



UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

THESE

*Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT*

Spécialité :

Biotechnologie des Plantes Aromatiques, Médicinales et
des Produits Naturels

Par

CHEKOUAL Lilia

***Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant
des huiles essentielles de Lavandula stoechas L.
du Nord de l'Algérie extraites par
Hydrodistillation et Ultrasons***

Soutenue le 07 mars 2019 devant un jury composé de :

Pr. El-Hadi D.	Université de Blida 1	Président
Pr. Bendifellah L.	Université de Boumerdes	Examinatrice
Dr. Acheuk F.	Université de Boumerdes	Examinatrice
Dr. Boukhatem M.N.	Université de Blida 1	Examineur
Dr. Aissat A.E.K.	Université de Blida 1	Rapporteur
Dr. Benabdelkader T.	Université de Boumerdes	Invité
Dr. Ait-Kaci K.	Université de Boumerdes	Invité

A mon papa et à ma maman

A mon époux Yanis

A ma fille Maryam Dalia

A mes frères : Lotfi, Hamza et Abd-erraouf

A mes sœurs : Youmna et Lamia

A la mémoire de mon beau-père

A ma belle famille

A tous ceux qui me sont chers...

REMERCIEMENTS

*En premier lieu et avant tout je tiens à remercier **ALLAH** le tout-puissant de m'avoir donné la volonté, le courage, la patience et la force pour accomplir ce travail.*

*Je tiens, tout d'abord, à adresser mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse **Dr Aissat AEK** d'avoir accepté de diriger ce travail. Je suis très reconnaissante pour son soutien, ces encouragements et de m'avoir facilité ce parcours si important de ma vie.*

*Saurai-je trouver les mots pour manifester toute ma gratitude à **Dr Ait Kaci K.** qui a été toujours présente durant mon travail, et **Dr Benabdelkader T.**, Ça a été un honneur d'être codirigé par vous deux. Votre gentillesse, votre rigueur scientifique, votre générosité, votre support durant mon parcours, votre motivation et vos conseils ont toujours été très constructifs et m'ont permis de bien avancer dans ma thèse.*

*Je souhaite par ailleurs adresser mes remerciements au **Prof El Hadi D.** pour avoir accepté de présider ce jury*

*De même, j'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail : que le **Prof Bendifellah L.**, le **Dr Boukhatem M.N.** et le **Dr Acheuk F.** trouvent mes sincères remerciements pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Mes sincères et profonds remerciements pour le **Prof El Hachemi M.**, le Doyen de la faculté des Sciences de l'Ingénieur de l'Université de Boumerdes, de m'avoir permis de mener une grande partie de ma thèse au sein de son honorable laboratoire de chimie organique. Je vous remercie aussi pour votre accueil chaleureux, votre gentillesse et votre aide précieuse.*

*Mais aussi, un très grand merci au **Prof Sabaou N.**, le Directeur du laboratoire de recherche de Biologie des Systèmes Microbiens de l'ENS d'Alger, de m'avoir permis de mener la partie microbiologique de la thèse dans son honorable laboratoire. Je tiens dans ce contexte de cette partie à remercier également le **Prof Lamari L.**, et l'**Ing. Boumeridja S.** pour l'aide qu'elles m'ont apportée. Je leur exprime toute ma reconnaissance pour leur accompagnement et leur suivi, elles ont fait en sorte que je me sente toujours comme faisant partie de leur équipe. Merci pour l'exclusivité du temps et pour tout support qu'elles m'ont accordées*

*J'adresse mes vifs remerciements au **Prof Allal Benfekih L.** la Responsable du laboratoire de Biotechnologie des Plantes Aromatiques et Médicinale (BPAM) et **Prof Chaouia C.** la Responsable de post-graduation de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Blida, ainsi que **Mme Hassiba** la secrétaire de post-graduation de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Blida, merci pour votre gentillesse, vos conseils, votre soutien et votre accueil si chaleureux à chaque fois que je m'adresse à vous, je vous serai toujours reconnaissante.*

Mes plus sincères remerciements s'adressent à **Dr. Bensuici F.** pour l'utilisation de son matériel de laboratoire et **Mme Suici F.** de l'entreprise Alphyte pour l'analyse GC/MS. Votre aide m'était très précieuse et m'a permis de bien avancer.

Je tiens à remercier très chaleureusement **Mr. Taboukouyout M.** ainsi que **les membres de service de conservation des forêts de la wilaya de Boumerdes** pour leurs aide durant la récolte de l'espèce étudiée, je leurs exprime toute ma reconnaissance.

Je remercie infiniment **Mr. Khadraoui A.** et **l'Ing. Haddadi H.** du laboratoire de génie des procédés de l'université de Boumerdes pour leur aide, leur gentillesse, leur soutien et leur générosité.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au **Prof Chemat F.** de l'Université d'Avignon pour son aide de grande importance, sans oublier **Prof Benyoussef E.H** de l'école Nationale Polytechnique d'Alger, **Prof Hazzit M.** de l'université de Bab Ezzouar et **Prof Houmani Z.** de l'Université de Blida. Un grand merci à vous.

De même, je tiens à remercier **Mr. Bourahla A.**, et **Dr. Ghenai R.** de l'université de Blida pour leur agréable soutien.

Mes plus profonds remerciements s'adressent à mon amie **Dr. Benmahdjoub M.** de l'université de Tlemcen pour son aide, son soutien et ces encouragements.

Un merci du fond du cœur à mon **père**, à ma **mère** et à **mes frères et sœurs** pour votre aide à la récolte et au séchage de la plante étudiée, a votre touchante inquiétude quant à l'avancée de mes travaux. Je vous remercie pour votre amour inconditionnel, votre soutien et votre stimulante fierté. Les mots sont faibles pour exprimer la force de mes sentiments, la reconnaissance et l'amour que je vous porte.

Enfin, mes pensées vont à mon mari **Benmesbah Yanis** pour avoir vécu au rythme de la thèse, pour m'avoir aidé à surmonter tous les obstacles et les moments difficiles. Merci pour l'amour inconditionnel, l'encouragement continu, la patience qui m'ont soutenu tout au long de mon chemin, sans oublier ma petite fille chérie **Maryam Dalia** qui est venue au monde durant ce travail et qui a grandi aux aléas d'une maman souvent préoccupée. Je vous aime tant.

En terminant, je souhaite démontrer ma plus sincère gratitude à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet, Merci à tous !

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chimie organique de la Faculté des Sciences de l'Ingénieur de l'Université de Boumerdes. Une partie des travaux a été effectuée au Laboratoire du Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de deux publications dans des revues internationales avec comités de lecture, et ont été également valorisés par une communication orale internationale, et cinq communications par affiche : trois internationales et deux nationales.

Publications scientifiques :

- Chekoual, L., Aissat, A., Ait-Kaci Aourahoune, K. et Benabdelkader, T. (2018a). The Effect of ultrasound pre-treatment on the yield, chemical composition and antioxidant activity of essential oil from wild *Lavandula stoechas* L. *Journal of Essential Oils and Bearing Plants*. 21(1), 253-263 (Annexe).
- Chekoual, L., Aissat, A., Ait-Kaci Aourahoune, K. et Benabdelkader, T. (2018b). Comparative study of yield, chemical composition and antioxidant activity of wild Algerian *Lavandula stoechas* L. obtained by ultrasound pre-treatment and by conventional hydrodistillation. *Phytothérapie*. DOI 10.3166/phyto-2018-0105 (Annexe).

Communication Orale :

- Chekoual, L., Aissat, A. et Ait-Kaci Aourahoune, K. « Effet de prétraitement par les ultrasons sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. ». International Seminar on the Valuation of Aromatic and Medicinal Plants of the Mediterranean. Algeria, Blida, 11-12 November 2015.

Communications par Affiche :

- Chekoual, L., Aissat, A. et Ait-Kaci Aourahoune, K. « Etude du pouvoir antifongique et antioxydant des huiles essentielles de quelques espèces de *Lavandula* du Nord de l'Algérie ». International Seminar on the Valuation of Aromatic and Medicinal Plants of the Mediterranean. Algeria, Blida, 11-12 November 2015.
- Chekoual, L., Aissat, A., Ait-Kaci Aourahoune, K. et Lamari, L. « Effect of ultrasound pretreatment on the yield, chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from wild *Lavandula stoechas* L. ». 4th International Congress of Plants Biodiversity. Marrakech, 5-8 October 2017.
- Chekoual, L., Aissat, A., Benabdelkader, T. et Ait-Kaci Aourahoune, K. « Comparative study of yield and chemical composition of *Lavandula stoechas* L. essential oils harvested from four regions of Algeria ». International workshop sur les Phytoressources Aquatiques et Terrestres. Tunisie, 9-10 Avril 2018.
- Chekoual, L., Aissat, A. et Ait-Kaci Aourahoune, K. « Effet de prétraitement par les ultrasons sur le rendement et l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. ». 1^{er} Séminaire National : Phytothérapie et Santé. Blida, 17-18 Mai 2017.
- Chekoual, L. et Aissat, A. « Etude comparative des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. obtenues par deux méthodes d'extraction ». Journée sur les substances naturelles pour un développement durable. Blida, 18 Avril 2017.

Une publication est également en cours de préparation :

Chekoual, L., Aissat, A., Benabdelkader, T., Ait-Kaci Aourahoune, K., Lamari, L. and Boumeridja S. « Effect of ultrasound pretreatment on the yield, chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from four wild populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: Comparison with conventional hydrodistillation ».

Résumé

Dans le but de l'amélioration des techniques d'obtention des huiles essentielles (HEs) des plantes aromatiques et médicinales, ce travail présente les résultats d'une étude de l'influence du prétraitement de *Lavandula stoechas* par les ultrasons (intervalles de temps de 10, 20, 30, 45 et 60 min) sur le processus d'extraction des (HEs), par comparaison avec une hydrodistillation conventionnelle (HD). Les tests ont été réalisés sur les parties aériennes fleuries de *Lavandula stoechas* L. sauvage récoltée sur 04 sites différents dans le nord de l'Algérie. Une évaluation de la qualité organoleptique, physico-chimique et de la composition chimique ainsi qu'une étude *in vitro* des activités biologiques des extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction ont été réalisées. Un temps de prétraitement par les ultrasons de 10 min suivi de 90 min d'hydrodistillation (US-HD) donne des rendements de 1.60% et de 1.59% des huiles essentielles de la région de Kodiat (HET) et de la région d'Adekar (HEA), respectivement. Ce temps de prétraitement s'est avéré le meilleur en comparant avec les autres temps de prétraitement. Cependant, les meilleurs rendements globaux 1.03% et 0.87% des huiles essentielles de la région d'El-kahla (HEE) et de celle de Keddara (HEK) ont été obtenu après 60 min et 45 min de prétraitement, respectivement. Ces rendements sont plus élevés par rapport à ceux (0.64, 1.17, 0.50 et 0.62%) obtenus après 180 min d'hydrodistillation (HD) pour les quatre échantillons de *L. stoechas*, respectivement. Une variabilité remarquable de la qualité organoleptique des extraits obtenus avec US-HD aux différents temps de traitement et avec HD a été observée. En général, les HEs obtenues par US-HD sont dotées d'une couleur plus foncée et d'une odeur plus intense par rapport aux HEs obtenues par HD avec des caractéristiques physico-chimiques semblables. Les HEs ont été analysées par GC/FID et GC/MS ou un total de 21 et 55 composés ont été identifiés, respectivement. 94,35, 88.26, 90.69 et 89.36% sont les teneurs totaux des HEA, HEK, HET et HEE obtenues par US-HD contre celles (92.64, 88.75, 89,26 et 76%) obtenues par HD, respectivement. Une différence qualitative et quantitative dans la composition chimique des huiles essentielles des échantillons traités et non traités a été trouvée. Le pourcentage de la plupart des composés majoritaires (fenchone, camphor, 1,8-cineole, bornyl-acetate, myrtenyl-acetate et viridiflorol) ainsi que d'autres composés minoritaires identifiés est plus important dans les échantillons traités. L'analyse par GC/FID des HET obtenues par HD et US-HD a montré que l'abondance de fenchone et de camphor comme composés majoritaires, a atteint sa valeur maximale par US-HD avec des durés de prétraitement de 60 et 20 min, respectivement.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode de piégeage du radical DPPH a montré que le prétraitement par ultrasons est efficace pour améliorer le pouvoir antioxydant des extraits de *L.stoechas*. Nos huit extraits obtenus par US-HD et HD ont présenté de bonnes activités antimicrobiennes envers la plupart des 08 souches pathogènes testées de bactéries, de champignons filamenteux et de levures. Ce pouvoir antimicrobien demeure plus intéressant dans la case de l'US-HD que dans celle de l'HD, avec des valeurs de concentration minimales inhibitrice (CMI) cumulées allant de 43.31 à 87.74 mg/ml et de 75.5 à 144 mg/ml, respectivement.

Mots clés : Prétraitement aux ultrasons, Hydrodistillation, *Lavandula stoechas* L., huiles essentielles, rendement, GC/MS, GC/FID, DPPH, CMI.

Abstract

In order to improve the techniques for obtaining essential oils (EOs) from aromatic and medicinal plants, this work presents the results of study of the influence of ultrasound pretreatment of *Lavandula stoechas* (time intervals of 10, 20, 30, 45 and 60 min) on the extraction process of EOs, compared with conventional hydrodistillation (HD). The tests were carried out on the flowering aerial parts of wild *Lavandula stoechas* L. harvested from 04 different sites in the north of Algeria. An evaluation of the organoleptic, physicochemical and chemical composition as well as an *in vitro* study of the biological activities of the extracts obtained by the two extraction methods were carried out. A sonication pretreatment time of 10 min followed by 90 min of hydrodistillation (US-HD) gives yields of 1.60% and 1.59% of the essential oils of Kodiak region (EOT) and of Adekar region (EOA), respectively. This pretreatment time proved to be the best when compared with other pretreatment times. However, the best overall yields of 1.03% and 0.87% of El-kahla region (EOE) and Keddara region (EOK) essential oils were obtained after 60 min and 45 min of pretreatment, respectively. These yields are higher compared to those (0.64, 1.17, 0.50 and 0.62%) obtained after 180 min of hydrodistillation (HD) for the four samples of *L. stoechas*, respectively. A remarkable variability of the organoleptic quality of extracts obtained by US-HD at different treatment times and with HD was observed. In general, the EOs obtained by US-HD has a darker color and a more intense odor compared to the EOs obtained by HD with similar physicochemical characteristics. The EOs was analyzed by GC / FID and GC / MS when a total of 21 and 55 compounds were identified, respectively. 94.35, 88.26, 90.69 and 89.36% are the total contents of HEA, HEK, HET and HEE obtained by US-HD versus those (92.64, 88.75, 89.26 and 76%) obtained by HD, respectively. A qualitative and quantitative difference in the chemical composition of the essential oils of the treated and untreated samples was found. The percentage of most major compounds (fenchone, camphor, 1,8-cineole, bornyl-acetate, myrtenyl-acetate and viridiflorol) and other identified minority compounds is greater in the treated samples. GC / FID analysis of EOT obtained by HD and US-HD showed that the abundance of fenchone and camphor as major components reached its maximum value by US-HD, with pretreatment times of 60 and 20 min, respectively.

The study of antioxidant activity by the DPPH radical scavenging method has shown that ultrasonic pretreatment is effective in improving the antioxidant power of *L.stoechas* extracts. Our eight US-HD and HD extracts showed good antimicrobial activity against most of the 08 pathogenic strains tested for bacteria, filamentous fungi, and yeasts. This antimicrobial potential remains more interesting in the US-HD case than in the HD case, with cumulative minimum inhibitory concentration (MIC) values ranging from 43.31 to 87.74 mg / ml and from 75.5 to 144 mg / ml, respectively.

Key words: Ultrasound pretreatment, Hydrodistillation, *Lavandula stoechas* L., Essential oils, yield, GC / MS, GC / FID, DPPH, MIC.

