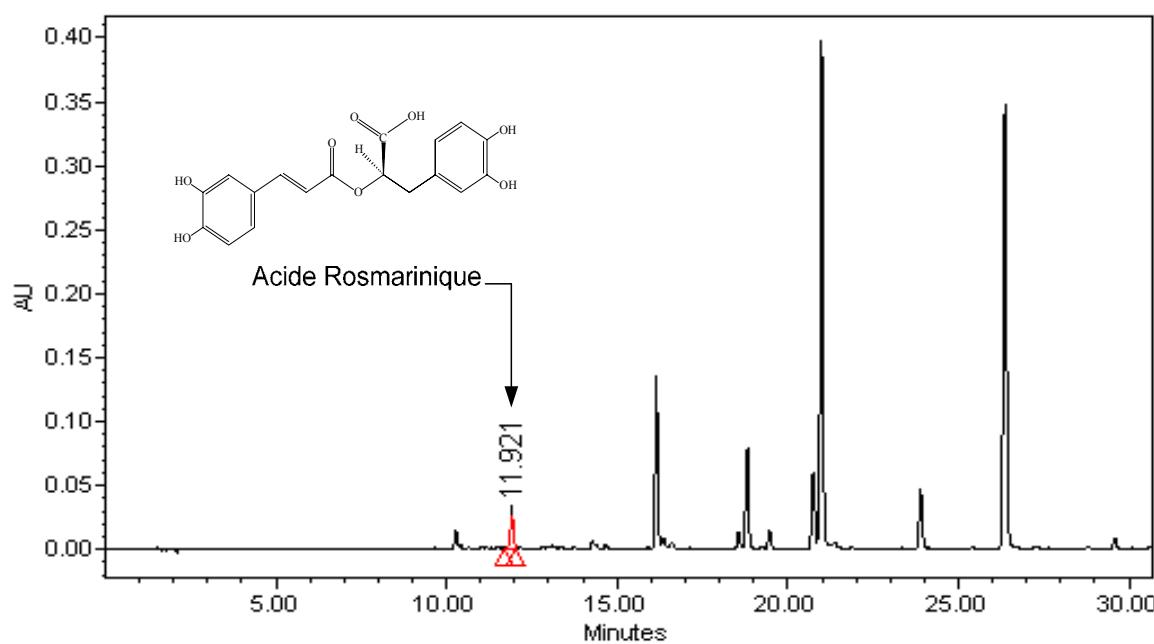


Fig. 50 : Chromatogramme du romarin frais montrant le pic de l'acide rosmarinique à la longueur d'onde 329 nm.

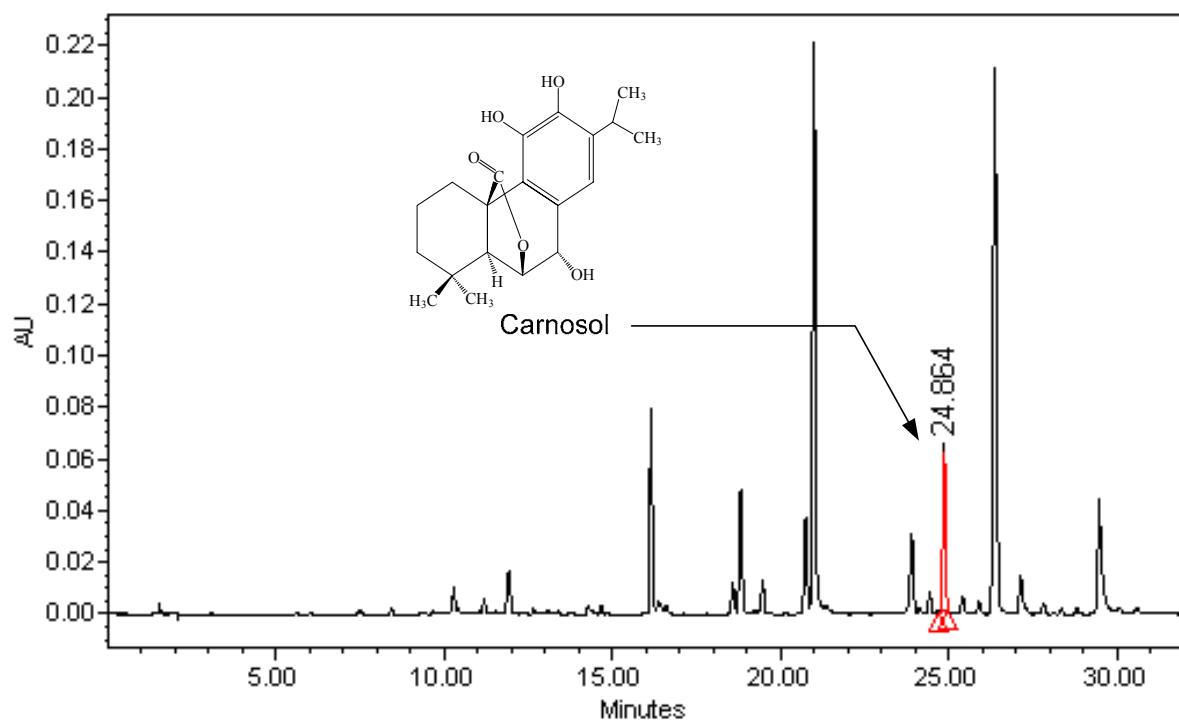


Fig. 51 : Chromatogramme du romarin frais montrant le pic du carnosol à la longueur d'onde 284 nm.

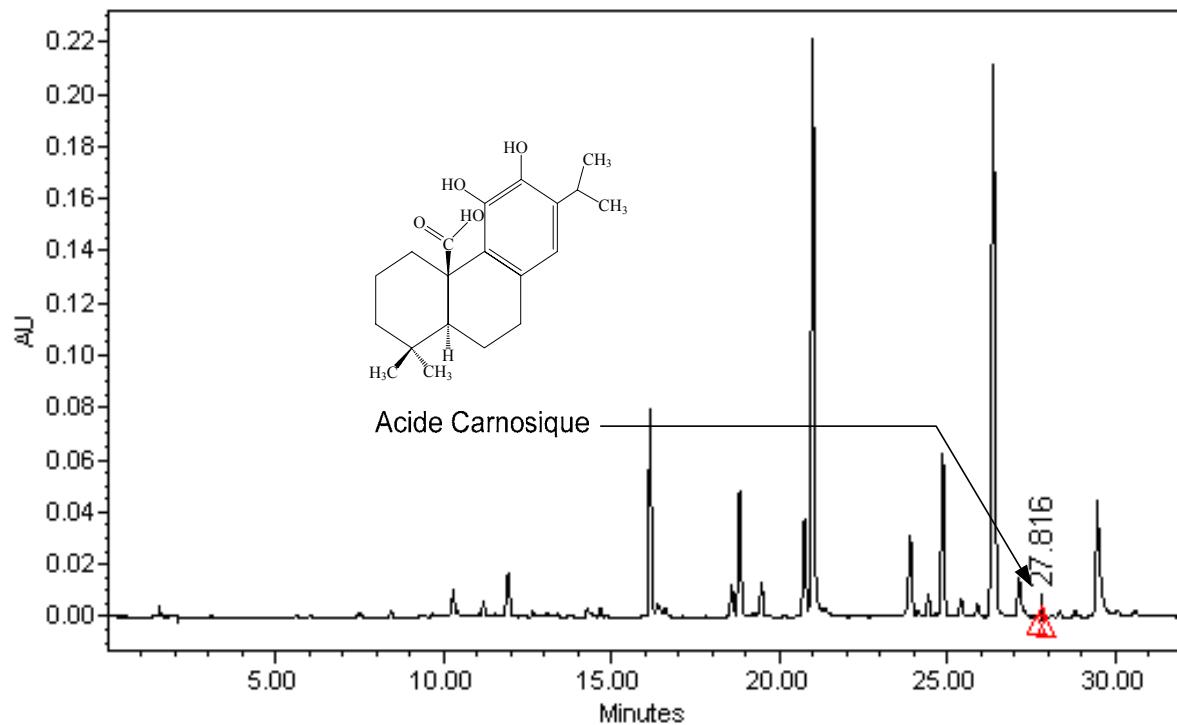


Fig. 52 : Chromatogramme du romarin frais présentant le pic de l'acide carnosique à la longueur d'onde 284 nm.

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'eau résiduelle contient 0,82 % d'acide rosmarinique, voire 0,545 mg d'acide rosmarinique trouvé dans l'eau résiduelle issue de l'extraction de 100 g de feuilles fraîches de romarin ; nous pouvons donc valoriser nos rejets d'eau résiduelle en récupérant à partir de chaque extraction utilisatrice de 500 g de romarin frais, 2,725 mg d'acide rosmarinique (équivalent de 3,68 €) sans utilisation de solvant ou d'eau. De ce fait, la production de 1 kg d'HE de romarin par MHG, comme indiqué dans le tableau 33, génère 180 litres d'eau résiduelle qui contient environ 1,65 g d'acide rosmarinique soit une valeur ajoutée de l'ordre de 2227,5 €.

L'acide rosmarinique, dérivé de l'acide hydroxycinnamique et appartenant au groupe des polyphénols, possède une activité antioxydante très supérieure à celle de la vitamine E (Exarchou et al., 2002 ; Zheng et Wang, 2001). L'acide rosmarinique présente la particularité d'être absorbé par les cellules du système gastro-intestinal, puis conjugué et méthylé au niveau hépatique. Il est également absorbé au niveau des cellules de la peau (Baba et al., 2005). De plus, l'acide rosmarinique inhiberait la production d'oxyde nitrique (NO) ainsi que d'autres espèces réactives de l'oxygène et de l'azote dans les macrophages, évitant ainsi des dommages importants causés par le stress oxydant ou le vieillissement cellulaire (Sroka et al., 2005 ; Qiao et al., 2005). Sur des cellules cardiaques soumises à des stress chimiques, il a été démontré que l'acide rosmarinique inhibait la génération d'espèces réactives à l'oxygène (Kim et al., 2005 ; Psotova et al., 2005). En protégeant les cellules vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène, l'acide rosmarinique augmente leur viabilité et diminue le taux de mort cellulaire due à l'oxydation. (Gao et al., 2005). Les propriétés antioxydantes de l'acide rosmarinique peuvent également être mises à profit pour prévenir l'oxydation des aliments. Par exemple, l'acide rosmarinique peut prévenir l'oxydation des stérols contenus dans l'huile d'olive vierge lors des phases de chauffage (D'evoli et al., 2006).

6 – Coût, énergie et impact environnemental

L'hydrodiffusion par micro-ondes et gravité (MHG) est ici présentée comme étant une méthode d'extraction écologique rapide et adaptée à la préparation d'échantillon en vue du dosage des huiles essentielles dans les matrices aromatiques ou de leur production. La réduction du coût d'extraction par MHG est mise en évidence en termes d'énergie, de consommation de solvant et de temps requis. L'examen du Tableau 33 rappelle le temps nécessaire à la réalisation d'une extraction par la méthode de Clevenger (3 h) alors que la technique développée dans ce manuscrit requiert environ 15 min seulement de chauffage par micro-ondes. L'énergie requise pour réaliser les deux méthodes d'extraction est respectivement de 4,33 kWh pour la méthode

d'hydrodistillation conventionnelle et de 0,25 kWh pour la méthode par micro-ondes (énergie nécessaire au fonctionnement du four). Les calculs énergétiques ont été réalisés à l'aide d'un Wattmètre placé sur les prises de courant électrique à l'entrée du four micro-ondes et des chauffages électriques par conduction.

Tableau 33 : Comparaison énergétique des deux méthodes d'extraction.

	HD	MHG
Temps d'extraction (min)	180	15
Rendement d'extraction (%)	0,35	0,33
Impact environnemental (kg CO₂ rejeté. kg⁻¹ HE)	2000	120
Consommation d'énergie (kWh. kg⁻¹ HE)	2500	150
Eaux usées (litre. kg⁻¹ HE)	1700	180

Du point de vue de l'impact environnemental, la quantité calculée, en émission de dioxyde de carbone dans l'atmosphère, est plus élevée dans le cadre des extractions par la méthode classique (3464 g de CO₂ par extraction) que par MHG (200 g de CO₂ par extraction). Ramenée à la quantité de CO₂ produit par kilogramme d'huile essentielle, on obtient environ 2000 kg de CO₂ par kg d'huile par la méthode classique contre 120 kg de CO₂ par kg d'huile par méthode électromagnétique. Selon la littérature, ces calculs sont basés sur le fait que pour obtenir 1 kWh à partir de charbon ou de fuel, 800 g de dioxyde de carbone sont émis dans l'atmosphère lors de la combustion de l'énergie fossile (Bernard, 2001). La technique d'extraction MHG apparaît ici comme étant une procédure dite « verte » permettant de réaliser des économies énergétiques, de diminuer les rejets de CO₂ et de limiter les eaux usées.



Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Les objectifs de ce travail ont consisté en la réalisation, l'optimisation et l'application d'un nouveau dispositif d'extraction des huiles essentielles assistée par micro-ondes. Nous avons développé un appareillage de laboratoire nommé Hydrodiffusion par Micro-ondes et Gravité (MHG), et mis au point par le professeur Chemat dans son laboratoire (GREEN, Université d'Avignon et Pays de Vaucluse – France). Cette nouvelle méthode a été comparée tout au long de sa mise en application à la technique conventionnelle de Clevenger (Hydrodistillation). Plusieurs étapes nous ont permis de parvenir à l'élaboration et à la validation de ce nouveau système d'extraction assisté par micro-ondes.

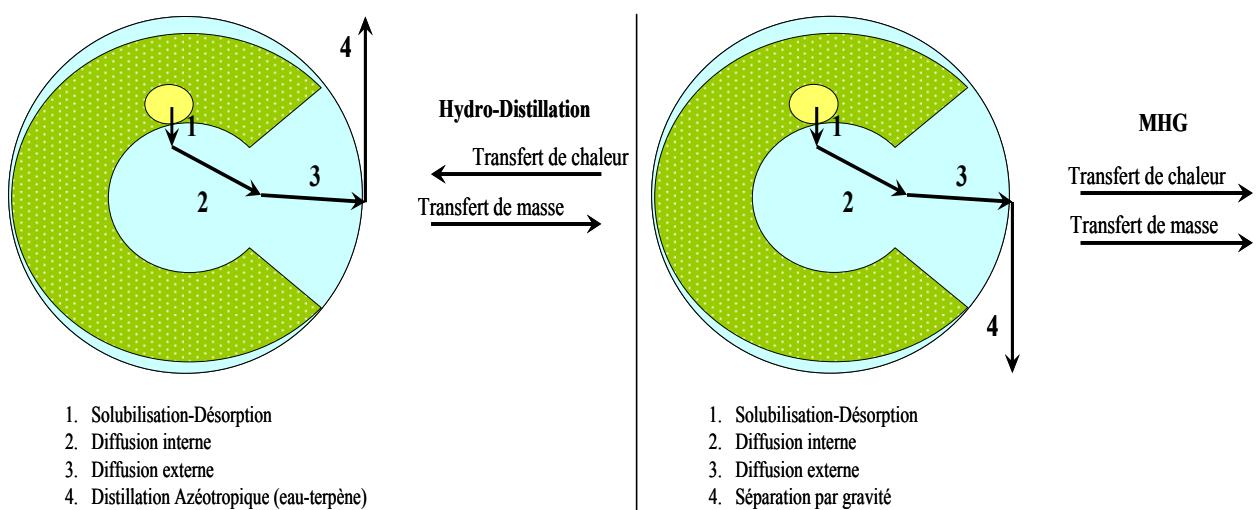
Dans un premier temps, les travaux ont permis de tester et d'ajuster le prototype d'extraction. Ainsi, des expériences ont pu être réalisées avec des co-produits agro-alimentaires de l'industrie des Citrus. Une méthodologie expérimentale a été appliquée dans le but d'évaluer l'impact des variables sur l'extraction et d'optimiser les paramètres d'utilisation. Alors que la méthode conventionnelle d'extraction requiert 3 heures, les conditions par micro-ondes optimisées nous ont permis de réaliser l'extraction des huiles essentielles en seulement 15 minutes. Les deux méthodes permettent d'obtenir des résultats quantitativement (rendement en huile essentielle) et qualitativement (composition des extraits) équivalents.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence le fait que les conditions et paramètres d'extraction MHG n'avaient pas d'impact négatif sur la composition des extraits. Au contraire nous avons enregistré pour cette méthode une composition plus riche en composés oxygénés en la comparant à celle issue de la méthode conventionnelle. Ainsi, quels que soient les paramètres d'extraction, les micro-ondes et la procédure de traitement proposée améliorent la qualité et la quantité des extraits. Ces constatations nous ont permis d'élargir les matrices étudiées à un panel de matrices végétales. Les résultats obtenus sont étroitement liés à une combinaison de gradients de température de conduction et de radiation au sein des échantillons traités.

Dans un dernier temps, une approche écologique et une compréhension du phénomène mis en jeu pour l'extraction des huiles essentielles par Hydrodiffusion par Micro-ondes et Gravité ont été abordées. La limitation des eaux usées, la rapidité de la procédure, la réduction du coût énergétique font de l'Hydrodiffusion par Micro-ondes et Gravité une technique innovante et

attrayante. De plus, la procédure requiert les micro-ondes comme unique source d'énergie ; aucune source de chaleur additionnelle n'est requise.

L'Hydrodiffusion par Micro-ondes et Gravité permet la réalisation de procédures d'extraction des huiles essentielles, rapides et efficaces où le chauffage sélectif apporté est dissipé volumétriquement au cœur de la matrice irradiée par les micro-ondes. Cette méthode permet également une distribution et un transfert de masse et de chaleur depuis le cœur de la matrice vers l'environnement. Au contraire, et dans le cas du procédé conventionnel, la chaleur est tout d'abord transférée à l'extérieur du milieu et se dirige vers l'intérieur de la matrice. Ainsi, le transfert de masse s'effectue de l'intérieur de la matrice vers l'extérieur alors que le gradient de température intervient depuis l'extérieur vers l'intérieur. Ces deux phénomènes nous ont permis d'exploiter un nouveau dispositif d'extraction au travers d'une énergie innovante et efficace. La technique permet de réduire considérablement les temps d'extraction sans altérer la composition des extraits. De plus, cette méthode fait un pas en direction des économies d'énergie et du développement durable : méthode non utilisatrice ni de solvant ni d'eau, diminution de la consommation énergétique, donc elle apparaît comme étant une procédure dite « verte ».