ملخص

يهدف تحسين تقنيات الحصول على الزيوت الأساسية العطرية من النباتات العطرية والطبية ، يقدم هذا العمل نتائج دراسة تأثير المعالجة المسبقة لنبات *Lavandula stoechas* عن طريق الموجات فوق الصوتية (فترات زمنية من 10 ، 20 ، 30 ، 45 و 60 دقيقة) على عملية استخراج الزيوت العطرية، مقارنة مع تقنية التقطير المائية التقليدية (HD). أجريت الاختبارات على الأجزاء الهوائية المزهرة لنبات *Lavandula stoechas* البرية المحصودة من 4 مواقع مختلفة في شمال الجزائر. تم إجراء تقييم للجودة العضوية-الحسية والفيزيوكيميائية وكذلك دراسة في المختبر للأنشطة البيولوجية للمستخلصات التي تم الحصول عليها بواسطة الطريقتين المدروستين. إن زمن المعالجة بالموجات فوق الصوتية (US-HD) لمدة 10 د متبوعاً بـ 90 د من (HD) يعطي عائداً قدره 1.60٪ و 1.59٪ من الزيوت الأساسية العطرية لعينة (HET) Kodiak و عينة (HEA) Adekar ، على التوالي. أثبتت مدة هذه المعالجة أنها الأفضل عند مقارنتها بأوقات المعالجة الأخرى. أيضاً، فقد تم الحصول على أفضل عائد إجمالي من 1.03 ٪ و 0.87 ٪ من الزيوت الأساسية العطرية لعينة (HEE) El-kahla و لعينة (HEK) Keddara بعد 60 د و 45 د من المعالجة ، على التوالي. هذا المردود أعلى مقارنة بذاك (0.64 ، 1.17 ، 0.50 و 0.62٪) الذي تم الحصول عليه بعد 180 د من (HD) للعينات الأربعة من *L. stoechas* ، على التوالي. لوحظ وجود تنوع في جودة المستخلصات التي تم الحصول عليها باستخدام تقنية US-HD في أوقات المعالجة المدروسة و باستخدام HD. بشكل عام ، تتميز المستخلصات المستمدة بتقنية US-HD باللون الغامق والرائحة القوية مقارنةً بالزيوت الأساسية المستمدة بتقنية HD مع خصائص فيزيوكيميائية مماثلة. تم تحليل الزيوت الأساسية بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية والكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكتلة، أين تم تحديد 21 و 55 مركب ، على التوالي. 94.35 ، 88.26 ، 90.69 و 89.36٪ هي إجمالي محتويات HEA ، HEK ، HET و HEE التي تم الحصول عليها من خلال US-HD مقارنة بتلك (92.64 ، 88.75 ، 89.26 و 76٪) التي تم الحصول عليها من خلال HD ، على التوالي. تم العثور على اختلاف نوعي وكمي في التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية للعينات المعالجة وغير المعالجة. تكون النسبة المئوية لمعظم المركبات الرئيسية (الفنشون ، الكافور ، 1.8 سينبول ، بورنيل-أسيتات ، الميرتنيل-أسيتات و الفيريديفلورول) وغيرها من المركبات المحددة أكبر في العينات المعالجة. أظهر تحليل الكروماتوغرافيا الغازية للزيوت الأساسية لعينة HET التي تم الحصول عليها من خلال HD و US-HD في جميع الأوقات المدروسة ، أن وفرة الفنشون و الكافور كمكونات رئيسية وصلت إلى أقصى قيمة لها من خلال US-HD لمدة 60 و 20 د. على التوالي. وقد أظهرت دراسة النشاط المضاد للأوكسدة التي تم تقييمها بطريقة DPPH أن المعالجة بالموجات فوق الصوتية فعالة في تحسين قوة مضادات الأوكسدة لمستخلصات *L. stoechas*. كما أظهرت مستخلصاتنا الثمانية المحصل عليها بال US-HD و HD فعالية عالية ضد معظم السلالات البكتيرية الممرضة الـ 8 المختبرة من بكتيريا وفطريات خيطية وخمائر. وتظل هذه الفعالية المضادة للميكروبات أكثر إثارة للاهتمام في خلية US-HD مقارنة بخلية HD ، مع قيم أدنى تركيز مثبطت تراكمي تتراوح بين 43.31 و 87.74 مغ / مل ومن 75.5 إلى 144 مغ / مل. على التوالي.

الكلمات المفتاحية: المعالجة بالموجات فوق الصوتية ، التقطير المائي ، *Lavandula stoechas* ، الزيوت الأساسية ، المردود ، الكروماتوغرافيا الغازية/مطيافية الكتلة ، الكروماتوغرافيا الغازية ، DPPH ، أدنى تركيز مثبطت.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Taxonomie du genre <i>Lavandula</i> (d'après Upson et Andrews 2004)	21
2	Propriétés critiques de différents solvants utilisables dans l'extraction par fluide supercritique	49
3	Comparaison entre SC-CO ₂ et CSWE pour l'extraction des huiles essentielles des plantes	52
4	Sites de collectes et principales caractéristiques écologiques et géographiques des quatre populations de <i>L. stoechas</i> L.	69
5	Souches microbiennes testées.	70
6	Couleur, odeur et aspect à température ambiante des huiles essentielles des 04 populations de <i>L.stoechas</i> obtenues par hydrodistillation et par prétraitement aux ultrasons.	81
7	Densité relative et indice de réfraction des huiles essentielles des 04 populations de <i>L.stoechas</i> obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) à différents temps.	82
8	Rendement en huiles essentielles des 04 populations de <i>L.stoechas</i> obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) à différents temps.	84
9	Analyse par GC/MS des huiles essentielles des parties aériennes fleuries de 04 populations algériennes sauvages de <i>L.stoechas</i> obtenues par hydrodistillation et par prétraitement aux ultrasons au meilleur temps	86
10	Analyse par GC/FID des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) à différents temps des parties aériennes fleuries de <i>L.stoechas</i> de la population sauvage de Kodiat.	90
11	IC ₅₀ des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) des parties aériennes fleuries des 04 populations sauvages de <i>L.stoechas</i> .	100
12	Activité antimicrobienne (CMI) des huiles essentielles des 04 populations algériennes de <i>L. stoechas</i> obtenues par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD).	103

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	<i>Lavandula stoechas</i> , tige fleurie x 1 (d'après Upson & Andrews, 2004)	22
2	Distribution géographique de <i>L. stoechas</i> (d'après Upson & Andrews, 2004)	23
3	Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation d'huile essentielle (Mesplède, 2004).	31
4	Entraînement à la vapeur d'eau et hydrodiffusion (Lucchesie, 2005).	32
5	Extraction par expression à froid (Mnayer, 2014)	33
6	Le spectre électromagnétique (Lucchesie, 2005).	35
7	Transferts thermiques sous chauffage conventionnel et micro-ondes (Chemmat et al., 2009)	36
8	Frissonnement des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes (Lucchesie, 2005).	37
9	Schéma d'une installation pilote d'extraction par solvant assistée par micro-ondes	39
10	Schéma d'une installation VMHD (Anizon et al., 2003).	40
11	Représentation schématique de l'appareil utilisé dans l'extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes (Golmakani et al., 2008).	42
12	Schéma du montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-onde (Lucchesie et al., 2004).	43
13	Représentation schématique de l'appareil utilisé dans l'extraction par hydrodiffusion et gravité assistée par micro-ondes (Abert Vian et al., 2008).	45
14	Entraînement à la vapeur assisté sous micro-ondes (Boutemak, 2011).	47
15	Représentation schématique d'un extracteur par fluide supercritique (Wang et al., 2006).	50
16	Diagramme schématique d'un extracteur à eau subcritique : HPP, pompe haute pression ; PH, pré-chauffage ; CS, système de refroidissement ; EC, cellule d'extraction ; TC, contrôle de température ; DV et OAV, valves (Fernández-Pérez et al., 2000).	53
17	Extraction par Détente Instantanée Contrôlée (Mnayer, 2014)	54
18	Extraction par Ultrasons	55
19	L'effondrement de la bulle de cavitation et la libération du matériau végétal: exemple d'extraction de l'huile essentielle du basilic. (a) bulle de cavitation ; (b) effondrement de la bulle ; (c) destruction de la paroi cellulaire ; (d) libération de la matrice végétale et son contenu dans le milieu (Chemmat et al., 2011).	56
20	Création de bulles de cavitation stables et création et effondrement de bulles de cavitation transitoires et stables. (a) Graphique de déplacement (x); (b) cavitation transitoire; (c) cavitation stable; (d) graphique de pression (P). (Santos et al., 2009).	57

21	Systèmes à ultrasons couramment utilisés (A: bain à ultrasons, B: réacteur à ultrasons sous agitation, C: sonde à ultrasons, D: sonication continue avec sonde à ultrasons) (Chemat et al., 2017a).	58
22	(a) Soxhlet conventionnel, (b) Sono-Soxhlet (Chemat et al., 2017a).	60
23	(a) Clevenger classique, (b) Sono-Clevenger (Chemat et al., 2017a).	61
24	Combinaison des micro-ondes et des ultrasons (Chemat et al., 2017a).	62
25	Combinaison du procédé DIC et des ultrasons (Chemat et al., 2017a).	63
26	Combinaison d'extraction par ultrasons et par fluide supercritique (Chemat et al., 2017a).	64
27	Combinaison d'extraction par ultrasons et par extrusion (Chemat et al., 2017a).	65
28	Origine géographique des 04 populations Algériennes de <i>L. stoechas</i> utilisées.	69
29	Prétraitement de <i>L. stoechas</i> dans un bain à ultrasons.	72
30	Les différentes colorations des huiles essentielles de <i>L. stoechas</i> des 04 populations Algériennes obtenues par Hydrodistillation et par prétraitement aux ultrasons à différents temps.	80
31	Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) des HEs de 04 populations Algériennes de <i>L. stoechas</i>	85
32	Structures chimique des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>L. stoechas</i>	88
33	Teneur en composés majoritaires des huiles essentielles de <i>L. stoechas</i> des quatre populations algériennes sauvages obtenus par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) donnant le meilleur rendement (analyse par GC/MS).	89
34	Teneur en composés majoritaires des huiles essentielles de <i>L. stoechas</i> de la population algérienne sauvage de Kodiat obtenus par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) à différents temps (analyse par GC/FID).	91
35	Activité antioxydante : (A) des huiles essentielles des 04 populations sauvage de <i>L. stoechas</i> obtenues par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) et (B) de l'acide ascorbique (standard contrôle).	101
36	CMI cumulées de chaque HE des 04 populations sauvages de <i>L. stoechas</i> obtenues par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) envers les 08 souches cibles.	104
37	CMI cumulées des HEs de <i>L. stoechas</i> des 04 populations obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) sur chaque souche de microorganisme cible	105

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
BHA	Butylhydroxyanisole .
BHT	Butylhydroxytoluène
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
CSWE	Continuous Subcritical Water Extraction (Extraction par l'eau Subcritique Continue).
DIC	Extraction par Détente Instantanée Contrôlée.
DPPH	2 ,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
ENA	Ecole National d'Agronomie.
ENS	Ecole Normale Supérieure.
EV	Entraînement à la vapeur.
FID	Détecteur à ionisation de flamme.
GC	Chromatographie en phase gazeuse.
GC/IRFT	Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'infrarouge.
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
HD	Hydrodistillation.
HE	Huile essentielle (HEs : les huiles essentielles).
I	Indice de réfraction.
IR	Indices de rétention.
LBSM	Laboratoire du Biologie des Systèmes Microbiens.
MAD	Microwave Assisted Distillation (Distillation assistée par Micro-ondes)
MAE	Microwave Assisted Extraction (Extraction assistée par Micro-ondes).

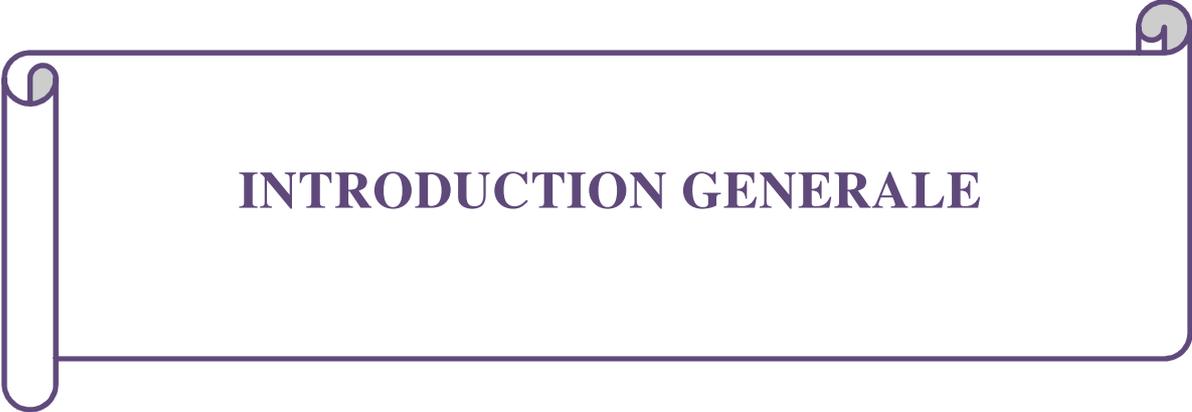
MAPTM	Microwave Assisted Process (Procédé Assisté par Micro-ondes).
MASE	Microwave-Assisted Solvent Extraction (Extraction par Solvent Assistée par Micro-ondes).
MDGC	Chromatographie gazeuse multidimensionnelle.
MHG	Microwave hydrodiffusion and gravity (Extraction par Hydrodiffusion Assistée par Micro-ondes et Gravité).
MSD	Microwave steam distillation (Distillation à la vapeur Assistée par Micro-ondes).
MWHD	Microwave hydrodistillation (Hydrodistillation Assistée par Micro-ondes).
PG	Gallate de propyle.
R	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire.
SC-CO2 extraction	extraction par CO2 supercritique.
SD	Standard Déviation (Erreur Standard).
SFE	Supercritical Fluid Extraction (Extraction par Fluide Supercritique).
SFME	Solvent Free Microwave Extraction (Extraction sans Solvent Assistée par Micro-ondes).
Sono-Clevenger	Extraction par distillation assistée aux ultrasons.
Sono-soxhlet	extraction par soxhlet assistée aux ultrasons.
SWE	Subcritical Water Extraction (Extraction par l'eau Subcritique).
TBHQ	tert-butylhydroquinone.
TR	Temps de rétention.
UAE	Ultrasound Assisted Extraction (Extraction assistée par Ultrasons).
UMAE	Ultrasound Microwave Assisted Extraction (Extraction par Ultrasons Assistée aux Micro-ondes).
US	Ultrasons
US-HD	Prétraitement par ultrasons avant hydrodistillation.
VMHD	VacuumMicrowave Hydrodistillation (Hydrodistillation par Micro-ondes sous vide pulsé).

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT.....	2
AVANT PROPOS.....	3
RESUME.....	5
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
TABLE DES MATIERES.....	13
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE	19
I.1. PRESENTATION DE LA PLANTE <i>Lavandula stoechas</i> L.	20
I.1.1. Classification de la plante	20
I.1.2. Description botanique	22
I.1.3. Répartition géographique	23
I.1.4. Usage	23
I.1.4.1. Usage médicinal	23
I.1.4.2. Autres usages	24
I.2. LES HUILES ESSENTIELLES	25
I.2.1. Définition et localisation	26
I.2.2. Les principales familles des plantes aromatiques	26
I.2.3. Composition chimique d'une huile essentielle	27
I.2.3.1. Les terpènes	28
I.2.3.2. Les composés aromatiques	29
I.2.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	30
I.2.4.1. Méthodes conventionnelles.....	30
I.2.4.1.1. L'hydrodistillation simple	30
I.2.4.1.2. L'entraînement à la vapeur d'eau	31
I.2.4.1.3. L'hydrodiffusion.....	32
I.2.4.1.4. L'expression à froid	32
I.2.4.1.5. Distillation « sèche »	33
I.2.4.1.6. Huiles essentielles produites par pyrogénéation du bois	33
I.2.4.1.7. Extraction par enfleurage.....	34

I.2.4.1.8. Extraction par solvant organique volatile	34
I.2.4.2. Méthodes innovantes.....	34
I.2.4.2.1. L'extraction assistée par micro-ondes.....	35
I.2.4.2.1.1.Extraction par solvant assistée par micro-ondes (Microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)	38
I.2.4.2.1.2. Hydrodistillation par micro-ondes sous vide pulsé (Vacuum Microwave Hydrodistillation, VMHD)	40
I.2.4.2.1.3. Hydrodistillation assistée par micro-ondes (Microwave hydrodistillation, MWHD).....	41
I.2.4.2.1.4. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction, SFME)	43
I.2.4.2.1.5. Extraction par hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (Microwave Hydrodiffusion and Gravity, MHG).....	45
I.2.4.2.1.6. Entraînement à la vapeur assisté sous micro-ondes (Microwave steam distillation MSD)	47
I.2.4.2.2. Extraction par fluide supercritique (Supercritical Fluid Extraction	48
SFE) / (extraction par CO2 supercritique)	48
I.2.4.2.3. Extraction par l'eau subcritique (Subcritical Water Extraction (SWE), ou Continuous Subcritical Water Extraction(CSWE)	51
I.2.4.2.4. Extraction par Détente Instantanée Contrôlée (DIC)	53
I.2.4.2.5. Le procédé Flash détente	54
I.2.4.2.6. L'extraction par ultrasons ou sonication (Ultrasound-assisted Extraction UAE) ...	55
I.2.4.2.6.1. Combinaison des ultrasons avec les techniques conventionnelles	59
I.2.4.2.6.2. Combinaison des ultrasons avec des techniques innovantes	61
I.2.5. Méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	65
I.3. LES OBJECTIFS DE LA THESE.....	66
CHAPITRE II :	68
MATERIEL ET METHODES	68
II.1. MATERIEL VEGETAL	69
II.2. SOUCHES MICROBIENNES	70
II.3. EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES.....	70
II.3.1. Extraction par Hydrodistillation (HD)	70
II.3.2. Calcul du rendement en huile essentiel	71
II.3.3. Extraction par prétraitement aux ultrasons (US-HD)	71
II.3.4. Caractérisation organoleptique.....	72
II.3.5. Détermination de la densité relative et de l'indice de réfraction	72

II.3.6. Analyse par GC/MS des huiles essentielles	73
II.3.7. Identification des composés volatiles	73
II.3.8. Analyse par GC/FID des huiles essentielles	74
II.4. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES	74
II.5. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES HUILES ESSENTIELLES	75
II.6. ANALYSE STATISTIQUE	76
CHAPITRE III :	77
RESULTATS ET DISCUSSION	77
III.1. EXTRACTION DES HES DES 04 POPULATIONS DE <i>L.stoechas</i> OBTENUES PAR HD ET PAR US-HD	78
III.1.1. Introduction	78
III.1.2. Résultats	80
III.1.2.1. Caractéristiques organoleptiques	80
III.1.2.2. Caractéristiques physico-chimiques	82
III.1.2.3. Rendement en huiles essentielles de <i>L.stoechas</i>	83
III.1.2.4. Composition chimique des huiles essentielles de <i>L. stoechas</i>	85
III.1.3. Discussion	92
III.2. ACTIVITES BIOLOGIQUES <i>in vitro</i> DES HES DES 04 POPULATIONS SAUVAGES DE <i>L. stoechas</i> OBTENUES PAR HD ET PAR US-HD :	98
III.2.1. Introduction	98
III.2.2. Résultats	100
III.2.2.1. Activité antioxydante des huiles essentielles	100
III.2.2.1. Activité antimicrobienne des huiles essentielles	102
III.2.3. Discussion	105
CONCLUSION	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114
ANNEXES	136



INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Avec une industrie croissante des arômes et des parfums et avec une augmentation accrue de la demande de produits plus naturels destinés aux productions alimentaire et pharmaceutique, l'application des nouvelles méthodes d'extractions est devenue plus intense. De même, la réflexion s'est développée auprès des industriels visant à utiliser des techniques d'extractions vertes qui adoptent dans leurs principes toutes les précautions nécessaires pour la protection de l'homme et de l'environnement.