Références bibliographiques



- ABEYSINGHE D.C., LI X., SUN C.D., ZHANG W., ZHOU C. et CHEN K., 2007 :** Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chem.* Vol.104, pp : 1338–1344.
- ADAM K., SIVROPOULOU A., KOKKINI S., LANARAS T. et ARSENAKIS M., 1998 :** Antifungal Activities of *Origanum vulgare subsp. Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, N°6, pp : 1739-1745.
- ADAMS R.P., 2007 :** Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry, 4th edition. Allured Publishing Corporation. 804 p.
- AFNOR, 2000 :** Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P.
- AL SEREITI M. R., ABU AMER K. M. et SEN P., 1999 :** Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J. Exper. Biol.*, Vol. 37, pp : 124–130.
- ALLAF K., 1989 :** Nouveau procédé de traitement par détente instantanée contrôlée de produits biologiques divers en vue de leur déshydratation. Recherche exploratoire. Abondement ANVAR – Gradient Publication de l'université de technologie de Compiègne N° SE/89/346. Rapport intermédiaire, décembre 1989.
- ALLAF K., LOUKA N., BOUVIER J.M., PARENT F. et FORGET J.M., 1994 :** Procédé de traitement de produits biologiques en vue de la modification de leur texture, installations pour la mise en œuvre d'un tel procédé et produits ainsi réalisés, French patent n° 93/09728, 1993, International extension PCT FR 94/00975, 1994.
- ANDREWS J.M., 2001 :** The Development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing. *J. Antimic. Chemo.*, Vol. 48, Suppl. S1, pp : 29-42.
- ANGIONI A., BARRA A., CERETI E., BARILE D., COISSON J.D., ARLORIO M., DESSI S., CORONEO V. et CABRAS P., 2004 :** Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L., *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 52, pp : 3530 – 3535.
- ANKLAM E., BERG H., MATHIASSEN L., SHARMAN M. et ULBERTH F., 1998 :** Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis : a review. *Food addit. Contam.*, 1998, Vol. 15, pp : 729 – 750.
- AQEL, M.B., 1991 :** Relaxant effect of the volatile oil of *Rosmarinus officinalis* on tracheal smooth muscle. *J. Ethnopharm.* Vol. 33, pp : 57 – 62.
- ARCTANDER S., 1994, 2003 :** Perfume and flavor chemicals (aroma chemicals). Allured Publishing corporation. Vol I et II.
- ARUOMA O.I., HALLIWELL B., AESCHBACH R., et LÖLIGERS J., 1992 :** Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, Vol. 22, pp : 257 – 268.
- ARUOMA O.I., SPENCER J.P.E., ROSSI R., AESCHFBACH R., KHAN A., MAHMOOD N., MUÑOZ A., MURCIA A., BUTLER J. et HALLIWELL B., 1996 :** An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provencal herbs. *Food Chem. Toxicol.* Vol. 34, pp : 449 – 456.
- ATTAWAY J.A., PIERINGER A.P. et BUSLIG B.S., 1968 :** Origin of citrus flavour components. IV. The terpenes of Valencia leaf, peel and blossom oils. *Phytochem.* Vol. 7, pp : 1695–1698.

- ATTAWAY J.A., PIERINGER A.P., et BARABAS I.J., 1967 :** Origin of citrus flavour components. III. A study of percentage variation in peel and leaf oil terpenes during one season. *Phytochem.* Vol. 6, pp : 25–32.
- ATTAWAY J.A., WOLFORD R.W. et EDWARDS G.J., 1962 :** Isolation and identification of volatile carbonyl components from orange essence. *J. Agric. Food. Chem.* Vol. 10, pp : 102 – 104.
- ATTAWAY J.A., WOLFORD R.W., ALBERDING G.E. et EDWARDS G.J., 1964 :** Identification of alcohols and volatile organic acids from natural orange essence. *J. Agric. Food. Chem.* Vol. 12, pp : 118 – 121.
- BAALIOUAMER A., MEKLATI B.Y., FRAISSE D. et SCHARFF C., 1992 :** The chemical composition of some cold-pressed citrus oils produced in Algeria. *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 4, pp : 251 – 258.
- BABA S., OSAKABE N., NATSUME M., YASUDA A., MUTO Y., HIYOSHI K., TAKANO H., YOSHIKAWA T. et TERAO J., 2005 :** Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Europ. J. Nutr.* Vol. 44, pp : 1 – 9.
- BENHABILES N.E.H. et AÏT AMMAR H., 2001 :** Comparative study of Algeria's *Rosmarinus eriocalys* and *Rosmarinus officinalis*. *Perfumer & Flavorist*, Vol. 26, pp : 40 – 48.
- BENKACI-ALI F., BAALIOUAMER A. et MEKLATI B.Y., 2006 :** Kinetic study of microwave extraction of essential oil of *Nigella sativa* Linn seeds. *Chromatographia*, Vol. 64, pp : 227 – 231.
- BERNARD J., 2001 :** Le gaz naturel remonte le courant. *Science & Vie* (Hors série), N°. 214, mars 2001, pp : 68 – 75.
- BERTHIER A., 1980 :** Epices-aromates leurs huiles essentielles et oléorésines. parfums, cosmétiques, arômes n°34- août/septembre 1980 ; pp 39-44.
- BHATTACHARJEE P., RANGANATHAN T.V., SINGHAL R.S. et KULKARNI P.R., 2003 :** Comparative aroma profiles using supercritical carbon dioxide and Likens-Nickerson extraction from a commercial brand of Basmati rice. *J. Sci. Food Agric.*, 2003, Vol. 83, pp : 880 – 883.
- BOTTEGA S. et CORSI G., 2000 :** Structure, secretion and possible functions of calyx glandular hairs of *Rosmarinus officinalis* L. *Botanical J. Linnean Soc.* Vol. 132, pp : 325–335.
- BOUTEKEDJIRET C., BELABBES R., BENTAHAR F., BESSIÈRE J. M., et REZZOUG S. A., 2004 :** Isolation of rosemary oils by different processes. *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 16, pp : 195–199.
- BOVILL H., 1996 :** Natural aroma chemicals from oranges and other botanical sources. *Perfum. Flavour.* Vol. 21, pp 9 - 11.
- BOZIN B., MIMICA-DUKIC N., SAMOJLIK I., et JOVIN E., 2007 :** Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia Officinalis* L., Laminaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 55, pp : 7879–7885.
- BRAT P., 2001 :** Application d'un nouveau procédé d'extraction (jus, pulpe, huile essentielle) : La flash-Détente. Journée professionnelle Cirad-flhor – Conservation et transformation du fruits : nouveaux enjeux, nouvelles techniques. Montpellier – France. URL : <http://technofruits2001.cirad.fr/fr/brat.htm>.

- BRUNETON J., 1993 :** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} édition Lavoisier, 385 – 623 P.
- BRUNETON J., 1999 :** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. ; pp : 461 – 769.
- CACACE J.E. et MAZZA G., 2003 :** Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J. Food Engin.*, Vol. 59, pp : 379 - 389.
- CALABRESE V., SCAPAGNINI G., CATALANO C., DINOTTA F., GERACI D. et MORGANTI P., 2000 :** Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its application in cosmetic dermatology. *Int. J. Tissue React.*, Vol. 22, pp : 5–13.
- CELIKTAS O. Y., HAMES KOCABAS E. E., BEDIR E., VERDAR SUKAN F., OZEK T., et BASER K. H. C., 2007 :** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, Vol. 100, pp : 553–559.
- CHANG S.S., OSTRIC-MANJASEVIC B., HSIEH O.L. et HUANG C.L., 1977 :** Natural antioxidants from Rosemary and sage. *J. Food Sci.* Vol. 42, pp : 1102 – 1106.
- CHAO S.C., YOUNG D.G. et OBERG G. J., 2000 :** Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 12 (Sep/Oct 2000), pp : 639-649.
- CHARABOT E. ; DUPONT J. & PILLET L., 1899 :** Les huiles essentielles et leurs principaux constituants, Ed. CH. Beranger, Paris.
- CHEETHAM P.S.J., 2010 :** Natural sources of flavours. Cité In : TAYLOR A.J. and LINFORTH R.S.T., 2010 : Food flavour technology. Edition Wiley-Blackwell, second edition. 360 p.
- CHEMAT F., ABERT VIAN M. et DANGLES O., 2007 :** Essential oils as antioxidants. *Int. J. Essent. Oil Therapeut.* Vol. 1, pp : 4 – 15.
- CHEMAT F., SMADJA J. et LUCCHESI M. E., 2004^b :** Lösungsmittelfreie Mikrowellen-Extraktion von flüchtigen Naturstoffen. *Brevet Européen*, EP 1 439 218 A1.
- CHEMAT F., SMADJA J. et LUCCHESI M. E., 2004^c :** Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. *Brevet Américain*, US 2004/0187340 A1.
- CHEMAT F., TOMAO V. et VIROT M., 2008 :** Ultrasound-assisted extraction in food analysis. In *Handbook of Food Analysis Instruments* by Semith ötles (pp. 85 – 103). Boca Raton, Florida, USA : CRC Press.
- CHEMAT S., LAGHA A., AIT AMAR H. et CHEMAT F., 2003 :** Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrasoni. Sonochemi.*, Vol. 11, pp : 5-8.
- CHEMAT S., LAGHA A., AIT AMAR H., BARTELS P.V. et CHEMAT F., 2004^a :** Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 19, pp : 188 – 195.
- CHEN S.S. et SPIRO M., 1995 :** Kinetics of microwaves extraction of rosemary leaves in hexane, ethanol, and a hexane+ ethanol mixture. *Flavour Frag. J.*, Vol. 10, pp : 101 – 112.
- CHEUNG S. et TAI J., 2007 :** Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncology Report*, Vol. 17, pp : 1525–1531.
- CHUTIA M., BHUYAN D.P., PATHAK M.G., SARMA T.C. et BORUAH P., 2009 :** Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT* Vol. 42, pp : 777–780.