L'Algérie, de par sa situation géographique, constitue un cadre naturel tout à fait original offrant une gamme complète de bioclimats méditerranéens et sahariens favorisant une flore riche et variée. Parmi les plantes aromatiques et médicinales qui poussent spontanément en Algérie, notre intérêt s'est porté sur la lavande : *Lavandula stoechas* L., provenant de quatre régions du nord de l'Algérie. Il s'agit d'une plante vivace et répertoriée dans diverses régions du monde pour sa large utilisation en médecine traditionnelle. *L. stoechas* est l'espèce de lavande qui possède la plus grande aire de répartition puisqu'elle couvre presque tout le pourtour méditerranéen sauf un petit arc à l'est allant du Liban à la Lybie. Son centre de biodiversité, et probablement d'origine, est le sud de la péninsule ibérique (Upson & Andrews, 2004). Cette espèce de lavande est très courante dans la partie nord de l'Algérie où elle se rencontre à des altitudes assez variables. Elle est utilisée dans de nombreuses régions d'Algérie pour ses huiles essentielles ou sous forme d'herbe séchée pour des préparations alimentaires comme celle du couscous. Elle n'est pas cultivée mais prélevée dans le compartiment sauvage. Dans le cas des Lamiacées, plusieurs recherches ont été effectuées, leurs huiles essentielles ont fait l'objet de plusieurs études à travers le monde (Carrasco et al. 2015 ; Bajalan et al. 2016 ; Bachiri et al. 2017)

Une des grandes réussites des techniques d'extraction innovantes a été l'évolution des systèmes d'extraction par ultrasons. La combinaison des ultrasons avec le Clevenger ou l'hydrodistillation a attiré un intérêt croissant au cours des dernières années. Les études de la qualité des huiles essentielles et des métabolites bioactives obtenus avec cette technique ont été très prometteuses (Assami et al. 2012 ; Khosravi et al. 2013 ; Tavakolpour et al. 2016).

De nombreuses études d'utilisation des ultrasons pour l'extraction des huiles essentielles du genre *Lavandula* ont été menées (Giray et al. 2008 ; Périno-Issartier et al. 2013). Cependant, l'application des ultrasons comme prétraitement n'a jamais été investiguée. C'est dans ce contexte que l'objectif de notre recherche s'est orienté vers l'utilisation des ultrasons comme prétraitement avant l'hydrodistillation pour l'extraction des huiles essentielles de *L. stoechas*, dans le but d'évaluer l'effet de cette technique sur le rendement, la qualité organoleptique et physico-chimique, la composition chimique et les activités biologiques de nos extraits, et ce, par comparaison avec la méthode conventionnelle d'hydrodistillation afin d'améliorer l'efficacité et la reproductibilité d'extraction, la facilité de la procédure, avec des considérations de coût, de temps, de sécurité et de degré d'automatisation.

Cette thèse s'articule autour de quatre chapitres :

Le premier chapitre consiste en une étude bibliographique dans laquelle nous avons présenté la plante étudiée, des généralités sur les huiles essentielles, leurs méthodes d'analyse ainsi que leurs différents modes d'extraction (conventionnelle et innovante). Puis, nous avons présenté les principaux objectifs de ce travail. Le deuxième chapitre s'intéresse aux méthodologies utilisées pour l'extraction des huiles essentielles par une méthode conventionnelle d'hydrodistillation, et par la technique innovante de prétraitement par les ultrasons à différents temps, d'une part, et pour la valorisation des huiles essentielles (rendement, caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques, compositions chimiques et activités antioxydantes et antimicrobiennes), d'autre part. Le troisième chapitre, subdivisé en 2 sections, présente les résultats obtenus sur nos objectifs de recherche. Finalement, le dernier chapitre reprendra les conclusions et discutera des perspectives de ce travail.

Ce projet de recherche s'inscrit dans une participation scientifique à l'amélioration des techniques d'extraction vertes des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* ainsi que d'autres huiles essentielles similaires. Il a donné lieu à 4 présentations dans des congrès internationaux et 2 présentations dans des congrès nationaux, écrites sous forme de posters, ainsi qu'à la soumission de 2 manuscrits dans des journaux internationaux à comité de lecture.



CHAPITRE I : REVUE DE LITTERATURE

I.1. PRESENTATION DE LA PLANTE *Lavandula stoechas* L.

I.1.1. Classification de la plante

Lavandula stoechas L. est une espèce du genre *Lavandula*, appartenant à la famille des *Lamiaceae*. Cette famille qui regroupe 7200 espèces réparties dans 236 genres se caractérise généralement par des plantes à la tige quadrangulaire, aux feuilles opposées et décussées et au calice persistant, à maturité, un tétrakène. La famille des *Lamiaceae* est subdivisée en 7 sous-familles. Le genre *Lavandula* appartient à la sous-famille des *Nepetoideae* du fait du caractère hexaperturé des grains de pollen. La sous-famille des *Nepetoideae* est divisée en 3 tribus dont celle des *Ocimeae* dans laquelle sont placées les lavandes. Le genre *Lavandula* a été rattaché à cette tribu sur la base d'une étude phylogénétique conduite à partir de l'étude du polymorphisme de séquences d'ADN chloroplastique (Paton *et al.*, 2004). L'histoire taxonomique du genre *Lavandula* a été particulièrement bien décrite dans « The genus *Lavandula* » (Upson et Andrews, 2004). Brièvement, dès la renaissance déjà 5 espèces de lavande étaient reconnues. Le nombre d'espèces décrites n'a cessé d'augmenter au fil des explorations botaniques dans le Maghreb et l'Asie. Ces études ont conduit à reconnaître actuellement 39 espèces différentes réparties en trois sous-genres *Fabricia*, *Sabaudia* et *Lavandula* et huit sections (Tableau 1).

❖ Position systématique de *L. stoechas* L.

D'après Quezel et Santa (1963), la systématique de *Lavandula stoechas* est la suivante :

- Embranchement : Phanérogames ou Spermaphytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Eudicots
- Sous-classe : Astéridées
- Ordre : Lamiales
- Famille : **Lamiacées**
- Genre : **Lavandula**
- Espèce : **Lavandula stoechas** (L.)

Tableau 1 : Taxonomie du genre *Lavandula* (d'après Upson et Andrews 2004)

Genre	Sous-genre	Section	Espèces	
Lavandula	Lavandula	Lavandula	<i>L. angustifolia</i> Mill.	
			<i>L. lanata</i> Medik.	
			<i>L. latifolia</i> Boiss.	
		Dentatae	<i>L. dentata</i> L.	
			<i>L. pedunculata</i> (Mill) Cav.	
		Stoechas	<i>L. stoechas</i> L.	
	<i>L. viridis</i> L'Hér.			
	Fabricia	Pterostoechas	<i>L. multifida</i> L.	
			<i>L. canariensis</i> Mill.	
			<i>L. minutolii</i> Bolle.	
			<i>L. bramwellii</i> Upson & S.Andrews	
			<i>L. pinnata</i> L.f.	
			<i>L. buchii</i> Webb & Berthel.	
			<i>L. rotundifolia</i> Benth.	
			<i>L. maroccana</i> Murb.	
			<i>L. tenuisecta</i> Coss. Ex Ball	
			<i>L. rejadalii</i> Upson & Jury	
			<i>L. mairei</i> Humbert	
			<i>L. coronopifolia</i> Poir.	
			<i>L. saharica</i> Upson & Jury	
			<i>L. antinea</i> Maire	
			<i>L. pubescens</i> Decne.	
			<i>L. citriodora</i> A.G. Mill.	
			Subnudae	<i>L.subnuda</i> Benth.
				<i>L. macra</i> Baker
				<i>L. dhofarensis</i> A.G. Mill.
				<i>L. samhanensis</i> Upson & S.Andrews
				<i>L. setifera</i> T. Anderson
				<i>L. qishnensis</i> Upson & S.Andrews
				<i>L. nimmoi</i> Benth.
				<i>L. galgalloensis</i> A.G. Mill.
				<i>L. aristibracteata</i> A.G. Mill.
				<i>L. somaliensis</i> Chaytor
			Chaetostachys	<i>L. bipinnata</i> (Roth) Kuntz
<i>L. gibsonii</i> J. Graham				
Hasikenses	<i>L. haskinensis</i> A.G. Mill.			
	<i>L. sublepidota</i> Rech.f.			
Sabaudia	Sabaudia	<i>L. atriplicifolia</i> Benth.		
		<i>L. erythraeae</i> (Chiov.) Cufod		

I.1.2. Description botanique

L. stoechas est communément appelée 'lavande française', 'lavande italienne', 'lavande espagnole', 'lavande des stoechades', 'lavande maritime', 'lavande papillon' ou 'lavande à toupet'. En Algérie, *L. stoechas* est très connue sous le nom local "Helhal". Elle a été historiquement la première lavande à être formellement décrite. Elle se présente sous la forme d'un arbrisseau (Figure 1) ou d'un buisson très aromatique et très ramifié pouvant atteindre un mètre de haut avec une lourde odeur semblable à celle du pin. Les feuilles opposées de 2-4 cm de long sont sessiles, tomenteuses, oblongues, lancéolées, linéaires, étroites et recourbées sur les bords et sont souvent grises. Les inflorescences de coupe carrée sont sessiles, compactes et surmontées d'une couronne de bractées florales violettes, élargies, stériles, obovales ou spatulées de 1 à 2 cm de longueur. Les bractées fertiles sont largement ovales à obovales-subtrilobées, brièvement acuminées, membraneuses, veinées et plus courtes que le calice. Le calice est sessile, à treize nervures avec des lobes moyens modifiés en un appendice. La corolle est de couleur violet foncée ou mauve. Les variétés blanches sont nommées forme *leucantha* Ging. et les variétés de fleurs rose-rouge ou rose sont appelées forme *rosea* Maire. Les fruits sont sans intérêt économique comme tous ceux de la famille. Ils permettent cependant la production de graines. Les taxons de la section *Stoechas* s'hybrident facilement pour donner de nombreux taxons variants. Contrairement à beaucoup d'autres lavandes, cette lavande préfère les sols siliceux et les terrains acides. Elle supporte la mi-ombre et tolère le froid jusqu'à -5°C. La floraison, plus précoce que chez les autres lavandes, se déroule d'avril à mai puis en automne (Upson et Andrew, 2004).



Figure 1 : *Lavandula stoechas*, tige fleurie.

1.1.3. Répartition géographique

L. stoechas est la lavande dont le territoire géographique est le plus vaste. Elle est répandue dans tout le bassin méditerranéen (Europe méridionale, l'Afrique du Nord et le Moyen Orient) avec une petite disjonction sur la frontière Lybie-Egypte (Figure 2). Actuellement, elle a été introduite et est cultivée en Bretagne, Nouvelle Zélande et en Australie. En Algérie, *L.stoechas* est largement distribuée à travers toute la périphérie nord du pays.



Figure 2 : Distribution géographique de *L. stoechas* (d'après Upson & Andrews, 2004)

1.1.4. Usage

1.1.4.1. Usage médicinal

Les lavandes sont parmi les plantes médicinales les plus utilisées. Des preuves documentées de l'utilisation des lavandes comme agent thérapeutique remontent jusqu'aux anciens Romains, Grecs et Arabes (Eveleigh, 1996). Plusieurs revues des propriétés pharmacologiques de la lavande ont été publiées. Elles proviennent en particulier d'études effectuées sur l'huile essentielle. Comme beaucoup d'autres huiles essentielles, celle de lavande montre une activité antimicrobienne (Bachiri et al., 2018), une activité antioxydante (Lee et al., 2002), une activité antiparasitaire (Moon et al., 2004), une activité anti-inflammatoire et analgésique (Hajhashemi et al.,

2003), une activité anesthésique (Ghelardini et al., 1999), une activité spasmolytique (Lis-Balchin et al., 1999), un effet diurétique (Elhajili et al., 2001) et un effet neuroprotecteur (Buyukokuroglu et al., 2003), de plus de l'effet bénéfique sur la qualité du sommeil (Lewith et al., 2005) et sur la réduction du niveau de stress (Motomura et al., 2001).

L. stoechas spécialement est une espèce végétale bien connue et utilisée à travers toute la région méditerranéenne pour ses vertus médicinales principalement attribuées à sa teneur en HE. Elle était utilisée par les médecins musulmans qui la considéraient comme céphalique (tonique), résolvente, désobstruante, et carminative. Ils la prescrivent pour lutter contre des infections pulmonaires et pour l'expulsion des humeurs bilieuses et flegmatiques (Said, 1996). En Crète, l'HE et l'infusion des feuilles sont utilisés par des thérapeutes traditionnels comme spasmolytiques, contre le diabète, les douleurs menstruelles féminines, les calculs rénaux, l'anthrax, l'otite, l'hypertension et la matière végétale brute est également utilisée comme insectifuge (Skoula et al., 1996). La plante est également utilisée dans la médecine populaire comme antispasmodique dans les douleurs des coliques (Usmanghani et al., 1997 ; Nadkarni, 1982), expectorant, stimulant, (Giray et al., 2008) et pour les différentes maladies du système nerveux central, comme l'épilepsie et la migraine. Elle est appelée 'le balai du cerveau' (Nadkarni, 1982). Elle est d'ailleurs utilisée sous forme de fumigation pour soigner "le mal des sinus" (Simonpoli et al., 1993). Cette lavande a aussi des effets positifs sur les plaies, les infections urinaires, les maladies cardiaques et l'eczéma (Baytop, 1999). Finalement, elle possède également des vertus analgésiques, sédatives, antiseptiques (Baytop, 1999) et antimicrobiennes (Asimgil, 1997). Dans la médecine populaire algérienne, les parties aériennes, surtout les inflorescences, sont utilisées comme un agent antiseptique et stimulant (Mahmoudi, 1982).

1.1.4.2. Autres usages

Les HEs des espèces du genre *Lavandula* sont de haut intérêt économique dans les industries des parfums, des cosmétiques, des arômes agro-alimentaires, pharmaceutiques et de nos jours également dans l'aromathérapie (Boelens, 1995 ; Lis-Balchin, 2002 ; Upson & Andrews, 2004). Les espèces les plus couramment utilisées, et ayant une valeur industrielle et médicinale, sont *L. angustifolia*, *L. latifolia*, *L. stoechas*, *L. x intermedia*, *L. dentata*, *L. dhofarensis*, *L. fragrans* et *L.*

multifida (Gámez *et al.*, 1987 ;Cavanagh *et al.*, 2002 ; Upson & Andrews, 2004). Dans l'industrie agro-alimentaire, les HEs de lavande sont employées dans les boissons aromatiques, les crèmes glacées, les bonbons, les pâtisseries, et les gommes à mâcher (Kim *et al.*, 2002). Les espèces du genre *Lavandula* sont aussi des plantes mellifères qui génèrent des miels de couleurs et odeurs propres à chaque espèce. Les fleurs de la lavande fine (*L.angustifolia*), le lavande aspic (*L. latifolia*), le lavandin (*L. x intermedia*) et la lavande stéchas (*L. stoechas*) constituent des sources majeures de nectar pour les abeilles (Guyot-Declerck, 2002). Il a été mentionné que certaines lavandes sont aussi utiles dans l'agriculture biologique comme bioinsecticides. Elles constituent des cultures de choix dans les terres arides (González-Coloma *et al.*, 2006). En cuisine Algérienne, *L. stoechas* est utilisées comme herbe culinaire pour préparer un type particulier de couscous. En parfumerie, bien que *L. stoechas* fût la première lavande à être utilisée, son HE est aujourd'hui délaissée en raison de son odeur fortement camphrée et de la concurrence importante des autres lavandes qui se prêtent mieux à la culture intensive et dont l'odeur est plus agréable. La forte teneur en camphre généralement observée limite ses applications en cosmétologie (Benabdelkader, 2012).

I.2. LES HUILES ESSENTIELLES

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production des huiles essentielles. Certaines cellules prennent en charge ces biosynthèses et également le stockage des métabolites formés. Il s'agit de tout un ensemble de réactions biochimiques participant à la vie d'une plante : respiration, photosynthèse, etc. (Garnero, 2003)

Les plantes aromatiques contiennent deux types de métabolisme : Le métabolisme primaire fournit les constituants de base en quantité élevée. Les plus importants sont les sucres et leurs dérivés, les lipides et les protéines. Le métabolisme secondaire produit des métabolites en faible quantité, dont les applications dans différents domaines sont de la plus grande importance. Les huiles essentielles font partie de ce groupe de métabolites, avec les alcaloïdes et les phénols. (Haddouchi *et al.*, 2008)

I.2.1. Définition et localisation

Les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont : «des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.» (Bruneton, 1993). Selon Smallfield (2001), les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou par des solvants. Selon Padrini & Luchironi (1996), les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois, elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal. Elles sont odorantes et très volatiles.

Les huiles essentielles sont rencontrées dans diverses familles botaniques, elles sont largement répandues dans le monde végétal et se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles (Richter, 1993). Actuellement, on compte environ 800,000 espèces végétales et parmi elles, seulement 10% sont capables de synthétiser une essence, c'est-à-dire les plantes aromatiques (Balz, 1986). Ces essences aromatiques sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante (Bruneton, 1999). Elles peuvent être stockées dans : les fleurs (Bergamotier), les feuilles (Citronnelle, Eucalyptus, Laurier noble), les écorces (Cannelier), les bois (Bois de rose, Santal), les racines (Vétiver), les rhizomes (Curcuma, Gingembre), les fruits (Toute épice, Anis), les graines (Muscade). Les huiles peuvent exister à la fois dans différents organes chez la même espèce, où la composition chimique peut varier d'un organe à un autre.

I.2.2. Les principales familles des plantes aromatiques

Selon Bachelot *et al.* (2005), parmi les principales familles des plantes aromatiques:

- ❖ Les Abiétacées (anciennement appelées Pinacées): 200 espèces réparties en 10 genres, représentées par les conifères (les sapins, les cèdres, les mélèzes, les épicéas, et les pins).

- ❖ Les Cupressacées: C'est une famille comprenant des arbres et arbrisseaux à feuilles écaillées en général. On y trouve les cyprès, les thuyas et les genévriers.
- ❖ Les Lamiacées (anciennement appelées les Labiées): C'est une importante famille de plantes dicotylédones avec environ 6000 espèces réparties en 9 sous-familles, elles-même réparties en 210 genres (les lavandes, les menthes, le romarin...), cette famille est une grande source d'huiles essentielles.
- ❖ Les Myrtacées: Cette famille est représentée par des arbres, des arbustes ou arbrisseaux. On trouve 3000 espèces réparties en 130 genres, en zones tempérées, subtropicales et tropicales (surtout en Australie et en Amérique). Dans cette famille on trouve de nombreux eucalyptus, des girofliers, et des myrtes.
- ❖ Les Lauracées: 2000 à 2500 espèces. Ce sont des arbres verts et sauvages, que l'on trouve surtout au Brésil. On y trouve les cannelles (de Chine), le laurier noble, le sassafras...etc.
- ❖ Les Rutacées: On y trouve 900 espèces réparties en 50 genres, qui sont en zones tropicales ou subtropicales. Ce sont des arbres, arbustes ou plus rarement des plantes herbacées, grands producteurs d'huiles essentielles (le citron, le citron vert, la mandarine).
- ❖ Les Ericacées: Famille des plantes ligneuses, que l'on trouve en régions tempérées et tropicales. On trouve 3500 espèces. Ce sont des plantes très précieuses en thérapeutique (la gaulthérie, le lédon).
- ❖ Les Astéracées (anciennement appelées Composées): Ils forment la plus grande famille du règne végétal. On trouve plus de 20,000 espèces, surtout en zones sèches et arides (la camomille, l'estragon, et la santoline).

I.2.3. Composition chimique d'une huile essentielle

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpènes et terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (beaucoup moins fréquent) d'autre part.

1.2.3.1. Les terpènes

Vers le milieu du XIX^{ème} siècle, les travaux sur l'essence de térébenthine sont à l'origine du terme "terpènes" donné aux hydrocarbures de formule brute $C_{10}H_{16}$. Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Ils sont classés chimiquement en fonction du nombre d'unités isopréniques $(C_5H_8)_n$ constituant leurs structures carbonées, selon la règle élaborée initialement par Léopold Ruzicka (Wichtl et Anton, 2003). On distingue ainsi selon le nombre de carbone constituant les molécules de ce groupe : Les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}) et les tetraterpènes (C_{40}). Les terpènes les plus rencontrés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : Les monos- et les sesquiterpènes.

❖ Monoterpènes: Les monoterpènes sont constitués par 10 atomes de carbone ou deux unités isopréniques. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle. Ils se composent de plusieurs fonctions (Bakkali et *al.*, 2008):

- Carbures :

Acycliques : myrcène, ocimène, etc.

Monocycliques : α - et γ -terpinène, *p*-cymène, phellandrène, etc.

Bicycliques : pinènes, camphène, sabinène, etc.

- Alcools :

Acycliques : géraniol, linalol, citronellol, etc.

Monocycliques : menthol, α -terpinéol, terpin-1-èn-4-ol.

Bicycliques : bornéol, fenchol, chrysanthénol, thyan-3-ol, etc.

- Aldéhydes :

Le plus souvent acycliques : géraniale, néral, citronellal, etc.

- Cétones :

Acycliques : tagétone, etc.

Monocycliques : menthone, isomenthone, carvone, pulégone, etc.

Bicycliques : camphre, fenchone, thuyones, pinocarvone, etc.

- Esters :

Acycliques : acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle, etc.

Monocycliques : acétate de méthyle, acétate d' α -terpinyle , etc.

Bicycliques : acétate d'isobornyle, etc.

- Ethers :

 - 1,8-cinéole, menthofurane, etc.

- Peroxydes : ascaridole, etc.

- Phénols : thymol, carvacrol, etc.

❖ **Sesquiterpènes** (Bakkali et *al.* 2008): les Sesquiterpènes (C₁₅) sont formés de trois unités isopréniques, les mêmes familles chimiques rencontrées dans la série des monoterpènes se retrouvent dans cette série :

- Carbures :(azulène, β -bisabolène, β -caryophyllène, zingiberène, etc.

- Alcools : cédrol, farnésol, carotol, β -santalol, etc.

- Cétones : germacrone, nootkatone, β -vétinone, etc.

- Epoxyde : oxyde de caryophyllène, etc.

1.2.3.2. Les composés aromatiques

Selon Bakkali et *al.* 2008, Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C₆- C₃) sont beaucoup moins fréquents que les terpènes. Les composés aromatiques comprennent:

- Aldéhydes : Cinnamaldéhyde

- Alcool : l'alcool cinnamique

- Phénol : chavicol, eugénol

- Dérivées de méthoxy : anéthole, estragole

La composition chimique, la quantité et la qualité d'une huile essentielle dépendent de plusieurs facteurs à savoir :

- Intrinsèques : Les facteurs génétiques, la localisation, le degré de maturité du végétal concerné et l'étape physiologique (étape de développement de la plante)

- Extrinsèques : le sol, l'environnement. (conditions climatiques, protection de culture, type de culture et mode de récolte).

- Technologiques : mode d'extraction.

Par conséquent la composition chimique d'une huile essentielle peut varier au sein d'une même espèce, on parlera alors de chémotypes : il s'agit d'un polymorphisme chimique.

I.2.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

I.2.4.1. Méthodes conventionnelles

I.2.4.1.1. L'hydrodistillation simple

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle (Normes AFNOR, 1992), ainsi que pour le contrôle de qualité (Pharmacopée européenne 1, 1996). Le procédé correspond à une distillation hétérogène, il consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température légèrement inférieure à 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite condensé, refroidi et récupéré dans un essencier ou vase florentin (Figure 3). Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : L'huile essentielle. La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

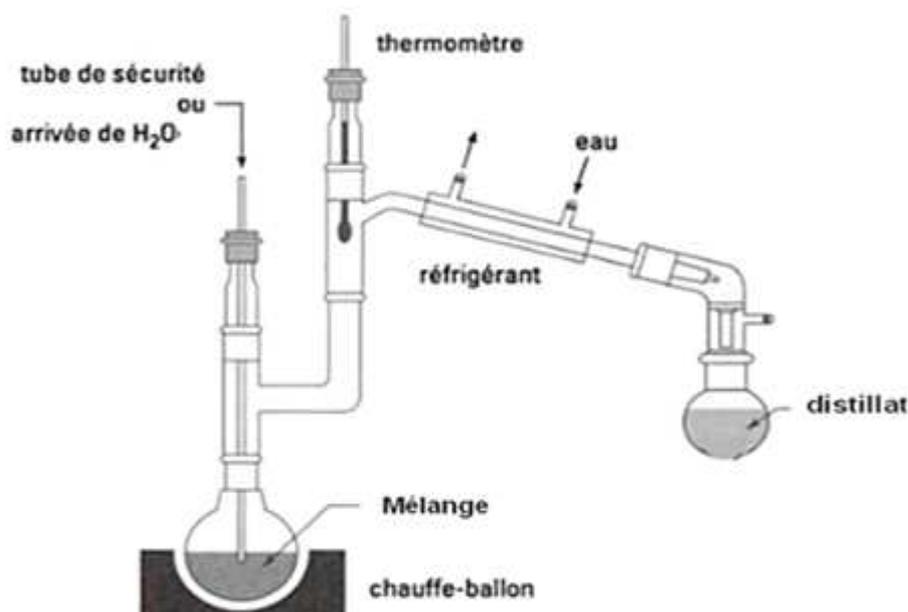


Figure 3 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation d'huile essentielle (Mesplède, 2004).

1.2.4.1.2. L'entraînement à la vapeur d'eau

À la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. L'entraînement à la vapeur d'eau consiste à récupérer l'huile essentielle des végétaux (Guenther, 1972) en faisant passer à travers ces derniers un courant de vapeur d'eau, qui traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « vapeur d'eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier, avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (Figure 4).

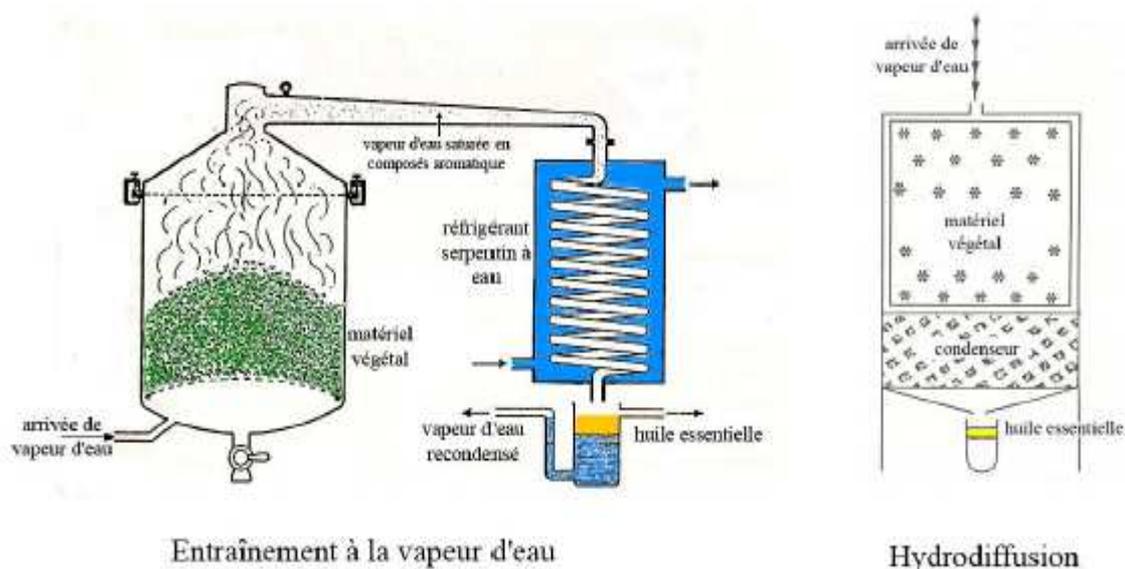


Figure 4 : Entraînement à la vapeur d'eau et hydrodiffusion (Lucchesie, 2005).

1.2.4.1.3. L'hydrodiffusion

La vapeur d'eau est pulsée du haut vers le bas à travers la plante aromatique. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau -huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. La composition des produits obtenus est qualitativement sensiblement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques (Samadja, 2009).

1.2.4.1.4. L'expression à froid

Cette méthode n'est utilisée que pour les épicarpes des Citrus (*Citrus limonum*, *Citrus sinensis*...) (Raynaud, 2006). Toutefois, ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid (Figure 5). Le principe de la méthode est très simple : Les « zestes » sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices qui ont été rompues est récupéré par un procédé physique (Bruneton, 1999).

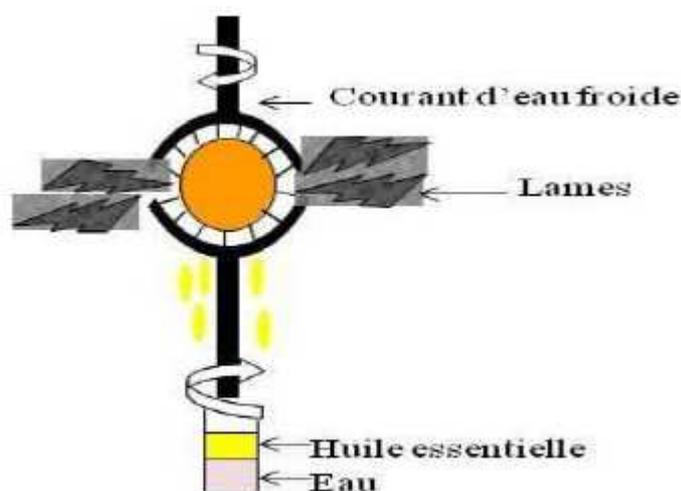


Figure 5 : Extraction par expression à froid (Mnayer, 2014)

1.2.4.1.5. Distillation « sèche »

A la distillation « sèche », aussi appelée distillation destructive, est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. On peut ainsi obtenir, à partir du bois, par calcination, de la créosote (mélange de phénols), de l'alcool méthylique et de nombreux autres produits. En revanche, rares sont les documents se rapportant à la distillation sèche en tant que méthode d'extraction de composés aromatiques volatils. Pourtant, il s'agit d'une méthode d'extraction des huiles essentielles caractéristiques des végétaux fragiles tels que les pétales de Rose. Dans le domaine de l'extraction végétale, la distillation sèche consiste à chauffer de façon très modérée les plantes ou parties de plantes sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles. L'avantage de cette méthode est la température à laquelle se déroule l'extraction : inférieure à 100°C, ce qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles (Lucchesie, 2005).

1.2.4.1.6. Huiles essentielles produites par pyrogénéation du bois

Le procédé de pyrogénéation des végétaux est rarement utilisé en vue de l'obtention des essences : On l'applique seulement au bouleau (*Betula lenta* et *Betula alba* L.) et au cade (*Juniperus oxycedrus* L.). Ce procédé consiste à

soumettre l'écorce de bouleau ou le bois (tronc, branches, racines) du cède à l'action destructrice de la chaleur. L'appareillage accompagnant la pyrogénéation du végétal fournit un goudron qui est ensuite soumis à l'entraînement à la vapeur d'eau donnant ainsi une huile d'entraînement ou une huile empyreumatique de décomposition (Martini et Seiller, 1999).

1.2.4.1.7. Extraction par enfleurage

Cette technique doit son nom au fait qu'elle est réservée aux fleurs, organes les plus fragiles des plantes ; elle consiste à pratiquer une diffusion des composés odorants dans une masse de matière grasse animale ; si le procédé se fait à froid, il s'agit d'une extraction par enfleurage ; si par contre l'opération se pratique à chaud, les graisses étant fondues au bain-Marie (50°C-70°C), la technique est appelée digestion. En raison de son coût, ce procédé classique et ancien n'est plus utilisé ; d'une part, la diffusion est lente et d'autre part, il est nécessaire de renouveler plusieurs fois les pétales pour obtenir des pommades concentrées. Enfin, il faut ensuite séparer les composés odorants extraits de leur charge grasse (Bruneton, 1993 ; Iserin, 1997).

1.2.4.1.8. Extraction par solvant organique volatile

Le principe de cette extraction consiste à épuiser la matière première de ses constituants odorants au moyen d'un solvant, et récupérer celle-ci chargée d'extraits qui après distillation donne une concrète ou résinoïde (habituellement de consistance solide et insoluble dans l'alcool) contenant des huiles essentielles, mais aussi d'autres produits. Ces concrètes sont traitées par l'alcool absolu qui ne dissout que les huiles essentielles, on obtient alors un absolu (absolu d'Iris, de Violette, de Jasmin....). Les solvants utilisés sont des mélanges d'hydrocarbures de bas poids moléculaire, ils doivent être capables d'extraire l'ensemble des constituants de l'essence sans toutefois avoir une action destructrice et solubilisatrice de la matière végétale et une bonne capacité de pénétration cellulaire et diffusion dans les tissus, d'autant lorsque les organes sécréteurs sont internes (Legrand, 1994 ; Belaiche, 1979).