- CICILE J.-C., 2002 :** Distillation. Absorption Etude pratique. Techniques de l'ingénieur J 2610 pp 1-20.
- CICILE J.-C., 1994 :** Distillation. Absorption 1. Généralités sur les colonnes de fractionnement. Techniques de l'ingénieur J 2621 pp 1-3.
- CLEVENGER J.F., 1928 :** Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, Vol. 17, pp : 336-341.
- CONNER D.E. et BEUCHAT L.R., 1984^a :** Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 47, pp : 229-233.
- CONNER D.E. et BEUCHAT L.R., 1984^b :** Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, Vol. 49, pp : 429 – 434.
- COSTE H., 1937 :** Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Second Tirage , Paris - Librairie des Sciences et des Arts. 807 p.
- COUPLAND J.N. et McCLEMENTS D.J., 1996 :** Lipid oxidation in food emulsions. *Trends Food Sci Technol.*, Vol. 7, pp : 83 – 91.
- CRANK J., 1975 :** The mathematics of diffusion. Second edition. ISBN 0 19 853344 6. OXFORD UNIVERSITY PRESS. 414 p.
- CRAVEIRO A.A., MATOS F.J.A., ALENCAR J.W. et PLUMEL M.M., 1989 :** Microwave oven extraction of an essential oil. *Flav. Fragr J.* 1989, Vol. 4, pp : 43 – 44.
- CRETNIK L., SKERGET M. et KNEZ Z., 2005 :** Separation of parthenolide from feverfew: performance of conventional and high-pressure extraction techniques. *Separ. Purifica. Technol.*, Vol. 41, pp : 13 - 20.
- CROUZET J., 1998 :** Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur F 4 100, pp : 1 – 18.
- CUTTER C.N., 2000 :** Antimicrobial effect of herb extracts against E. coli O157:H7, L. monocytogenes, and S. typhimurium associated with beef. *J. Food Protect.*, Vol. 63, N°5, pp : 601-607.
- CUVELIER M.E., RICHARD H. et BERSET C., 1996 :** Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and Rosemary. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, Vol. 73, pp : 645 – 652.
- DANILENKO M., WANG Q., WANG X., LEVY J., SHARONI Y. et STUDZINSKI G. P., 2003 :** Carnosic acid potentiates the antioxidant and prodifferentiation effects of 1,2-dihydroxyvitamin D3 in leukemia cells, but does not promote elevation of basal levels of intracellular calcium. *Cancer Res.*, Vol. 63, pp : 1325–1332.
- DE FEO V., BRUNO M., TAHIRI B., NAPOLITANO F. et SENATORE F., 2003 :** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Thymus spinulosus Ten. (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 51, pp : 3849-3853.
- DEANS S.G. et RITCHIE G., 1987 :** Antimicrobial Properties of Plant Essential oils. *Int.J. Food Microbiol.*, Vol. 5, pp : 165-180.
- DEANS S.G., NOBLE R.C., HILTUNEN R., WURYANI W. et PENZES L.G., 1995 :** Antimicrobial and antioxidant properties of Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry : Impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. *Flavour and Fragrance J.*, Vol. 10, pp : 323 – 328.
- DELAQUIS P.J., STANICH K., GIRARD B. et MAZZA G., 2002 :** Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill , Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 74, pp : 101-109.
- D'EVOLI L., HUIKKO L., LAMPI A.M., LUCARINI M., LOMBARDI-BOCCIA G., NICOLI S. et PIIRONEN V., 2006 :** Influence of rosemary (*Rosmarinus officinalis*

- L.) on plant sterol oxidation in extra virgin olive oil. Mol. Nutr. Food Res., Vol. 50, pp : 818 – 823.
- DEYSSON G., 1978 :** Organisation et classification des plantes vasculaires Tome II. Edition SEDES & CDVI. 381 p.
- DHARMAWAN J., KASAPIS S., CURRAN P. et JOHNSON J.R., 2007 :** Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I: Freshly-squeezed juice. Flavour Fragrance J., Vol. 22, pp : 228–232.
- DI GIACOMO A. et DI GIACOMO G., 2002 :** Essential oil production, Chapiter 8. Cité In DUGO G. et DI GIACOMO A., 2002 : Citrus, the genus Citrus. Medicinal and aromatic plants – Industrial profiles. Edition CRC Taylor and Francis Group. 642 p.
- DI GIACOMO A., RAPISARDA P. et SAFINA G., 1992 :** *L'industria dei Derivati Agrumari.*, Stazione Sperimentale Industria Essenze Derivati Agrumari, Reggio Calabria, Italy.
- DIAB Y., AUEZOVA L., CHEBIB H., CHALCHAT J.C. et FIGUEREDO G., 2002 :** Chemical composition of Lebanese rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil as a function of the geographical region and the harvest time. *J. Ess. Oil Res.*, Vol. 14, pp : 449 - 452.
- DIAS P.C., FOGLIO M.A., POSSENTI A. et DE CARVALHO J.E., 2000 :** Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L., *J. Ethnopharmacol.* Vol. 69, pp : 57 – 62.
- DIAZ-MAROTO M.C., SANCHEZ PALOMO E., CASTRO L., GONZALEZ VINAS M.A. et PEREZ-COELLO M.S., 2007 :** Changes produced in the aroma compounds and structural integrity of basil (*Ocimum basilicum* L.) during drying. *J. Sci. Food Agric.* Vol. 84, pp : 2070–2076.
- DJENANE D., SANCHEZ-ESCALANTE A., BELTRAN J.A. et RONCALES P., 2002 :** Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chem.*, Vol. 76, pp : 407–415.
- DORMAN H.J. et DEANS S.G., 2000 :** Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 88, pp : 308-316.
- DORMAN H.J.D., PELTOKETO A., HILTUNEN R. et TIKKANEN M.J., 2003 :** Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem.* Vol. 83, pp : 255–262.
- DUARTE C., MOLDAO-MARTINS M., GOUVEIA A.F., BEIRAO DA COSTA S., LEITAO A.E. et BERNARDO-GIL M.G., 2004 :** Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J. Supercrit. Fluids*, 2004, vol., 30, pp : 155 – 161.
- DUGO G. et DI GIACOMO A., 2002 :** Citrus. The genus Citrus. Taylor & Francis Publishing, London. 638 p.
- DUGO P., MONDELLO L., COGLIANDRO E., VERZERA A. et DUGO G., 1996 :** On the Genuineness of Citrus Essential Oils. 51. Oxygen Heterocyclic Compounds of Bitter Orange Oil (*Citrus aurantium* L.) *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 44, pp : 544 - 549.
- DURVELLE J.-P., 1893 :** Fabrication des essences et des parfums. Editeur J. FRITSCH, Paris.
- DURVELLE J.-P., 1930 :** Fabrication des essences et des parfums. Ed. Desforges, Girardot et Cie, 807 p.
- ELA M.A., EL-SHAER N.S., et GHANEM N.B., 1996 :** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, Vol. 51, pp : 993 – 995.

- ELAMRANI A., ZRIRA S. et BENJILALI B., 2000 :** A study of Moroccan rosemary oils. *J. Ess. Oil Res.*, Vol. 12, pp : 487 – 495.
- ELGAYYAR M., DRAUGHON F.A. GOLDEN D.A. et MOUNT J.R., 2001 :** Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food Protec.*, Vol. 64, N°7, pp : 1019 – 1024.
- ESKILSSON C. S. et E. BJORKLUND, 2000 :** Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogra. A*, Vol. 902, pp : 227 – 250.
- EXARCHOU V., NENADIS N., TSIMIDOU M., GEROTHANASSIS I.P., TROGANIS A. et BOSKOU D., 2002 :** Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J. Agri. Food Chem.* Vol. 50, pp : 5294 – 5299.
- FALCHI DELITALA L. et SOCCOLINI F., 1980 :** Investigations on *Rosmarinus officinalis* L. from Sardinia. *Riv. Itali. EPPOS*, LXII, 4, pp : 195-201.
- FARAG R.S., DAW Z.Y., HEWEDI F.M. et EL-BAROTY G.S.A., 1989 :** Antimicrobial Activity of Some Egyptian Spice Essential Oils. *J. Food Protec.*, Vol. 52, N° 9, pp : 665 – 667.
- FARBOOD M.I., MACNEIL J.H., et OSTOVAR K., 1976 :** Effects of rosemary spice extractive on growth of microorganisms in meats. *J. milk food technol.*, Vol. 39, pp : 675 - 679.
- FLAMINI G., CIONI P.L., MORELLI I., MACCHIA M., et CECCARINI L., 2002 :** Main Agronomic – Productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 50, pp : 3512–3517.
- FUNK & WAGNALLS, 2004 :** Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls. URL : <http://www.Funkandwagnalls.com>.
- GAFFNEY B., HAVEKOTTE M., JACOBS B. et COSTA L., 1996 :** Charm analysis of two *Citrus sinensis* peel oil volatiles . *Perfumer and Flavorist*. Vol. 21, pp : 1–2 , 4–5.
- GAO L.P., WEI H.L., ZHAO H.S., XIAO S.Y. et ZHENG R.L., 2005 :** Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie*. Vol. 60, pp : 62 – 65.
- GARNERO J., 1996 :** Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345 pp 1-45.
- GEORGANTELIS D., AMBROSIADIS I., KATIKOU P., BLEKAS G., et GEORGAKIS S.A., 2007 :** Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, Vol. 76, pp : 172 – 181.
- GERSHENZON J., MCCASKILL D., RAJAONARIVONY J.I.M., MIHALIAK C., KARP F. et CROTEAU R., 1992 :** Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products. *Anal. Biochem.*, Vol. 200, pp. 130–138.
- GERTENBACH D.D., 2001 :** Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. In J. Shi, G. Mazza, & M. L. Maguer (Eds.), *Functional foods: biochemical and processing aspects* (pp. 331e366). Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- GILDEMEISTER E. et HOFFMANN FR., 1912 :** Les huiles essentielles. 2^{ème} Edition. Edition Schimmel & Cie, Miltitz près leipzig.
- GORINSTEIN S., BELLOSO O.M., PARK Y.-S., HARUENKIT R., LOJEK A., CIZ M., CASPI A., LIBMAN I. et TRAKHTENBERG S., 2001 :** Comparison of some

- biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chem.*, Vol. 74, pp : 309–315.
- GRiffin S.G., WyLLIE, S.G.; MAKHAM J.L. et LEACH D.N., 1999 :** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragrance J.*, Vol. 14, pp : 322-332.
- GUENTHER E., 1949 :** The essential oils. D. Van Nostrand Co., New York, N.Y.
- GUIMARAES R., BARROS L., BARREIRA J.C.M., SOUSA M. J., CARVALHO A.M. et FERREIRA I.C.F.R., 2010 :** Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol.*, Vol. 48, pp : 99 – 106.
- HALLIWELL B., 1996 :** Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.*, Vol. 16, pp : 33–50.
- HALOUI M., LOUEDEC L., MICHEL J.-B. et LYOUSSE B., 2000 :** Experimental diuretic effects of Rosmarinus officinalis and Centaurium erythraea. *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 71, pp : 465 – 472.
- HARAGUCHI H., SAITO T., OKAMURA N. et YAGI A., 1995 :** Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med.*, vol. 61, pp : 333–336.
- HELANDER I.M., ALAKOMI H.-L., LATVA-KALA K., MATTILA-SANDHOLM T., POL I., SMID E.J., GORRIS L.G.M. et WRIGHT A.V., 1998 :** Charcterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, pp : 3590-3595.
- HENDRIX C.M. et REDD J.B., 1995 :** Chemistry and Technology of Citrus Juices and By-Products. In : Ashurst, P.R., 1995 : Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic & Professional, pp: 53-87.
- HOULIHAN C.M., HO C.T. et CHANG S.S., 1985 :** The structure of rosmarinquinone: A new antioxidant isolated from Rosmarinus officinalis L. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, Vol. 62, pp : 96 – 98.
- HUNTER G.L.K. et BROGDEN W.B., 1965^a :** Analysis of terpene and sesqueterpene hydrocarbon in some citrus oils. *J. Food. Sci.* Vol. 30, pp : 383 – 387.
- HUNTER G.L.K. et BROGDEN W.B., 1965^b :** Conversion of valencene to nootkatone. *J. Food. Sci.* Vol. 30, pp : 876 – 878.
- HUNTER G.L.K. et MOSHONAS M.G., 1965 :** Isolation and identification of alcohols in cold-pressed Valencia orange oil by liquid–liquid extraction and gas-chromatography. *Anal. Chem.*, Vol. 37, pp : 378–380.
- HUNTER G.L.K. et MOSHONAS M.G., 1966 :** Analysis of alcohols in essential oils of grapefruit, lemon, lime and tangerine. *J. Food. Sci.*, Vol. 31, pp : 167–171.
- HUSSEIN A.M.S., 1990 :** Antibacterial and antifungal activities of some Libyan aromatic plants. *Planta Medica*, Vol. 56, pp : 644 – 649.
- IKEDA R.M. et SPITLER E.M., 1964 :** Isolation, identifi cation, and gas-chromatographic estimation of some esters and alcohols of lemon oil. *J. Agric. Food. Chem.*, Vol. 12, pp : 114–117.
- INATANI R., NAKATANI N. et FUWA H., 1983 :** Antioxidant effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, Vol. 47, pp : 521 – 528.

- INOUE S., TAKIZWA T. et YAMAGUCHI H., 2001 :** Antibacterial Activity of Essential oils and Their Major Constituents Against Respiratory Tract Pathogens by Gaseous Contact. *J. Antimi. Chemo.*, Vol. 47, pp : 565-573.
- JAGANMOHAN R.L., MEENAKSHI S., RAGHAVAN D. et ABRAHAM K.O., 1997 :** Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): impact of drying on its flavor quality. *J. Food Qual.*, Vol. 21, pp : 107 – 115.
- JALOSZYNSKI K., FIGIEL A. et WOJDYŁO A., 2008 :** Drying kinetics and antioxidant activity of oregano. *Acta Agrophysica*. Vol. 11, pp : 81–90.
- JANZ J. A. M., MOREL P. C. H., WILKINSON B. H. P., et PURCHAS R. H., 2007 :** Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Sci.*, Vol. 75, pp : 360–365.
- JAY J.M., 1996 :** Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low verus high numbers. *Meat Sci.*, Vol. 43, pp : S59 – S66.
- KANDIAH M. et SPIRO M., 1990 :** Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with supercritical carbon dioxide. *International J. Food Sci. Tec.*, Vol. 25, pp : 328 - 338.
- KEFFORD J.F. et CHANDLER B.V., 1970 :** The chemical constituents of citrus fruits. In *Advances in food research*, Supplement 2, Chichester, C.O. (E.M. Mrak, and G.F. Stewart, eds.), Academic Press, New York.
- KESTERSON J.W. et BRADDOCK R.J., 1976 :** By-products and specialty products of Florida citrus. *Fla. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* No. 784, University of Florida, Gainesville, FL, USA, pp : 4 – 25.
- KESTERSON J.W. et HENDRICKSON R., 1962 :** Composition of Valencia orange oil as related to fruit maturity. *Amer. Perfumer Cosmet.* Vol. 77(12), pp : 21–24.
- KESTERSON J.W. et HENDRICKSON R., 1963 :** Evaluation of cold-pressed Marsh grapefruit oil. *Amer. Perfumer Cosmet.* Vol. 78, pp : 32–35.
- KESTERSON J.W. et HENDRICKSON R., 1964 :** Comparison of red and white grapefruit oils. *Amer. Perfumer cosmet.* Vol. 79, pp : 34–36.
- KIM D.S., KIM H.R., WOO E.R., HONG S.T., CHAE H.J. et CHAE S.W., 2005 :** Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 70, pp :1066 – 1078.
- KIMBALL D.A., 1999 :** Citrus processing : A complete guide. Second edition, Aspen Publication inc. 435 p.
- KING J.W., 2004 :** Critical fluid technology for the processing of lipid-related natural products. *Comptes Rendus Chimie*, Vol. 7, pp : 647 – 659.
- KINGSTON M.M. et HASWELL S.J., 1997 :** Microwave – Enhanced Chemistry, Fundamentals, Sample Preparation, and applications. Edition American Chemistry Society, Washignton, DC, 772 p.
- KOEDAM A., MARGARIS N. et VOKOU D., 1982 :** Aromatic plants: Basic and Applied Aspects. Martinus Nijhoff publishers, The Hague.
- LARRAN S., RINGUELET J.A., CARRANZA M.R., HENNING C.P., RE M.S., CERIMELE E.L. et URRUTIA M.I., 2001 :** In vitro fungistatic effect of essential oils against *Ascospaera apis*. *J. Ess. Oil Res.*, Vol. 13, pp : 122 – 124.
- LARSON R.A., 1997 :** Naturally occurring antioxidants. Ed. Boca Raton : Lewis publishers, CRC Press; 1997.

- LAWRANCE B.M., 2009 :** A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries. *Perfumer & Flavorist*. Vol. 34, January 2009, pp : 38-47.
- LE FLORENTIN R., 1914 :** Les Parfums. Edition, Librairie générale scientifique et industrielle, H. DESFORGES. Paris.
- LECLERC H., GAILLARD J.L. et SIMONET M., 1995 :** Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. Doin éditeurs-paris, 535 p.
- LEUNG, A.Y. et FOSTER, S., 1996 :** Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics, second ed. Wiley, New York, pp. 446–448.
- LEYBROS J. et FREMEAUX P., 1990 :** Extraction solide-liquide, aspect théorique. Techniques de l'ingénieur J 2780 pp 7-8.
- LIS-BALCHIN M., BUCHBAUER G., HIRTENLEHNER T. et RESCH M., 1998 :** Antimicrobial Activity of Pelargonium Essential Oils added to a quiche filling as a model food system. *Lett. in Appl. Microbiol.*, Vol. 27, pp : 207-210.
- LORBER P. et MULLER N.H., 1976 :** Volatile growth inhibitors produced by *Salvia leucophylla* : effect on root tip ultrastructure. *Amer. J. Bot.*, Vol. 63, pp : 196 – 200. Cité in VOKOU D., VARELTZIDOU S. et KATINAKIS P., 1993 : Effects of aromatic plants on potato storage : sprout suppression and antimicrobial activity. *Agri. Ecosys. Enviro.*, vol. 47, pp : 223 – 235.
- LUCCHESI M. E., CHEMAT F. et SMADJA J., 2004^a :** Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromato A*, , Vol. 1043, pp : 323-327.
- LUCCHESI M. E., CHEMAT F. et SMADJA J., 2004^b :** An original solvent free microwavextraction of essential oil from spices. *Flavour Fragrance J.*, Vol. 19, pp : 134 – 138.
- LUQUE DE CASTRO M.D. et FRIEGO-CAPOTE F., 2007 :** Ultrasound assistance to liquidliquid extraction : A debatable analytical tool. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 583, pp : 2 – 9.
- MABBERLEY D.J., 1997 :** A classification for edible *Citrus* (Rutaceae). *Telopea* Vol.7 (2) pp : 167 – 172.
- MABBERLEY D.J., 2008 :** Mabberley's plant-book. A portable dictionary of plants, their classifications and uses, third edition. Cambridge University Press. 1040 p.
- MACLEOD W.D. et BUGUES N.M., 1964 :** Sesquiterpenes. I. Nootkatone, a new grapefruit flavour constituent. *J. Fd. Sci.* Vol. 29, pp : 565 – 568.
- MADSEN H.L. et BERTELSEN G., 1995 :** Spices as antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* Vol. 6, pp : 271–277.
- MANGENA T. et MUJIMA N.Y.O., 1999 :** Comparative evaluation of the antimicrobial activities of Essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rsmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Appl. Microb.*, Vol. 28, pp : 291-296.
- MANN C.M., COX S.D. et MARHAM J.L., 2000 :** The outer membrane of *pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. in Appl. Microbial.*, Vol. 30, pp : 294-297.
- MANUNTA A., 1985 :** Influences of the pH of the substratum on the composition of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Studi sassaresi sez. III Vol XXXII*, 86, 111-118.
- MARCHAND L., 2002 :** Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomed. Pharmacother.* Vol. 56, pp : 296–301.