1.2.4.2. Méthodes innovantes

Les composés volatils sont connus comme étant thermo- sensibles et vulnérables aux réactions chimiques. La perte de certains constituants, la dégradation de certains composés insaturés par effet thermique ou par hydrolyse,

ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus ou moins toxiques peuvent être engendrés par les techniques d'extraction conventionnelles. Ces désavantages ont incité les chercheurs à découvrir et la mise au point de nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles plus performantes, plus rentables et surtout écologiques. Parmi ces nouvelles techniques figurent : l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction par fluide supercritique, l'extraction par l'eau sub-critique, l'extraction par solvants accélérée, l'extraction par détente instantanée contrôlée, le flash détente et l'extraction par ultrasons qui fait l'objet de notre étude.

1.2.4.2.1. L'extraction assistée par micro-ondes

Les 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 300MHz et 300GHz, c'est-à-dire par une longueur d'onde comprise entre 1m et 1 cm. Sur le spectre électromagnétique, elles sont situées entre les radiofréquences et les infrarouges (Figure 6). La fréquence de 2450 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde dans l'air de 12,2cm (Anizon et *al.*, 2003) est généralement la plus utilisée pour les applications industrielles afin d'éviter le risque d'interférence avec les radiocommunications et les radars.

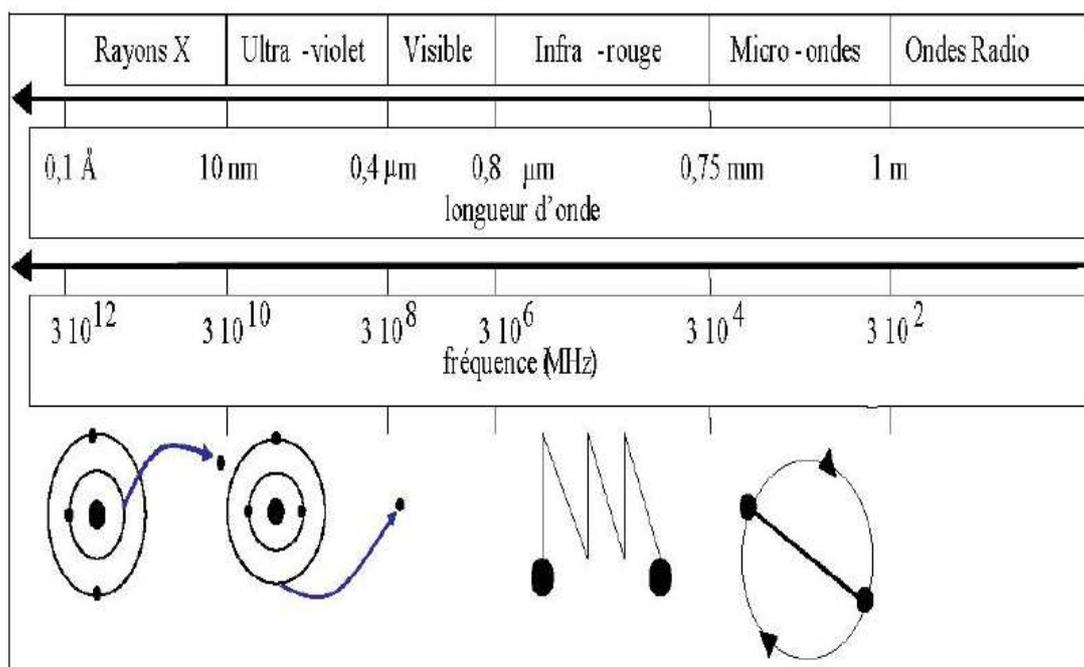


Figure 6 : Le spectre électromagnétique (Lucchesie, 2005).

Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel. Alors que le transfert de chaleur classique se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient, sous chauffage micro-ondes, le volume traité devient lui-même source de chaleur : on parle de dégagement de la chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient. La paroi externe du réacteur est plus froide que le milieu du réacteur dans le cas du chauffage micro-ondes, et inversement pour le cas du chauffage conventionnel par double enveloppe, plaque chauffante et flamme. C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface. Les phénomènes thermiques de conduction et de convection ne jouent plus qu'un rôle secondaire d'équilibrage de la température. La Figure 7 illustre ces deux modes de chauffage et présente le mécanisme du chauffage par micro-ondes et l'inversion des phénomènes de transfert de chaleur induit.

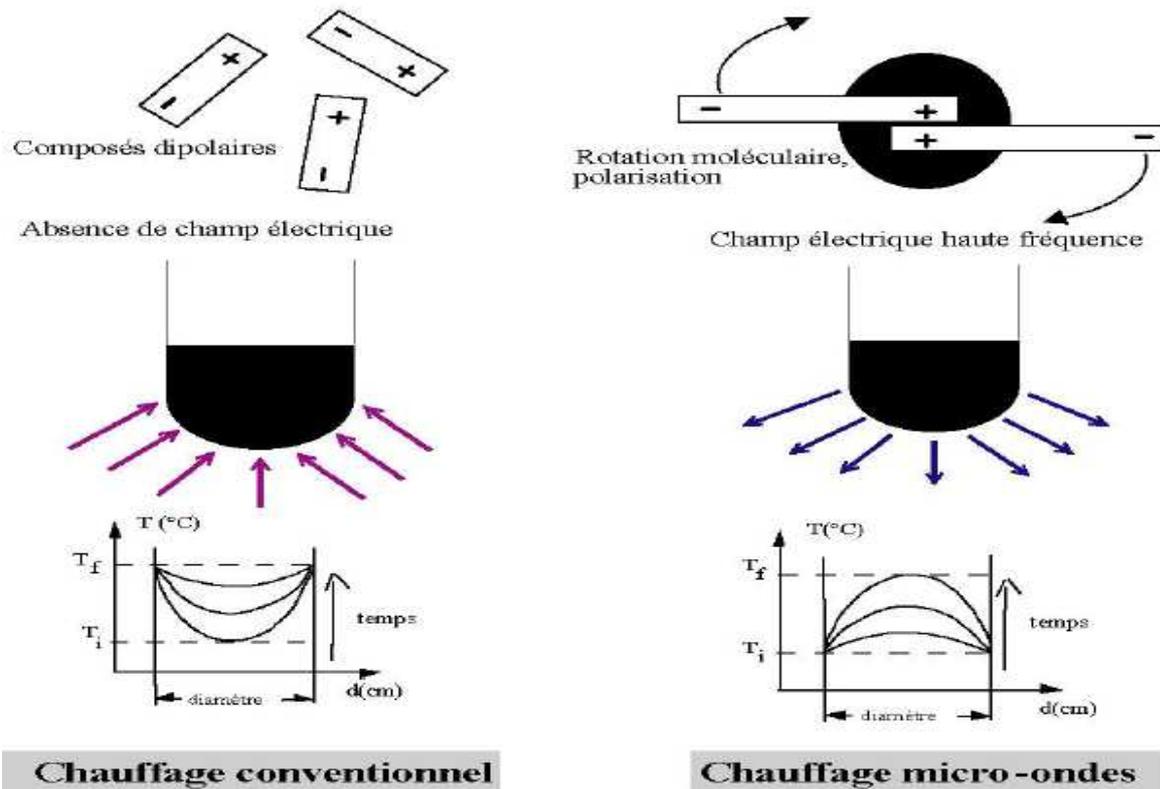


Figure 7 : Transferts thermiques sous chauffage conventionnel et micro-ondes (Chemat et al., 2009)

Le mécanisme du chauffage diélectrique repose sur le fait que les molécules polaires, telles que l'eau, ont des extrémités négatives et positives : ce sont des dipôles. En l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu diélectrique se trouvent orientés au hasard sous l'effet de l'agitation thermique du milieu. Sous l'effet

d'un champ électrique continu, les molécules tendent à s'orienter dans la direction du champ électrique. Plus le champ électrique est intense, moins l'agitation thermique qui tend à désorganiser l'alignement a d'importance. Lorsque toutes les molécules sont orientées, il apparaît un moment dipolaire global induit. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence f , les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance : c'est la rotation dipolaire. L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. L'énergie cinétique 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 liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals). Ces forces peuvent être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide. Elles s'opposent ainsi à la libre rotation des molécules. De la friction produite, naît le dégagement de chaleur (Metaxas et *al.*, 1983 ; Roussy et *al.*, 1995). La dissipation d'énergie par le produit peut être maximale si la fréquence du champ électrique est égale à la fréquence de relaxation. Le phénomène de relaxation correspond à l'apparition d'un déphasage entre l'oscillation du champ électrique et celui des dipôles. Les fréquences micro-ondes étant imposées, l'échauffement d'un produit avec une efficacité maximale est exceptionnel. Dans ce cas, une grande partie des molécules soumises à l'action du champ micro-ondes ne tourne pas avec le changement alternatif du champ mais frissonne comme le montre la figure 8.

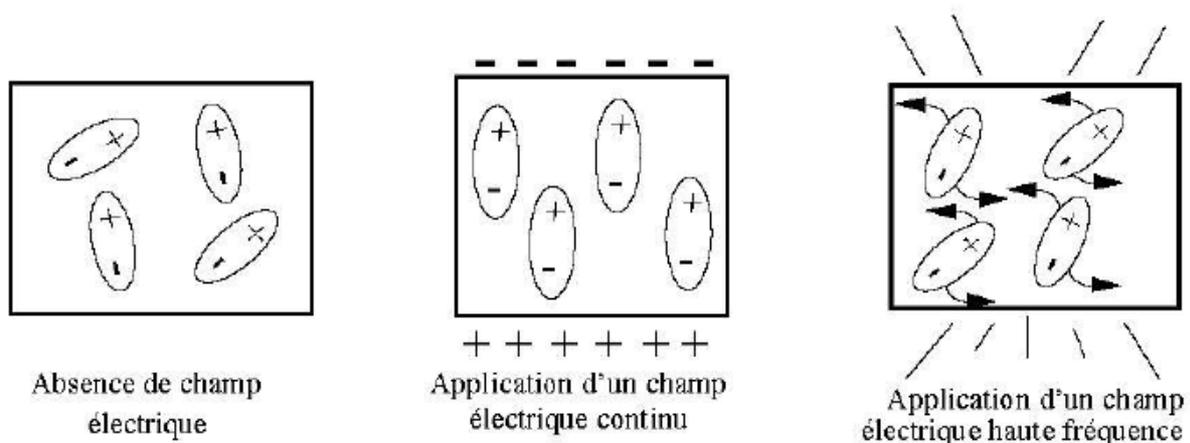


Figure 8 : Frissonnement des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes (Lucchesie, 2005).

L'aptitude d'un matériau à s'échauffer sous l'action d'un rayonnement micro-ondes est qualifiée par le facteur de perte diélectrique ϵ'' . Les produits ayant un facteur de pertes supérieures à 1 s'échauffent facilement par micro-ondes. Parmi ces composés à pertes diélectriques élevées, on peut citer l'eau à l'état liquide, les produits naturels riches en eau, des solvants polaires comme les alcools (éthanol, méthanol, etc.) ; entre 0,1 et 1, le chauffage reste possible sous certaines conditions particulières. C'est le cas des solvants ou de produits peu polaire, comme l'acétate d'éthyle ou les corps gras. Pour des valeurs inférieures à 0,1, le chauffage par micro-onde est impossible. Il s'agit : Des gaz, des métaux, de matériaux qui ne se polarisent pas sous l'effet des micro-ondes et des solvants apolaires. Dans le cas des produits naturels, c'est la teneur en eau qui déterminera la capacité de ces produits à être chauffé par micro-ondes : Si la teneur en eau est supérieure à 20% en masse, le produit s'échauffera facilement ; et si la teneur est inférieure, le chauffage par micro-onde nécessitera une mise en œuvre particulière (Anizon et *al.*, 2003). L'efficacité (en termes de rendement ou de cinétique d'extraction) et la sélectivité (en termes de pureté des produits) des procédés d'extraction assistée par micro-ondes sont un corollaire de ces conditions particulières de transfert de matière et d'énergie. Les durées des procédés d'extraction assistée par micro-ondes sont en effet de l'ordre de quelques minutes. Les rendements dans la plupart des cas, sont comparables à ceux obtenus par les procédés traditionnels d'extraction.

1.2.4.2.1.Extraction par solvant assistée par micro-ondes (Microwave-Assisted Solvent Extraction, MASE)

Le procédé MASE consiste à traiter sous micro-ondes un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant absorbant ou transparent aux micro-ondes. Les micro-ondes permettent d'accélérer la cinétique d'extraction et de réduire le ratio solvant/charge.

C'est en 1986, que l'application des micro-ondes dans le milieu de l'extraction a été pour la première fois reportée (Ganzler et *al.*, 1986). Elle décrit l'extraction d'espèces polaires par des solvants absorbant fortement les micro-ondes (méthanol) ainsi que l'extraction d'espèces apolaires par un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane). Depuis cette première publication, les travaux sur l'extraction par solvant assistée par micro-ondes ont continué d'avancer, et c'est en 1990 que l'équipe canadienne de Paré (Paré et *al.*, 1990) a déposé le premier brevet européen sur «

l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes ». Ils proposaient d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane et où les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétale. Par la suite, de nombreux brevets seront déposés par Paré et son équipe tant au niveau américain qu'au niveau canadien (Paré et *al.*, 1991 ; Paré, 1992 ; 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 plus généralement citée dans les travaux publiés. En réalité, la MAE et MAPTM sont toutes les deux, des techniques d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. Un pilote d'extraction des épices et aromates par la technique MAPTM est présenté dans la figure 9.

Les avantages de MASE sont : L'augmentation de la vitesse d'extraction d'un facteur 2 à 20, une plus grande sélectivité de l'extraction et la diminution de la consommation de solvant d'un facteur 2 à 5 (Anizon et *al.*, 2003). De plus, MAE offre d'autres avantages : moins d'énergie consommée, une utilisation plus faible de solvants toxique et une quantité de résidus moindre (Luque de Castro et *al.*, 1999). Les principaux paramètres pouvant influencer la performance de la technique MASE sont : la nature du solvant et de la matière première ; le volume du solvant ; la puissance du micro-onde ; le temps et la température (Sanchez-Prado et *al.*, 2010).

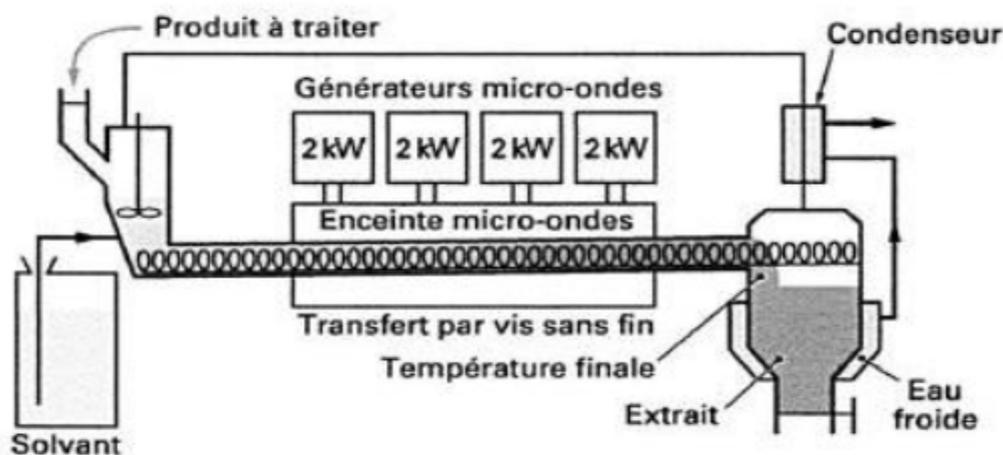


Figure 9 : Schéma d'une installation pilote d'extraction par solvant assistée par micro-ondes

1.2.4.2.1.2. Hydrodistillation par micro-ondes sous vide pulsé (Vacuum Microwave Hydrodistillation, VMHD)

Le procédé VMHD, a été breveté par Archimex en 1994 (Mengal et *al.*, 1994). Il repose sur l'application conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Les micro-ondes accélèrent le transfert des molécules vers le milieu extérieur et le vide pulsé permet de réaliser l'entraînement azéotropique à une température inférieure à 100°C. La figure 10 représente le schéma de principe d'un outil VMHD, constitué d'une enceinte équipée d'une double enveloppe et d'une pale d'agitation, muni d'un générateur micro-ondes, d'un système permettant de condenser et de récupérer les vapeurs, des moyens permettant d'appliquer et de réguler le vide dans l'enceinte et de fixer la température de la double enveloppe.