- MARIN M., KOKO V., DULETIĆ-LAUŠEVIĆ S., MARIN P.D., RANČIĆ D. et DAJIC-STEVANOVIC Z., 2006 :** Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. *S.African J. Botany*, Vol. 72, pp : 378 – 382.
- MARINO M., BERSANI C. et COMI G., 1999 :** Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L. Measured Using a Bioimpedometric Method. *J. Food Protec.*, Vol. 62, N° 9, pp : 1017 -1023.
- MASATOSHI H. et HIROAKI K., 1997 :** Repellency of rosemary oil and its components againts the Onion aphid, *Neotoxoptera formosana*. *Appl. Entomol. Zoot.*, Vol. 32, pp : 3303 - 3310.
- MASON T.J. et CINTAS P., 2002 :** Sonochemistry, Chapitre 16, pp : 372 - 396 In CLARK J. et MACQUARRIE D., 2002 : Handbook of Green Chemistry and Technology. Editon Blackwell Science Ltd. 540 p.
- McCASKILL D.G., GERSHENZON J. et CROTEAU R., 1992 :** Morphology and monoterpane biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta* Vol. 187, pp. 445–454.
- McCORMICK K. A., OLIVARES J. S., FISHER R. A., NAHIR T. M., et PHELPS C. L., 2006 :** Effect of sample preparation on the amounts of α -pinene and verbenone extracted from rosemary. *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 18, pp : 478–480.
- MEENA M.R. et SETHI V., 1994 :** Antimicrobial activity of the essential oils from spices. *J. Food Sci. and Tech. Mysore*, Vol. 31, pp : 68 – 70.
- MENGAL P. et MONPON B., 1994 :** Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. *Brevet international*, WO 94/26853.
- MENGAL P., BEHN D., BELLIDO GIL M. et MONPON B., 1993 :** VMHD : extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, Vol. 114, 66-67
- METAXIS A.C., et MEREDITH R. J., 1988 :** *Industrial Microwave Heating*. Peregrinus, London, 1988.
- MINH TU N.T., THANH L.X., UNE A., UKEDA H. et SAWAMURA M., 2002 :** Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour Fragrance J.* Vol. 17, pp : 169 – 174.
- MOÍNO M. I., MARTINEZ C., SOTOMAYOR J. A., LAFUENTE A., et JORDAN M. J., 2008 :** Polyphenolic transmission to segureño lamb meat from ewes dietary supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *J. Agri. Food Chem.*, Vol. 56, pp : 3363–3367.
- MÖLLER K., 2008 :** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO. 152 P.
- MOSHONAS M.G. et SHAW P.E., 1979 :** Composition of essence oil from overripe oranges. *Agric. Food. Chem.* Vol. 27, pp : 1337 – 1339.
- MOULIN J.-P., PAREAU D., RAKIB M. et STAMBOULI M., 2002 :** Transfert de matière. Extraction liquide – liquide. Techniques de l'ingénieur J1073, pp : 1 – 13.
- MOULY P.P., ARZOUYAN C.R., GAYDOU E.M. et ESTIENNE J.M., 1995 :** Chromatographie des flavanonosides des jus de différentes variétés de pamplemousses, différenciation par analyses statistiques multidimensionnelles. *Analisis.*, Vol. 23, pp : 336-341.

- MOULY P.P., ARZOUYAN C.R., GAYDOU E.M. et ESTIENNE J.M., 1996 :** Différenciation des jus de Citrus par analyses statistiques multivariées. Partie II. Cas des oranges et des mandarines. *Analusis.*, Vol. 24, pp : 230-239.
- MUHOHO NJOROGE S., KOAZE H., MWANIKI M., MINH TU N. T. et SAWAMURA M., 2005 :** Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Flavour Fragance J.*, Vol. 20, pp : 80 – 85.
- MULLER C.H. et DEL MORAL R., 1966 :** Soil toxicity induced by terpenes from *Salvia leucophylla*. Bull. Torrey Bot. Club, Vol. 93, pp : 130 – 137. Cité in VOKOU D., VARELTZIDOU S. et KATINAKIS P., 1993 : Effects of aromatic plants on potato storage : sprout suppression and antimicrobial activity. *Agri. Ecosys. Envir*, vol. 47, pp : 223 – 235.
- NAKATANI N. et INATANI R., 1984 :** Two antioxidative diterpenes from Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and a revised structure for rosmanol. *Agric. Biol. Chem.* Vol. 48, pp : 2081–2085.
- NATIONS UNIS, 2010 :** world trade data of citrus. URL : <http://www.un.org>.
- NAVES Y.R., 1976 :** Parfums, Cosmétiques, savons, Vol. 58, p. 105. Cité in GARNERO J., 1996 : Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345 pp 1-45.
- NEAS E.D., et COLLINS M.J., 1988 :** In *Introduction to Microwave Sample Preparation* Kingston H. M., et Jassie, L. B., (eds). American Chemical Society, Washington, DC, 1988, pp. 7–32.
- NORMAN S., CRAFT C.C. et DAVIS P.I., 1967 :** Volatiles from injured and uninjured Valencia oranges at different temperatures. *J. Food. Sci.* Vol. 32, pp : 656 – 659.
- NYCHAS G.J.E., 1995 :** Natural antimicrobial from plants. pp: 58-89. In G.W. Gould (ed.), New methods of food preservation. Blackie Academic an professional, London. Cité In : CUTTER C.N., 2000 : Antimicrobial effect of herb extracts against *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, and *S. typhimurium* associated with beef. *J. Food protect.*, Vol. 63, N°5, pp : 601-607.
- O'GRADY M. N., MAHER M., TROY D. J., MOLONEY A. P., et KERRY, J. P., 2006 :** An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Sci.*, Vol. 73, pp : 132–143.
- OFFORD E.A., MACE K., RUFFIEUX C., MALNOE A. et PFEIFER A.M.A., 1995 :** Rosmery components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells. *Carcinogenesis* Vol. 16, pp : 2057 – 2062.
- OUTTARAR B., SIMARD R.E., HOLLEY R.A., PIETTE G.J. et BÉGIN A., 1997 :** Antimicrobial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms *Int. J. Food Microbiol.*, Vol., 37, pp : 155 – 162.
- ÖZCAN M.M. et CHALCHAT J.C., 2008 :** Chemical composition and antifungal activity of rosemary(*Rosmarinus officinalis L.*) oil from Turkey. *Inter. J. Food sci. nutri.*, Vol. 59, pp : 691 – 698.
- PARE J.R.J. et BELANGER J.M.R., 1997 :** Instrumental methods in foods analysis. Elsevier, Amsterdam.
- PARÉ J.R.J., 1994 :** Microwave extraction of volatile oils. *Brevet américain*, US 5 338 557.
- PARÉ J.R.J., SIGOUIN M. et LAPOINTE J., 1990 :** Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet européen*, EP 398798.
- PARÉ J.R.J., SIGOUIN M., et LAPOINTE J., 1991 :** Microwave assisted natural product extraction. *Brevet américain*, US 5 002 784.

- PARIS A., STRUKELJ B., RENKO M., TURK V., PUKI M., UMEK A. et KORANT B.D., 1993 :** Inhibitory effect of carnosolic acid on HIV-1 protease in cell-free assays. *J. Nat. Prod.* Vol. 56, pp : 1426 – 1430.
- PARRY E. J., 1921 :** The chemistry of essential oils and artificial perfumes (4th ed.). London: Scott Greenwood & Son.
- PEARSON D.A., FRANKEL E.N., AESCHBACH R. et GERMAN J.B., 1997 :** Inhibition of Endothelial cell mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 45, pp : 578 – 582.
- PELLERIN P., 1991 :** Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. *Perfum. Flav.*, Vol. 16, pp : 37 – 39.
- PELLERIN P., 2001 :** Extraction par le CO₂ à l'état supercritique. *Ann. Fals. Exp. Chim.* V. 94, N°954 – pp : 51-62.
- PERRUT M., 1999 :** Extraction par fluide supercritique. Les techniques de l'ingénieur. J 2 770.
- PEYRON L., 1992 :** Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Chapitre 10, pp 217 – 238. *Cité In* : Les arômes alimentaires. Coordinateurs RICHARD H. et MULTON J.-L. Ed. Tec & Doc-Lavoisier et Apria. 438 p.
- PEYRON L., 2002 :** Production of bitter orange neroli and petitgrain oils. *Cité In* Dugo G. And Di Giacomo A., 2002 : Citrus, the Genus Citrus. Edition Taylor and Francis. 642 p.
- PHI N.T.L., TU N.T.M., NISHIYAMA C. et SAWAMURA M., 2006 :** Characterisation of the odour volatile in *Citrus aurantifolia* Pers lime oil from vietnam. *Dev. Food Sci.* Vol. 43, pp : 193 – 196.
- PINTORE G., USAI M., BRADESI P., JULIANO C., BOATO G., TOMI F., CHESSA M., CERRI R. et CASANOVA J., 2002 :** Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour Fragrance*, Vol. 17, pp : 15-19.
- PONCE A. G., ROURA S. I., DEL VALLE C. E. ET MOREIRA M. R., 2008 :** Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and in vivo studies. *Postharv. Bio. Techno.*, Vol. 49, pp : 294–300.
- POPOV I. et LEWIN G., 1999 :** Oxidants and antioxidants part B – antioxidative homeostasis: Characterization by means of chemiluminescent technique. *Methods in Enzymology*, Vol. 300, pp : 437–456.
- PORTE A., DE O., GODOY R.L., LOPES D., KOKETSU M., GONCALVES S.L. et TORQUILHO H.S., 2000 :** Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil. *J. Ess. Oil Res.*, Vol. 12, pp : 577 – 580.
- PSOTOVA J., CHLOPCIKOVA S., MIKETOVA P. et SIMANEK V., 2005 :** Cytoprotectivity of *Prunella vulgaris* on doxorubicin-treated rat cardiomyocytes. *Fitoterapia*. Vol. 76, pp : 556 – 561.
- QIAO S., LI W., TSUBOUCHI R., HANEDA M., MURAKAMI K., TAKEUCHI F., NISIMOTO Y. et YOSHINO M., 2005 :** Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Research*. Vol. 39, pp : 995 – 1003.
- QUINTERO A., GONZALEZ C.N., SANCHEZ F., USUBILLAGA A. et ROJAS L., 2003 :** Constituents and biological activity of *Citrus aurantium amara* L. essential oil . *Acta Hortic*, Vol. 597, pp : 115 – 117.

- RAO A.V. et RAO L.G., 2007 :** Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* Vol. 55, pp : 207 – 216.
- RAVEN P. H., EVERET R.F. et EICHHORN S.E., 2000 :** Biologie végétale. Edition De Boeck Université s.a. 944 p.
- REZZOUG S.A., BOUTEKEDJIRET C. et ALLAF K., 2005 :** Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. *J. Food Engin.* Vol. 71, pp : 9 – 17.
- REZZOUG S.A., LOUKA N., MAACHE-REZZOUG Z., NOUVIAIRE A. et ALLAF K., 1998 :** Présentation du séchage couple à la texturation par détente instantanée contrôlée. Application aux produits agro-alimentaires en morceaux 10^{ème}, pp : 319 – 324. rencontres scientifiques et technologiques des industries alimentaires, AGORAL, Ed. Lavoisier.
- RICHHEIMER S.L., BERNART M.W., KING G.A., KENT M.C. et BAILEY D.T., 1996.** Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from Rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.* Vol. 73, pp : 507–514.
- RODRIGO M.I., MALLENT D. et CASAS A., 1985 :** Relationship between the acid and limonin content of Washington navel orange juices. *J. Sci. Food. Agric.* Vol. 36, pp : 1125 – 1129.
- ROMANO C.S., ABADI K., REPETTO V., VOJNOV A.A. et MORENO S., 2009 :** Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food Chem.*, Vol. 115, pp : 456-461.
- SACCHETTI G., MAIETTI S., MUZZOLI M., SCAGLIANTI M., MANFREDINI S. et RADICE M., 2005 :** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91, 621–632.
- SALISOVA M., TOMA S. et MASON T.J., 1997 :** Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 4, pp : 131 – 134.
- SALLE J-L., 2004 :** Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie. Editions Frison-Roche, 2^{ème} édition. 220 p.
- SANCHEZ-ESCALANTE A., DJENANE D., TORRESCANO G., BELTRAN J.A., et RONCALES P., 2001 :** The effects of ascorbic acid, taurine, carnosine and rosemary powder on colour and lipid stability of beef patties packaged in modified atmosphere. *Meat Sci.*, Vol. 58, pp : 421–429.
- SAPORTA G., 2006 :** Probabilités, analyse des données et statistiques. Edition Technip, 2^{ème} édition. 619 p.
- SARDANS J., RODÀ F. et PEÑUELAS J., 2005 :** Effects of water and a nutrient pulse supply on *Rosmarinus officinalis* growth, nutrient content and flowering in the field. *Enviro. Experi. Botany.* Vol. 53. pp : 1 – 11
- SARRAZIN C., LE QUÈRE J.-L., GRETSCH C. ET LIARDON R., 2000 :** Representativeness of coffee aroma extracts : comparison of different extraction methods. *Food chem.*, 2000, vol. 70, pp : 99 – 106.
- SAWAMURA M., THI MINH TU N., ONISHI Y., OGAWA E. et CHOI H.S., 2004 :** Characteristic odor components of *Citrus reticulata* Blanco (ponkan) cold - pressed oil . *Biosci Biotechnol Biochem*, Vol. 68, pp : 1690 – 1697 .
- SEBASTIANI E., DUGO G. et COTRONEO A., 1983 :** Sulla genuinità delle essenze agrumarie. Nota V. Valutazione di alcuni tipi di fasi stazionarie per l'analisi della

- frazione volatile degli olii essenziali di limone mediante gascromatografia ad alta risoluzione. *Essenz. Deriv. Agrum.*, Vol. 53, pp : 501-514.
- SEBRANEK J. G., SEWALT V. J. H., ROBBINS K. L., et HOUSER T. A., 2005 :** Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat Sci.*, Vol. 69, pp : 289–296.
- SEGORANS F.J. , RUIZ-RODRIGUEZ A., IBANEZ E., TABERA J. et REGLERO G., 2003 :** Isolation of brandy aroma by countercurrent supercritical fluid extraction. *J. supercrit. Fluids*, 2003, Vol. 26, pp : 129 – 135.
- SERRANO E., PALMA J., TINOCCO T., VENANCIO F. et MARTINS A., 2002 :** Evaluation of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from different zones of “Alentejo” (Portugal). *J. Ess. Oil Res.*, Vol. 14, pp : 87 – 92.
- SHAHIDI F. et NACZK M., 2004 :** Phenolics in food and nutraceuticals. New York: CRC Press.
- SHARMA S., SANGWAN N.S. et SANGWAN R.S., 2003 :** Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current sci.* Vol. 84 N°25 pp : 544 – 550.
- SHAW P.E., 1979 :** Review of quantitative analysis of citrus essential oils. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 27, pp : 246–256.
- SHAW P.E., WILSON C.W. et BERRY R.E., 1981 :** Some important flavor compounds in mandarin, grapefruit and orange juices and peel essential oils. *Proc. Int. Soc. Citric.*, Vol. 2, pp : 911–914.
- SHU G.J., DIANXIANG Z. et MABBERLEY D.J., 2008 :** Citrus Linnaeus, Sp. PI. 2 : 782. 1753. Fl. China, Vol. 11, pp : 90 – 96.
- SHUANG-SHENG H. et RONG-LIANG Z., 2006 :** Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. *Cancer Letters*, Vol. 239, pp : 271–280.
- SHYLAJA M.R., et PETER K.V., 2004 :** The functional role of herbal spices. In: Peter, K.V. ed. *Handbook of herbs and spices*, Vol. 2. England: Woodhead Publishing Limited.
- SKOOG D.A., HOLLER F.J. et NIEMAN T.A., 2003 :** Principes d'analyse instrumentale. Edition De Boeck Diffusion s.a., 956 p.
- SMADJA J.M., 1987 :** Influence climatique et régionale sur la qualité de l'huile essentielle de Vetyver Bourbon. Thèse de Doctorat d'État, Université du Languedoc, France.
- SMITH-PALMER A., STEWART J. et FYFE L., 1998 :** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. in Appl. Microbiol.*, Vol. 26, pp : 118-122.
- SONKAR R.K. et LADANIYA M.S., 1995 :** Effect of fruit maturity and degreening on bitterness of ‘Nagpur’ mandarin juice. *Indian Food. Packer* November/December, pp. 11–16.
- SOTELO-FELIX J.I., MARTINEZ-FONG D., MURIEL P., SANTILLAN R.L., CASTILLO D. et YAHUACA P., 2002 :** Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J. Ethanopharmacol.* Vol. 81, pp : 145–154.
- SPIEGEL-ROY P. et GOLDSCHMIDT E.E., 1996 :** Biology of Citrus. 1^{ère} édition; Edition Cambridge University Press. 239 p.
- SPIRO M. et KANDIAH M., 1989 :** Extraction of ginger rhizome: kinetic studies with acetone. *International J. Food Sci. Techno.*, Vol. 24, pp : 589 - 600.