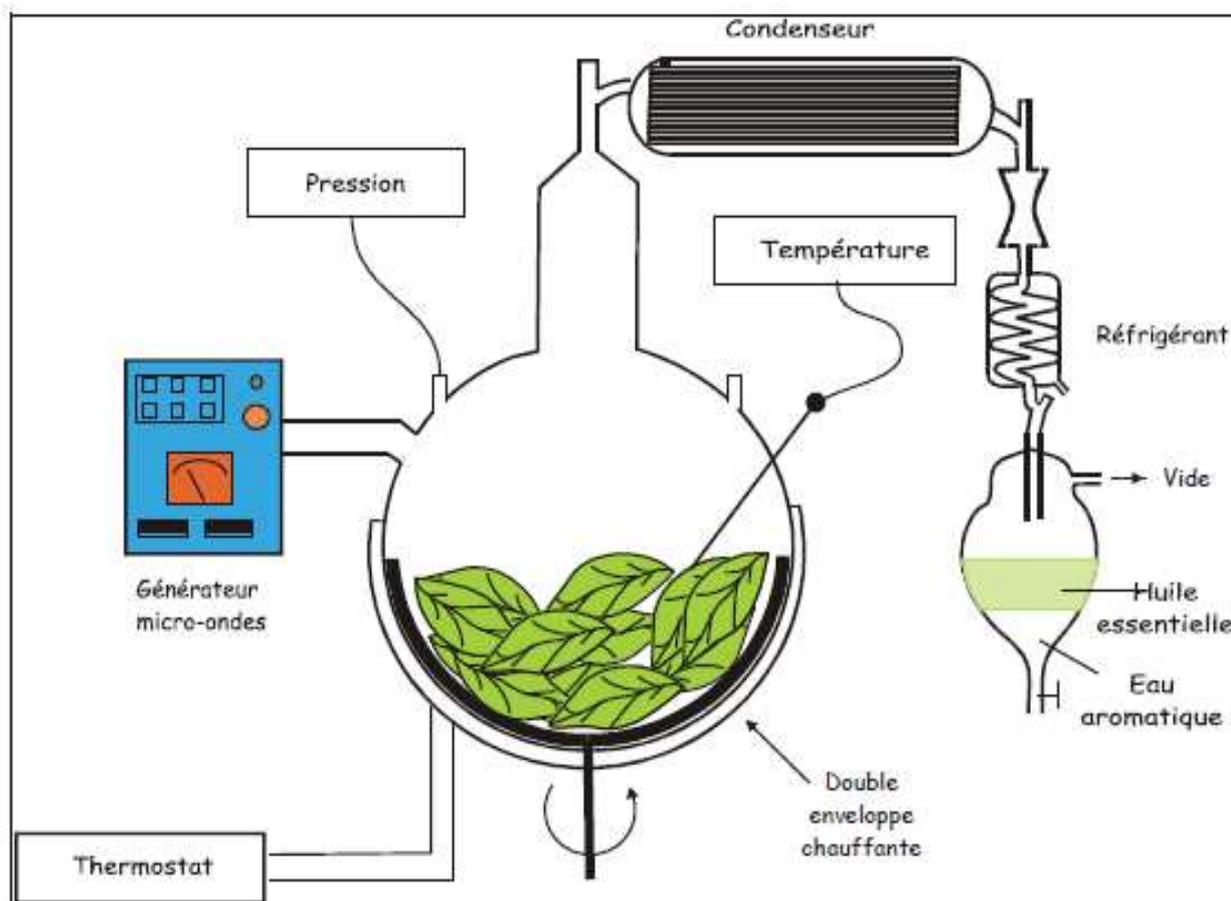


Figure 10 : Schéma d'une installation VMHD (Anizon et *al.*, 2003).

La matière première fraîche ou sèche (et dans ce dernier cas, additionnée de la quantité d'eau juste requise) est introduite dans l'enceinte de l'extracteur. Dès le début, la puissance micro-ondes est fixée à une valeur généralement conservée constante tout au long du traitement. Cette valeur est de l'ordre de 0,2 à 1 KW par kilogramme de matière première traitée. Elle dépend essentiellement du taux de chargement de l'extracteur et de certaines caractéristiques de la matière première (teneur en matière sèche, fragilité des espèces à extraire). Sous l'effet des micro-ondes et du chauffage par double enveloppe, la température de la charge augmente jusqu'à atteindre une température de consigne T_c , généralement comprise entre 65 et 80 °C. On applique alors pendant une durée d'environ 1 min une pression réduite inférieure à la tension de vapeur de l'eau à la température T_c . Pendant cette phase sous pression réduite, l'eau de constitution du végétal est vaporisée et les condensats chargés en espèces aromatiques sont récupérés.

Le procédé VMHD présente l'avantage de pouvoir réaliser une extraction 5 à 10 fois plus rapide, pour un rendement équivalent. Il est réalisé à une température plus basse que les méthodes traditionnelles, réduisant ainsi les risques de dégradation thermique. Par conséquent, les huiles essentielles extraites par le procédé VMHD présentent un profil très proche des essences contenues dans la matière première.

1.2.4.2.1.3. Hydrodistillation assistée par micro-ondes (Microwave hydrodistillation, MWHD)

L'hydrodistillation assistée par micro-ondes a été développée et utilisée pour l'extraction des huiles essentielles de *Xylopiya aromatica* et *Lippia alba* par Stashenko et al. (Stashenko et al., 2004 ; Stashenko et al., 2004). Ce procédé repose entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique, il consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four micro-ondes. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four (Figure 11).

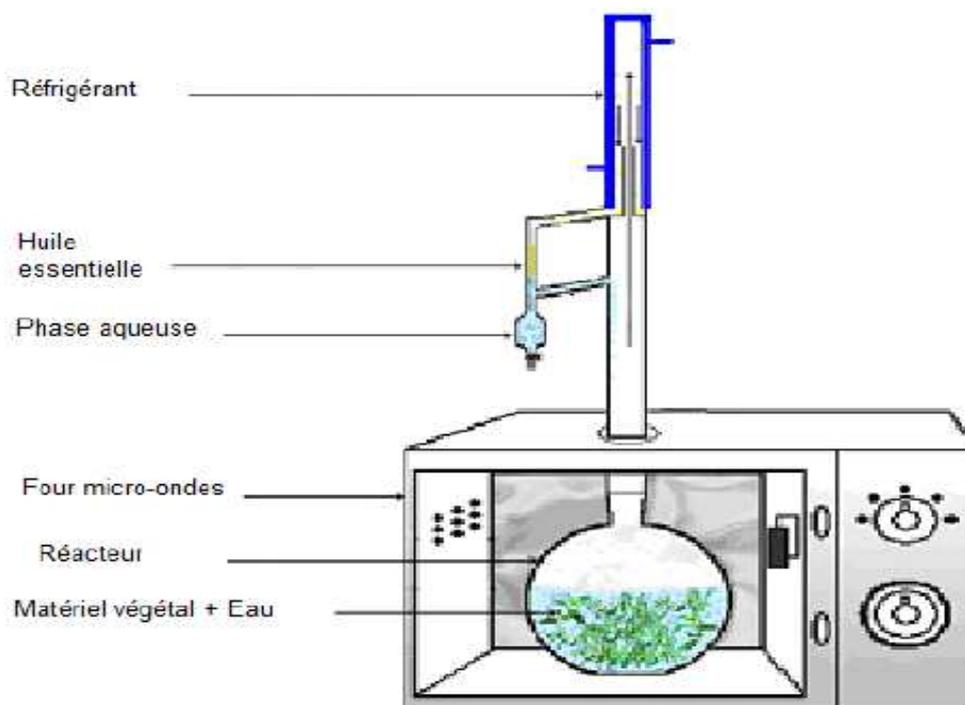


Figure 11 : représentation schématique de l'appareil utilisé dans l'extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes (Golmakani et al., 2008).

Une étude comparative entre la technique MWHD et la technique HD a été réalisée pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques (Rezvanpanah et al., 2008 ; Phutdhawong et al., 2007), ces études ont pu conclure que la technique MWHD présentait un temps d'extraction plus court que l'HD pour un rendement similaire. Golmakani et al. (2008) ont fait l'extraction de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* L. par la technique hydrodistillation assistée par micro-ondes (MWHD) et les résultats obtenus ont été comparés avec ceux obtenus par la technique classique d'hydrodistillation (HD) en terme de : temps d'extraction, rendement, composition chimique, qualité de l'huile essentielle et coût de l'opération. L'étude a montré que l'extraction par MWHD en 75 mn conduisait d'une part à un rendement semblable à celui obtenu par HD pendant 4h (2,44% contre 2,39% respectivement) et d'autre part à une composition chimique similaire. MWHD offre une économie en énergie par rapport à HD, c'est une technique moderne et rapide. Dans le cas de l'extraction l'huile essentielle de la partie aérienne de *Zataria multiflora* Boiss. (Golmakani et al., 2008), l'étude a montré que le procédé MWHD donnait un rendement plus élevé (3,66% contre 3,44%) pendant un temps plus court (1h contre 4h) en comparaison avec l'hydrodistillation.

1.2.4.2.1.4. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (Solvent Free Microwave Extraction, SFME)

Cette technique a été développée et brevetée par Chemat *et al.* (Chemat *et al.*, 2003 ; Chemat *et al.*, 2004). Elle permet de réaliser l'extraction des produits naturels à pression atmosphérique. Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant. Une assistance électromagnétique permet le chauffage de l'eau intrinsèque de la plante et provoque la distillation azéotropique d'un mélange eau/huile essentielle. Les vapeurs sont condensées par un système de refroidissement et sont redirigées dans l'appareil de Clevenger, dans lequel les vapeurs recondensées seront séparées par simple séparation de phase (due à leur densité). Un système de cohobation permet à la phase aqueuse éliminée du réacteur de distillation de retourner dans le réacteur, afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal (Figure 12).

La technique SFME a été appliquée pour l'extraction de l'huile essentielle à partir des épices et des plantes aromatiques où la SFME est le plus souvent comparé à l'hydrodistillation classique. Pour les plantes aromatiques (Lucchesie *et al.*, 2004), l'étude réalisée a montré que l'extraction par SFME en 30 minutes conduisait à des rendements similaires à ceux obtenus par hydrodistillation pendant 4,5 h et les huiles essentielles extraites étaient plus riches en composés oxygénés. Concernant les épices (Lucchesie *et al.*, 2004), les rendements obtenus sont inférieurs avec la technique SFME par rapport à la technique classique d'hydrodistillation, mais avec un temps de chauffage réduit huit fois moins par rapport à l'hydrodistillation.

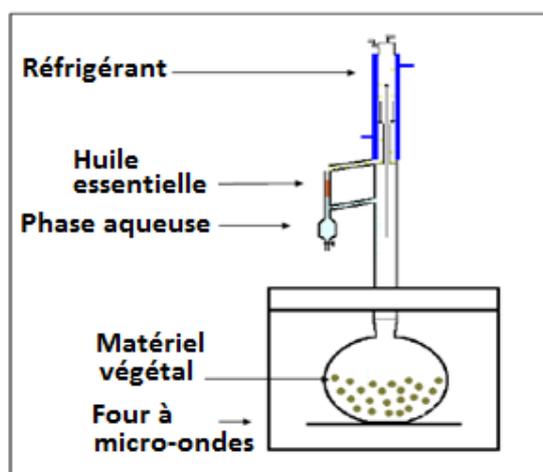


Figure 12 : Schéma du montage de l'extraction sans solvant assistée par micro-onde (Lucchesie *et al.*, 2004).

La technique SFME est donc plus économique, en temps et en énergie. Tigrine-Kordjani et *al.* (2006) ont mis en évidence que l'extraction par MAD était plus économique en énergie, présentait un temps plus court (30 minutes contre 3 heures) riche en composés oxygénés (59% contre 46%). Une huile plus sélective conduisait à un rendement similaire (0,6% contre 0,6%) à ceux obtenus par hydrodistillation. Lucchesi et *al.* (2007) ont montré que l'extraction des huiles essentielles des graines de cardamome par la technique SFME menait à une composition chimique différente à celle obtenue par la technique conventionnelle d'hydrodistillation. L'étude a montré aussi l'influence positive de trois paramètres de la SFME : le temps d'extraction, la puissance de micro-ondes et la teneur en eau initiale sur le rendement en huile essentielle. Ferhat et *al.* (2007) ont isolé l'huile essentielle des fruits de *Citrus* par différentes méthodes : expression à froid, hydrodistillation et la distillation sèche par micro-ondes (extraction sans solvant par micro-ondes). La comparaison de ces trois méthodes a révélé que la technique SFME offre des avantages plus importants que les techniques classiques : un temps plus court (30 min via 3h pour l'hydrodistillation et 1h pour l'expression à froid), meilleur rendement (0,24% via 0,21% pour l'hydrodistillation et 0,05% pour l'expression à froid), un impact environnemental moindre, une augmentation de l'activité antimicrobienne, une huile essentielle de qualité (un grand pourcentage en composé oxygénés). Bendahou et *al.* (2008) ont démontré l'extraction sélective du thymol, à partir d'*Origanum glandulosum* lors de l'extraction par SFME. Les résultats obtenus ont démontré que le procédé SFME en 20min conduisait à un rendement notable proportionnellement en 3h d'hydrodistillation (3,3% contre 4,8%) et une composition chimique dominante en composé oxygénés (87% contre 72%). Beyramoglu et *al.* (2008) ont appliqué la technique SFME dans l'extraction de l'huile essentielle de l'Oregano, l'étude réalisée a montré que cette technique a offert un meilleur rendement ; un temps court et une composition chimique et des propriétés physiques semblables à l'hydrodistillation. Okoh et *al.* (2010) ont évalué l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L. obtenue par les deux techniques : l'hydrodistillation (HD) et la SFME. L'étude a montré que le rendement en huile essentielle était 0,39% pour SFME et 0,31% pour HD ; plus active contre les microorganismes à cause de sa composition chimique qui est plus riche en composés oxygénés (28,6% contre

26,98%), cette classe de composés se révélait avoir des activités antibactériennes et antifongiques.

1.2.4.2.1.5. Extraction par hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité (Microwave Hydrodiffusion and Gravity, MHG)

Ce procédé a été breveté par Chemat et *al.* (2008), cette présente invention concerne l'isolation des matériaux biologiques par hydrodiffusion via un rayonnement micro-onde, un appareil convenant pour mettre en œuvre ce procédé et un système de mise en œuvre de ce procédé en continu (Figure 13).

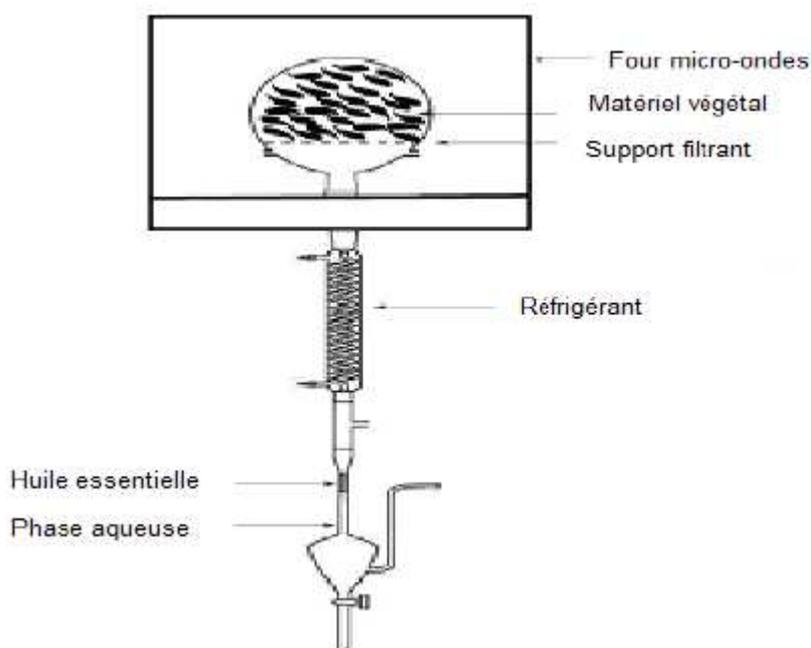


Figure 13 : Représentation schématique de l'appareil utilisé dans l'extraction par hydrodiffusion et gravité assistée par micro-ondes (Abert Vian et *al.*, 2008).

Ce procédé a été conçu pour des extractions des substances naturelles à partir de différents matériel végétal à l'échelle laboratoire et industrielles pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques à pression atmosphérique. Basée sur un principe relativement simple, cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-onde sans ajouter ni eau ni solvant organique. Le chauffage de l'eau interne à la plante permet la rupture des glandes contenant les huiles essentielles. L'huile essentielle est ainsi libérée, ainsi que l'eau interne de la matière végétale sont transférées de l'intérieur vers l'extérieur de la

plante. Ce phénomène physique connu par l'hydrodiffusion permet au mélange « eau+ huile essentielle » à diffuser à l'extérieur de la plante ensuite tomber sous l'effet de pesanteur à travers un disque de pyrex perforé. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du mélange de façon continue. L'huile essentielle et l'eau sont récupérées et séparées dans un vase florentin en une phase aqueuse et phase organique : Huile essentielle.

Ce procédé a été appliqué pour l'extraction des huiles essentielles de deux espèces de plantes fraîches (Abert Vian et *al.*, 2008). *Mentha spicata* L. et *Mentha pulegium* L., dont le taux d'humidité initial de chaque plante était respectivement 78% et 82,3%. Les rendements en huiles essentielles obtenus par MHG après seulement 20 mn sont proches de ceux obtenus après 90 min d'hydrodistillation, pour *Mentha spicata* L. (0,60% par MHG contre 0,59% par HD) et pour *Mentha pulegium* L. (0,95% par MHG contre 0,90% par HD). La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* L. extraite par les deux techniques est riche en composés oxygénés, le plus important étant le carvone (40,5% pour MHG contre 45,5% pour HD). L'huile essentielle de *Mentha pulegium* L. isolée par MHG et HD est aussi riche en composés oxygénés : le pulégone (87,8% contre 83,7%) et le menthone (3,1% contre 2,8%). De plus le MHG présente une consommation d'énergie moindre. Cette nouvelle technique développée montre que l'extraction assistée par micro-ondes combinée avec l'hydrodiffusion et effet de pesanteur prévoit une économie substantielle en temps et en énergie, elle a un impact environnemental moindre.