- SROKA Z., FECKA I. et CISOWSKI W., 2005 :** Antiradical and anti-H₂O₂ properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. *Zeitschrift für Naturforschung*. Vol. 60, pp : 826 – 832.
- STAFFORD J. et BODSON P., 2006 :** L'analyse multivariée avec SPSS. Presses de l'Université du Québec. 245 p.
- STANGLER HERODEZ S., HADOLIN M., SKERGET M., et KNEZ Z, 2003 :** Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.*, Vol. 80, pp : 275 - 282.
- STANLEY W.L., 1962 :** Citrus oils: analytical methods and compositional characteristics. *Intern. Fruchtasft-Union*, Ber. Wiss. Tech. Komm. Vol. 4, pp : 91–103.
- STANLEY W.L., IKEDA R.M., VANNIER S.H. et ROLLE I.A., 1961 :** Determination of the relative concentration of the major aldehydes in lemon, orange and grapefruit oils by gas chromatography. *J. Food. Sci.* Vol. 26, pp : 43 – 48.
- STASHENKO E.E., JARAMILLO B.E. et MARTINEZ J.R., 2004^a :** Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chroma. A.*, Vol. 1025, pp : 105-113.
- STASHENKO E.E., JARAMILLO B.E. et MARTINEZ J.R., 2004^b :** Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J.Chroma. A.*, Vol. 1025, pp : 93 – 103.
- TAKENAKA M., WATANABE T., SUGAHARA K., HARADA Y., YOSHIDA S. et SUGAWARA F., 1997 :** New antimicrobial substances against *Streptomyces* scabies from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol. 61, pp : 1440 – 1444.
- TOURSEL P., 1997 :** Extraction high-tech pour notes fraîches. *Process*, Vol. 1128, pp : 38 – 41.
- TRANCHANT J., ARPINO P., PRÉVÔT A., SERPINET J., VERGNOL A. et WITIER P., 1995 :** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4^{ème} édition. Edition MASSON, 700 p.
- TUBEROSO C.I.G., SATTA M., CABRAS P. et GARAU V.L., 1998 :** Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* of Sardinia. *J. Ess. Oil Res*, Vol. 10, pp : 660 - 664.
- TUCKER A.O., et MACIARELLO M. J., 1986 :** The essential oils of rosemary cultivars. *Flavour Fragrance J.*, Vol. 1, pp : 137–142.
- TURNER C., 2006 :** Modern extraction techniques. Food and agricultural samples. ACS Symposium Series 926. Edition,, American Chemical Society, Washington, DC. 189 p.
- TURNER G., GERSHENZON J., NIELSON E.E., FROEHLICH J.E. et CROTEAU R., 1999 :** Limonene Synthase, the Enzyme Responsible for Monoterpene Biosynthesis in Peppermint, Is Localized to Leucoplasts of Oil Gland Secretory Cells. *Plant Physiology*, July 1999, Vol. 120, pp. 879 – 886.
- TYLER V.E., BRADY L.R. et ROBBERS J.E., 1976 :** Pharmacognosy. Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 171 p.
- ULTEE A., GORRIS L.G.M. et SMID E.J., 1998 :** Bactericidal Activity of Carvacrol Towards the Food-borne Pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 85, pp : 211-218.
- ULTEE A., SLUMP R.A., STEGING G.A. et SMID E.J., 2000 :** Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.* Vol. 63, pp : 620 – 624.

- USDA, 2007** : World Horticultural Trade : Trade data edition, URL : <http://www.fas.usda.gov/ustrade>.
- USDA, 2010** : World Horticultural Trade : Trade data edition, URL : <http://www.fas.usda.gov/ustrade>.
- VAN DEN DOOL H. et KRATZ P.D., 1963** : A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A.*, Vol. 11, pp : 463-471.
- VARELA F., NAVARRETE P., CRISTOBAL R., FANLO M., MELEREO R., SOTOMAYOR J.A., JORDAN M.J., CABOT P., SANCHEZ DE RON D., CALVO R. et CASES A., 2009** : Variability in the chemical composition of wild Rosmarinus officinalis L. *Acta Horti.*, Vol. 826, pp : 167 – 174.
- VINATORU M., 2001** : An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 8, pp : 303-313.
- VINATORU M., TOMA M. et MASON T.J., 1999** : Ultrasound-assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. *Adv. Sonochem.*, Vol. 5, pp : 209 – 247.
- VINATORU M., TOMA M., RADU O., FILIP P.I., LAZURCA D. et MASON T.J., 1997** : The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol. 4, pp : 135 – 139.
- VON RECHENBERG C., 1910** : Theorie der gewinnung und trennung der ätherischenöle. Selbstverlag. Von Schimmel & Co, Berlin.
- WAGNER G.J., WANG E. et SHEPHERD R.W., 2004** : New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Ann. Bota.* Vol. 93 N°1, pp : 3 – 11.
- WANG W., WENG X. et CHENG D., 2000** : Antioxidant activities of natural phenolic components from Dalbergia odorifera T. *Chen. Food Chem.*, Vol. 71, pp : 45 – 49.
- WEBBER H.J., REUTHER W. et BATCHELOR L.D., 1967** : The citrus Industry, volume 1 : History, world distribution, botany and varieties. Edition. University of California Press.
- WEERAKKODY N.S., CAFFIN N., TURNER M. S. et DYKES G. A., 2010** : *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, Vol.21, pp : 1408-1414.
- WERKER E., RAVID U. et PUTIEVSKY E., 1985** : Structure of glandular hairs and identification of the main components of their secreted material in some species of the Labiatae. *Isr. J. Bota.* 34, 31–45.
- WIJESEKARA R.O.B., RATNATUNGA C.M., DURBECK K., 1997** : The distillation of essential oils. Manufacturing and plant Construction Handbook. Eschborn, Federal Republic of Germany, Protrade, Department of foodstuffs & Agriculturak Products.
- WOLFORD R.W., KESTERSON J.W. et ATTAWAY J.A., 1971** : Physicochemical Properties of Citrus Essential Oils from Florida. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 19, pp : 1097 – 1105.
- YOKOYAMA F., LEVI L., LAUGHTON P.M., et STANLEY W.L., 1961** : Determination of citral in citrus extracts and citrus oils by conventional and modern chemical methods of analysis. *J. Assoc. Offic. Agric. Chemists.* Vol. 44, pp : 535–541.
- ZAIKA L.L., 1988** : Spices and herbs : their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Nutr.* Vol. 9, pp : 97 – 118.

- ZHENG W. et WANG S.Y., 2001 :** Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 49, pp : 5165 – 5170.
- ZIVANOVIC S., CHI S., et DRAUGHON A. F., 2005 :** Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J. Food Sci.*, Vol. 70, pp : M45–M51.
- ZLOTORZYNSKI A. : 1995 :** Methanol has relatively higher dissipation factor, which means that it could absorb much of the microwave energy and transform it into heat better than other solvents. *Crit. Rev. Anal. Chem.* Vol. 25, pp : 43 – 75.

Abstract

In most cases, sample preparation can be divided in two distinctive steps : extraction and analysis. While analytical step requires few minutes, the extraction step requires several hours. This applies to clevenger method, invented in 1928, which today is the reference for distillation extraction. Since the discovery of thermal effects of microwaves by Spencer in 1946, the impact of microwaves on the matter has been widely characterized and validated by the scientific community. Quickly, microwaves were used for extraction to contrecarrer limitations of conventional extraction procedures. Our work consisted of design, optimization and development of a new extraction technique of essential oils in vegetables matrices and by-products of food industry. The first part of the document is devoted to understanding the theoretical foundations and considerations of conventional and innovative extraction procedures. A second part of the manuscript refers to the techniques used for the design and optimization of micowaves hydrodiffusion and gravity. Finally, the last part of the manuscript deals with the results obtained and is divided into three distinct sections: in the first chapter, the development, optimization and implementation of the new device and described. The apparatus allows rapid and non destructive extractions that can generalized for various vegetables matrices. This topic is discused in a second chapter. A phenomenon comprehension of process extraction and the ecological approach of the invention, is the subject of a third and final chapter

Key words:

Microwaves hydrodiffusion and gravity, extraction, Essential oils, Citrus, Rosemary, Sustainable chemistry.

Résumé

De manière générale, l'extraction des huiles essentielles préalable à l'analyse chimique se compose de deux étapes : extraction et analyse. Alors que l'étape analytique requiert en général quelques minutes, l'étape d'extraction nécessite plusieurs heures. C'est le cas de la méthode de Clevenger, inventée en 1928 (Clevenger, 1928), qui est la procédure de distillation de référence. Depuis la découverte des effets thermiques des micro-ondes par Spencer en 1946, l'impact des micro-ondes sur la matière a été largement caractérisé et validé par la communauté scientifique. Rapidement, les micro-ondes ont été utilisées pour l'extraction dans le but de contrecarrer les limites des techniques d'extraction conventionnelles. Notre travail a consisté en la conception, l'optimisation et la valorisation d'une technique d'extraction des huiles essentielles pour les matrices végétales et co-produits alimentaires : l'Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (MHG). Une première partie du document est consacrée aux fondements et considérations théoriques des procédés conventionnelles et innovantes d'extraction des molécules aromatiques. Une seconde partie du manuscrit rappelle les techniques employées pour la conception et valorisation de la MHG. Enfin, la dernière partie du manuscrit traite des résultats obtenus et s'articule selon trois sections distinctes : dans un premier chapitre, la mise au point, et l'application du nouveau dispositif de laboratoire sont décris. L'originalité de l'appareillage réside en une extraction rapide, non destructrices et généralisables à divers matrices végétales discutées dans un second chapitre. La compréhension du phénomène mis en jeu dans l'extraction et l'approche écologique de l'invention fait l'objet d'un troisième et dernier chapitre.

Mots clés :

Hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (MHG), Extraction, Huiles essentielles, Citrus, Romarin, Développement durable.