Cette technique a été appliquée par Bousbia et *al* (2009) pour l'extraction des huiles essentielles de plusieurs variétés de fruits de citron. Cette étude a montré que l'extraction par la technique MHG en 15 min seulement menait à des rendements identiques à ceux obtenus par la technique HD après 180 min (1% contre 1,1%) et à des compositions chimiques similaires à ceux obtenues par le procédé hydrodistillation et par expression à froid. Le MHG est donc une technique qui présente la rapidité et une économie en énergie.

Le MHG a été aussi appliqué lors d'une extraction des huiles essentielles des feuilles fraîches de romarin (Bousbia et *al.*, 2009) où une étude comparative entre la technique MHG et HD a été effectuée. Il s'est avéré que cette technique par micro-ondes offre des avantages plus importants que la technique traditionnelle : un temps

d'extraction plus court (15 min contre 3 h pour HD), une compatibilité avec l'environnement et une économie en énergie, une augmentation de l'activité antimicrobienne, une augmentation de l'activité antioxydante et fournit une huile essentielle de haute valeur (composés oxygénés en grand pourcentage).

1.2.4.2.1.6. Entraînement à la vapeur assisté sous micro-ondes (Microwave steam distillation MSD)

L'entraînement à la vapeur assisté sous micro-ondes a été développée par Sahraoui *et al.* (2008). Le procédé repose sur le principe de l'entraînement à la vapeur (EV) classique dans lequel une irradiation micro-ondes est exercée uniquement sur le réacteur d'extraction (Figure 14). Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération de l'huile essentielle est placée à l'extérieur du four micro-ondes.

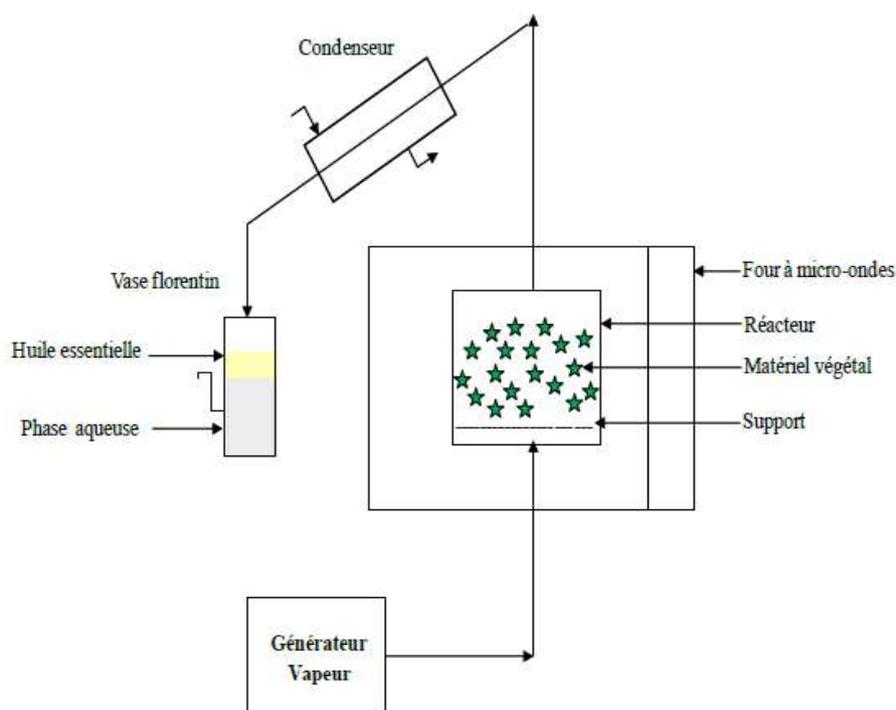


Figure 14 : Entraînement à la vapeur assisté sous micro-ondes (Boutemak, 2011).

Cette méthode a été appliquée pour l'extraction de l'huile essentielle de fleurs de lavande (*L. angustifolia* Mill.) (Sahraoui *et al.*, 2008). L'avantage de cette méthode était d'accélérer le temps d'extraction (6 minutes contre 30 minutes par entraînement à la vapeur (EV)) avec une composition chimique similaire à celle obtenue par EV.

1.2.4.2.2. Extraction par fluide supercritique (Supercritical Fluid Extraction SFE) / (extraction par CO₂ supercritique)

La température critique d'une substance est la température au-dessus de laquelle elle ne présente plus de phase liquide distincte quelque soit la pression. La tension de vapeur d'une substance à sa température critique est la pression critique. Une substance qui se trouve à des températures et à des pressions supérieures à la température et à la pression critiques (le point critique) est appelée fluide supercritique. Les propriétés des fluides supercritiques sont intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz (Buess-Hermanet *al.*, 2003). Comparés aux solvants liquides, les fluides supercritiques présentent plusieurs avantages principaux : (1) le pouvoir de dissolvant du fluide supercritique dépend de sa densité qui est fortement ajustable en changeant la pression ou/et la température ; (2) le fluide supercritique possède un coefficient de diffusion plus élevé, une viscosité et une tension de vapeur inférieures à celles des solvants liquides, conduisant à un transfert de masse plus favorable (Wang et *al.*, 2006).

Le fluide supercritique présente une viscosité faible comme les gaz, une densité se rapprochant à celle d'un liquide et une diffusivité intermédiaire entre les deux états. A cause de leurs faibles viscosités, les fluides supercritiques possèdent des propriétés de transports meilleures que celles des liquides, ils peuvent facilement diffuser à travers le matériel solide et donner rapidement un meilleur rendement d'extraction. Une des caractéristiques d'un fluide supercritique est la possibilité de modifier la densité du fluide en changeant sa pression et/ou sa température. Etant donné que la densité est reliée directement à la solubilité. Le tableau 2 donne les propriétés critiques de différents solvants utilisables dans l'extraction par fluide supercritique (Herrero et *al.*, 2006).

Le choix des fluides supercritiques est très important pour le développement d'un procédé SFE. Le dioxyde de carbone supercritique présente des avantages qui en font de lui le fluide le plus couramment utilisé. Il présente un point critique à 73 bars et 31°C. Par ailleurs le CO₂ a d'autres propriétés intéressantes : Il est non toxique, ininflammable, chimiquement inerte et disponible à l'état hautement pur à faible coût. Le CO₂ supercritique est un solvant très efficace pour l'extraction des composés apolaires tels que les hydrocarbures (Lang et *al.*, 2001).

Tableau 2 : Propriétés critiques de différents solvants utilisables dans l'extraction par fluide supercritique

Solvant	Propriété critique			
	Température (°C)	Pression (atm)	Densité (g/ml)	Paramètre de Solubilité Δs_{fc} ($\text{cal}^{-1/2} \text{cm}^{-3/2}$)
Ethène	10.1	50.5	0.200	5.8
Eau	101.1	217.6	0.322	13.5
Méthanol	-34.4	79.9	0.272	8.9
Dioxyde de carbone	31.2	72.9	0.470	7.5
Ethane	32.4	48.2	0.200	5.8
Oxyde Nitreux	36.7	71.7	0.460	7.2
Hexafluorure de soufre	45.8	37.7	0.730	5.5
n- Butène	-139.9	36.0	0.221	5.2
n- Pentane	-76.5	33.3	0.237	5.1

Beaucoup des métabolites tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes et les composés glycosidiques sont très peu solubles dans le dioxyde de carbone. Pour surmonter la difficulté de solubilité limitée des substances polaires dans le CO₂ supercritique, des modificateurs (co-solvants) sont couramment utilisés. Les modificateurs sont des composés très polaires dont l'addition au CO₂ supercritique est connue pour augmenter de manière significative la solubilité des composés polaires (Valcaracel et al., 1997; Luque De Castro et al., 2000). Le méthanol est généralement le plus utilisé car il a été prouvé le plus efficace et est miscible (jusqu'à 20%) avec le CO₂. Cependant, l'éthanol peut être une meilleure alternative dans SFE des métabolites végétaux en raison de sa faible toxicité (Lang et al., 2001 ; Hamburger et al., 2004).

Un système d'extraction pour un fluide supercritique est montré dans la figure 15. Pendant la SFE, la matière végétale est chargée dans un extracteur, équipé de capteurs de température et de soupapes de pression, à l'admission et à la sortie de l'extracteur, pour contrôler les paramètres d'extraction. Le réacteur d'extraction est pressurisé avec le fluide par une pompe. Le fluide et les composés extraits sont transportés vers les séparateurs, où le pouvoir solvant du fluide est baissé avec la diminution de sa pression ou en augmentant sa température. Le produit est alors récupéré par l'intermédiaire d'une valve située dans la partie la plus inférieure des séparateurs. Le fluide, quand à lui, est régénéré et recyclé.

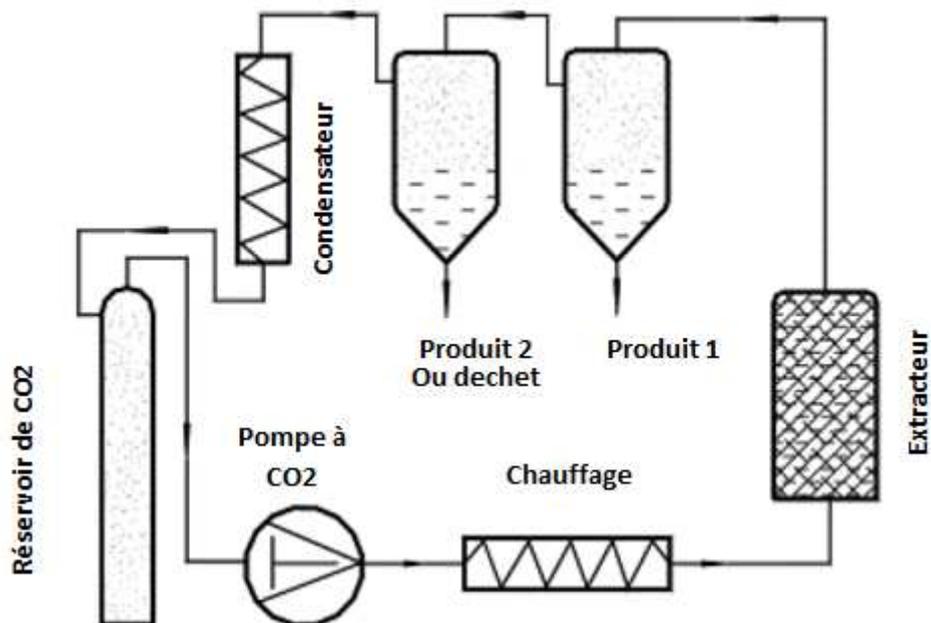


Figure 15 : représentation schématique d'un extracteur par fluide supercritique (Wang et al., 2006)

D'autres paramètres déterminants (Reverchon et al., 2006) et qui doivent être pris en compte pour la réussite de la technique SFE (SC-CO₂ extraction), ils sont : La pression et la température d'extraction, la densité de CO₂, le débit de vapeur de CO₂, la taille de la particule de la matière végétale et la durée d'extraction.

L'extraction des huiles essentielles par (SC-CO₂) a fait l'objet de nombreuses recherches qui se poursuivent encore aujourd'hui. Nous pouvons citer par exemple les différents travaux de : Alekovski et al. (2007), Wenqiang et al. (2007), Khajeh et al. (2004, 2010), Donelian et al. (2008), Ebrahimzadeh et al. (2003), Glisic et al. (2007, 2010), Grosso et al. (2008), Danh et al. (2009). Ces articles concernent l'utilisation de cette technique uniquement pour l'extraction des huiles essentielles à partir des matières végétales, ou bien établir une étude comparative entre l'extraction par CO₂ supercritique et d'autres méthodes conventionnelles. De toutes ces études, on peut conclure que l'utilisation de la technique SC-CO₂ pour l'extraction des huiles essentielles offre plusieurs avantages significatifs par rapport aux techniques classiques (Tableau 2). Les extractions sont rapides et peuvent être effectuées à des températures plus basses, évitant ainsi des pertes par dégradation thermique, une extraction sélective peut être obtenue en changeant les paramètres d'extraction (pression, température, le volume de modificateur et le temps d'extraction). Pour ces démonstrations, l'application de l'extraction SC-CO₂ est une

technique intéressante pour l'extraction des huiles essentielles. Mais, malheureusement cette technique présente des coûts d'installation et de maintenance très élevés, ce qui limite son emploi à des applications pour des produits finis de haute valeur ajoutée.

1.2.4.2.3. Extraction par l'eau subcritique (Subcritical Water Extraction (SWE), ou Continuous Subcritical Water Extraction (CSWE))

L'extraction continue par l'eau subcritique est une technique basée sur l'utilisation de l'eau comme extractant, à des températures comprises entre 100 et 374°C (les points critiques de l'eau sont 221bar et 374°C) et à une pression assez élevée pour maintenir l'état liquide. Cette technique apparaît comme une alternative puissante pour l'extraction du solide (Luque De Castro et *al.*, 1998). La propriété particulièrement intéressante dans ce type de procédé d'extraction est la variation de la constante diélectrique avec la température. A température et pression ambiante, l'eau est un solvant fortement polaire avec une constante diélectrique ϵ égal à 80. Cette valeur peut être abaissée à 27 quand la température de l'eau s'élève à 250°C, mais en maintenant l'eau à l'état liquide par l'application d'une pression appropriée. Cette valeur de ϵ est alors similaire à celle de l'éthanol (Miller et *al.*, 2000). Dans ces conditions, l'eau acquiert la capacité d'extraire des composés de faible polarité (Figure 16).

La technique SWE a été appliquée pour la première fois par Basile et *al.* (1998), pour l'extraction des huiles essentielles des feuilles de romarin (*Rosmarinus officinalis*). Depuis, les travaux sur l'extraction des huiles essentielles par le procédé SWE à partir des plantes ont continué d'avancer. Des études comparatives entre cette technique et les techniques conventionnelles ont été réalisées. Dans le cas de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de Marjoram (Jiménez-Carmona et *al.*, 1999), la CSWE a été comparée à l'hydrodistillation en terme de : temps, qualité de l'huile essentielle, efficacité et coût. Cette étude a montré de nombreux avantages : un temps d'extraction plus court d'où la rapidité de ce procédé (l'extraction par CSWE pendant 15min a fourni le même rendement que l'HD en 3h), une huile essentielle de plus grande qualité (en raison d'une plus grande proportion de composés oxygénés et une présence moindre des terpènes), une économie considérable (à la fois en terme d'énergie et de matière végétale) et un coût réduit

ainsi qu'une plus grande efficacité. *Gàmiz-Gracia et al.* (2000) ont comparé dans l'extraction des huiles essentielles de *Foeniculum vulgare* la technique CSWE avec l'hydrodistillation et l'extraction par solvant, le dichlorométhane. La méthode CSWE a offert des avantages plus importants que les techniques conventionnelles : un temps d'extraction plus court, un coût énergétique moindre, une faible consommation d'énergie et un résidu généré, ainsi que la possibilité de moduler la composition de l'huile essentielle obtenue en changeant les paramètres d'extraction (température, débit de vapeur de l'eau et temps d'extraction). De même, l'utilisation de la technique SWE a montré plus d'avantages que les techniques conventionnelles (hydrodistillation, extraction par les solvants organiques) : Un temps d'extraction court, une huile essentielle de plus grande qualité, un coût réduit et une compatibilité environnementale. Ces avantages ont été également testés en appliquant cette technique SWE pour l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de Laurel (*Fernàndez-Pérez et al.*, 2000), de l'Oregano (*Ayala et al.*, 2001) et de *Lavandula stoechas* (*Giray et al.*, 2008).

De même, Luque de Castro et *al.* (1999) ont établi de nombreuses comparaisons entre les différentes techniques d'extraction. Le tableau 3 résume les avantages et inconvénients des deux techniques d'extraction SC-CO2 et CSWE.

Tableau 3 : Comparaison entre SC-CO2 et CSWE pour l'extraction des huiles essentielles des plantes

Aspect	SC-CO2	CSWE
Etape de séchage	Oui (-)	Non (+)
Extraction des résines	Oui (-)	Non (+)
Coût d'acquisition	Elevé (-)	Moyen (+)
Coût de maintenance	Elevé (-)	Faible (+)
Condition d'extraction	Douces (+)	Moyenne (-)
Effet de pré-concentration	Oui (+)	Non (-)
Caractère écologique	Oui (+)	Oui (+)

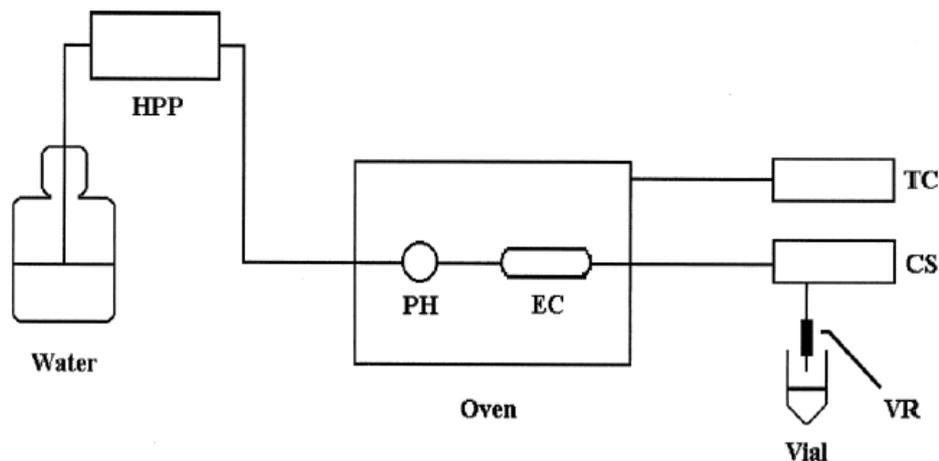


Figure 16 : Diagramme schématique d'un extracteur à eau subcritique : HPP, pompe haute pression ; PH, pré-chauffage ; CS, système de refroidissement ; EC, cellule d'extraction ; TC, contrôle de température ; DV et OAV, valves (Fernández-Pérez et *al.*, 2000).

1.2.4.2.4. Extraction par Détente Instantanée Contrôlée (DIC)

La technique DIC a été développée au niveau de laboratoire « Maîtrise des technologies Agro-industrielles » de l'Université de la Rochelle France. Cette technique qui a donné lieu à un brevet français en 1993 (Allaf et *al.*, 1993), a été initialement utilisée pour le séchage de divers produits alimentaires en améliorant la capacité d'hydratation. La technologie de Détente Instantanée Contrôlée DIC consiste à réaliser une chute abrupte de pression (détente instantanée) amenant le produit à une pression relativement basse (généralement voisine de 3500 Pa) à la suite d'un traitement thermomécanique (température de 60°C à 200°C couplée à une pression de 10 bar de vapeur d'eau). Le procédé est bien contrôlé aux deux niveaux : la température ($\pm 2^\circ\text{C}$) et la durée de l'opération ($\pm 2\text{s}$). La vitesse de passage puis l'équilibre thermodynamique impliquent une expansion du gaz et une vaporisation d'une certaine quantité d'eau de la matière (Figure 17). La courte durée de l'opération réduit considérablement les phénomènes d'échanges et de transfert thermique entre le système du produit et le milieu extérieur ; le phénomène de vaporisation sans échange de chaleur avec l'extérieur, baptisé « autovaporisation », est tout naturellement couplé à une baisse de température et un refroidissement du produit (Ben Amor, 2008). Ce procédé a été appliqué en vue de l'extraction des huiles essentielles des feuilles de romarin par Rezzoug et *al.* (1998, 2005).

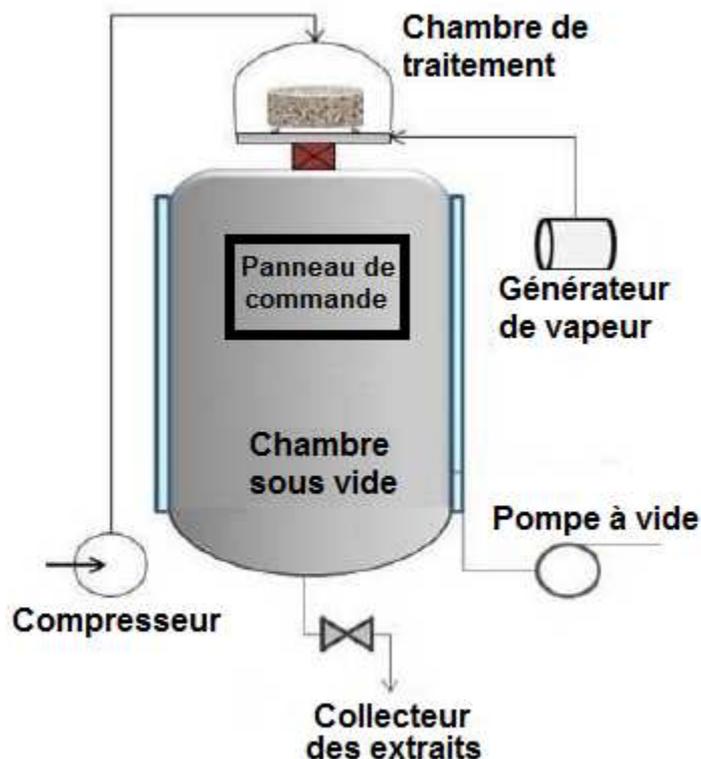


Figure 17 : Extraction par détente instantanée contrôlée.

1.2.4.2.5. Le procédé Flash détente

La Flash détente, une nouvelle alternative aux procédés traditionnels consiste à étuver le matériel végétal à 60-90°C puis à l'introduire brutalement dans un récipient sous vide pulsé (30-50 mBar). La température d'ébullition de l'eau dans ces conditions de vide se situe entre 27 et 30°C. Lors de la détente sous vide, l'évaporation instantanée d'une fraction de l'eau de constitution (~10%) entraîne une désagrégation du matériel végétal suite à l'expansion avec formation des micro-canaux intercellulaires (Brat, 2001). Ce procédé a été appliqué à la transformation des fruits et des légumes permettant l'obtention de jus et de purées ayant des caractéristiques rhéologiques et physico-chimiques différentes des produits traditionnels. Il a été aussi appliqué pour la production des purées de tomate plus colorées et plus visqueuses (Brat, 2001). Concernant, l'extraction des huiles essentielles, cette technique a été appliquée à l'extraction des huiles essentielles des fruits de quatre espèces de Citrus, c'est un processus provoquant la désintégration de tissus végétaux. Les résultats ont montré que les huiles étaient enrichies en monoterpènes et appauvries en composés oxygénés (Brat, 2001).

1.2.4.2.6. L'extraction par ultrasons ou sonication (*Ultrasound-assisted Extraction UAE*)

L'utilisation des ultrasons est une technique qui est apparue en 1950 (Vinatoru, 2001) avec des équipements de taille laboratoire. Les deux types d'appareillage utilisés sont les bains à ultrasons et les extracteurs fermés équipés d'un capteur ultrasonique (Figure 18). Les ultrasons sont des ondes sonores inaudibles par l'humain de fréquence comprises entre 20 KHz et 100MHz. Au-delà de 20 KHz, Les ondes génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz.

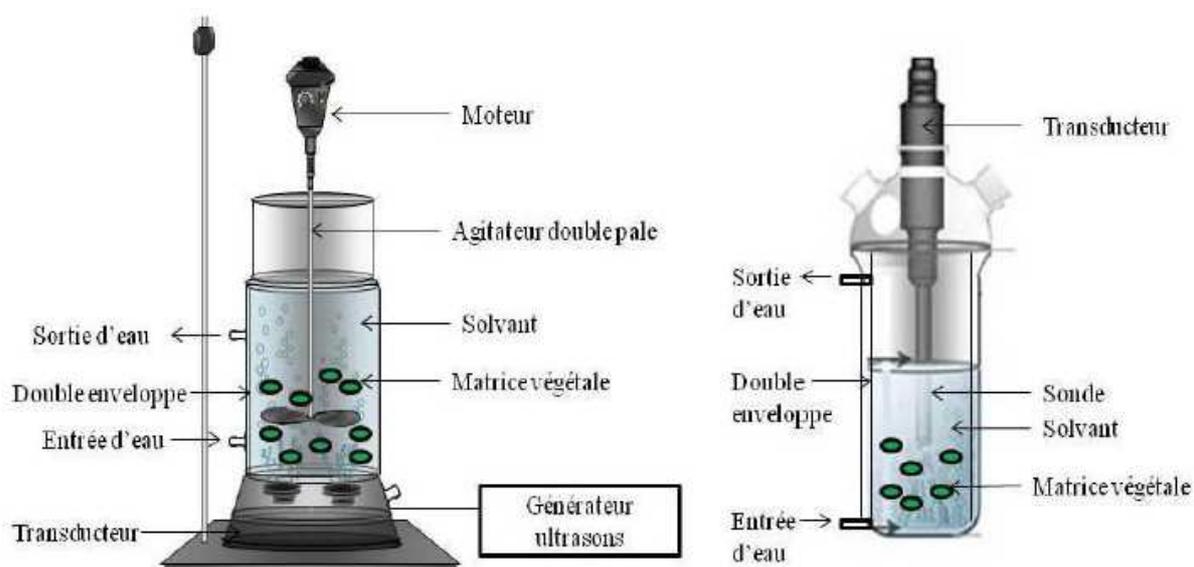


Figure 18 : Extraction par Ultrasons

La technique d'extraction par ultrasons est basée sur le principe de cavitation. Lorsque les US se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation de zones de compression et de décompression. En dessous d'un certain seuil caractéristique du liquide considéré, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et les bulles de cavitation contenant la vapeur, du liquide et des gaz dissous apparaissent. Ce phénomène appelé cavitation acoustique, a été étudié de manière théorique et expérimentale (Chemat et *al.*, 2008). Les zones de décompression et compression provoquent, si elles sont suffisamment intenses, des cavités de faible taille dont l'implosion permet d'atteindre localement 5500°C (Suslick, 1989). Près d'une surface solide, l'effondrement de

cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse. Le jet liquide a un fort impact sur la surface solide (Luque-Garcia et *al.*, 2008) (Figure 19).

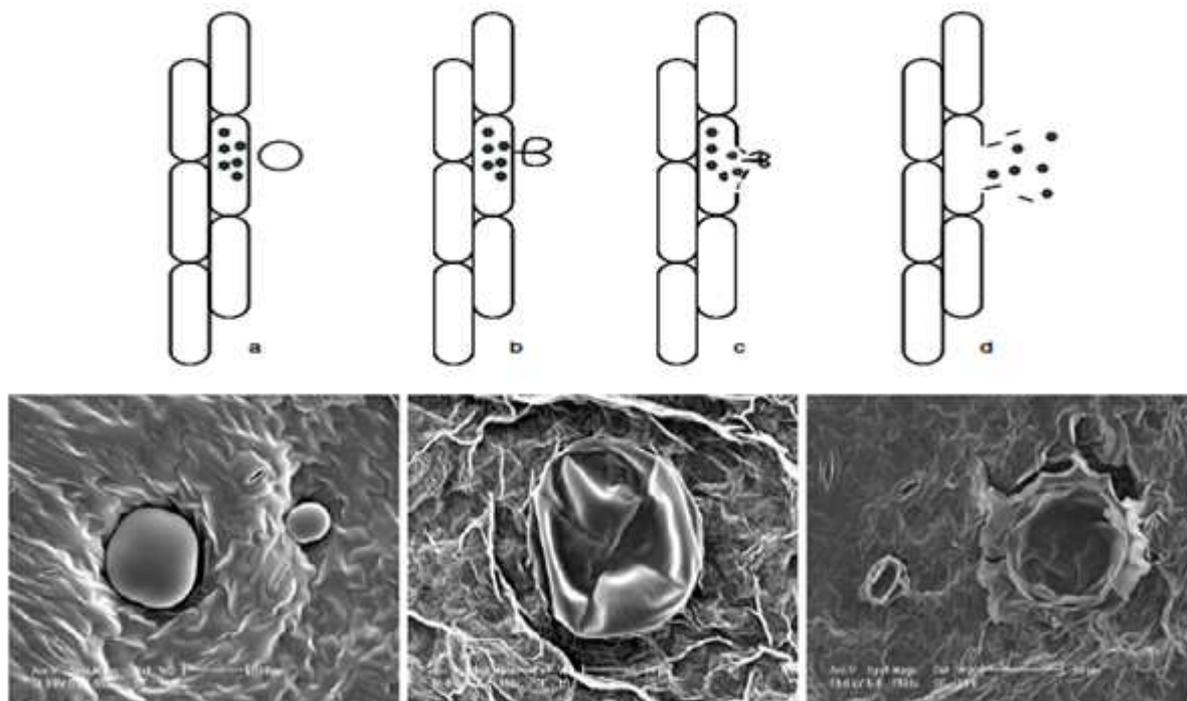


Figure 19 : L'effondrement de la bulle de cavitation et la libération du matériau végétal : exemple d'extraction de l'huile essentielle du basilic. (a) bulle de cavitation ; (b) effondrement de la bulle ; (c) destruction de la paroi cellulaire ; (d) libération de la matrice végétale et son contenu dans le milieu (Chemat et *al.*, 2011).

Selon Santos et *al.* (2009), lorsque l'intensité ultrasonore est suffisante, le cycle d'expansion peut créer des cavités ou des microbulles dans le liquide. Une fois formé, les bulles absorbent l'énergie des ondes sonores et poussent pendant les cycles d'expansion et répriment pendant le cycle de compression. En outre, les bulles peuvent commencer un autre cycle de raréfaction ou effondrer les ondes de choc principales de conditions extrêmes de pression et de température (plusieurs centaines d'atmosphères et environ 5000 K de température) (Figure 20). Ainsi, l'implosion de bulles de cavitation peut frapper la surface de la matrice solide et désintégrer les cellules provoquant la libération des composés désirés, ce qui améliore le transfert de masse et facilite l'accès des solvants au contenu cellulaire

(Vinatoru et *al.*, 1999; Romdhane et *al.*, 2002). Cet effet est beaucoup plus fort à basse fréquence (18-40 kHz).

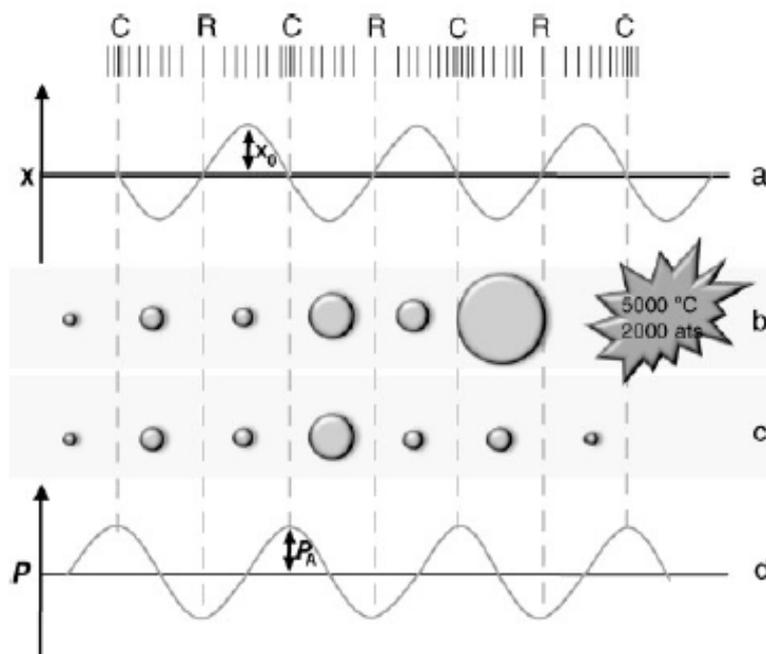


Figure 20 : Création de bulles de cavitation stables et création et effondrement de bulles de cavitation transitoires et stables. (a) Graphique de déplacement (x); (b) cavitation transitoire; (c) cavitation stable; (d) graphique de pression (P). (Santos et *al.*, 2009).

Des ultrasons de forte puissance peuvent être appliqués en utilisant deux types d'appareils à ultrasons, ou sonde à ultrasons. Les deux systèmes sont basés sur un transducteur en tant que source de puissance ultrasonore. Le bain à ultrasons (Figure 21 A) est le type d'appareil à ultrasons le plus communément connu, il consiste généralement en un réservoir en acier inoxydable avec un ou plusieurs transducteurs à ultrasons (Chemat et *al.*, 2017a).

Les bains à ultrasons fonctionnent généralement à une fréquence d'environ 40 kHz et peuvent être équipés d'un contrôle de la température. En effet, l'intensité délivrée est fortement atténuée par l'eau contenue dans le bain et verrerie utilisée pour l'expérience. Récemment, un nouveau système de bain réacteur a été développé par REUS (Contes, France) à 25 kHz, principalement utilisé pour les applications d'extraction. Il consiste d'un réacteur en acier inoxydable équipé d'une double couche manteau avec circulation d'eau pour permettre le contrôle de la température avec des systèmes de chauffage / refroidissement (Figure 21 B). Il

existe plusieurs modèles de sondes avec différentes longueurs, diamètres et géométries de pointe (Figure 21 C et D). La sélection de la sonde est faite en fonction de l'application et du volume d'échantillon à soniquer (Chemat et *al.*, 2017a).

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) a été proposée comme alternative à l'extraction conventionnelle, ce qui permet une récupération plus élevée de composés ciblés avec une consommation plus faible de solvants et / ou des propriétés d'analyse et de bioactivité plus rapide (Santos et *al.*, 2009). Une étude comparative entre UAE et l'extraction des composés aromatiques de l'*Allium sativum* (Kimbaris et *al.*, 2006) a montré la diminution significative du risque de dégradation thermique et la diminution du temps d'extraction. Roldan-Gutiérrez et *al.*, (2008) ont appliqué la méthode UAE pour l'extraction des huiles essentielles de différentes plantes aromatiques. La technique UAE a été comparée à la distillation à la vapeur d'eau et à l'extraction par l'eau subcritique. Les avantages de l'UAE sont : rapidité, faible coût, plus riche en composés oxygénés et une plus grande proportion en composés extraits.

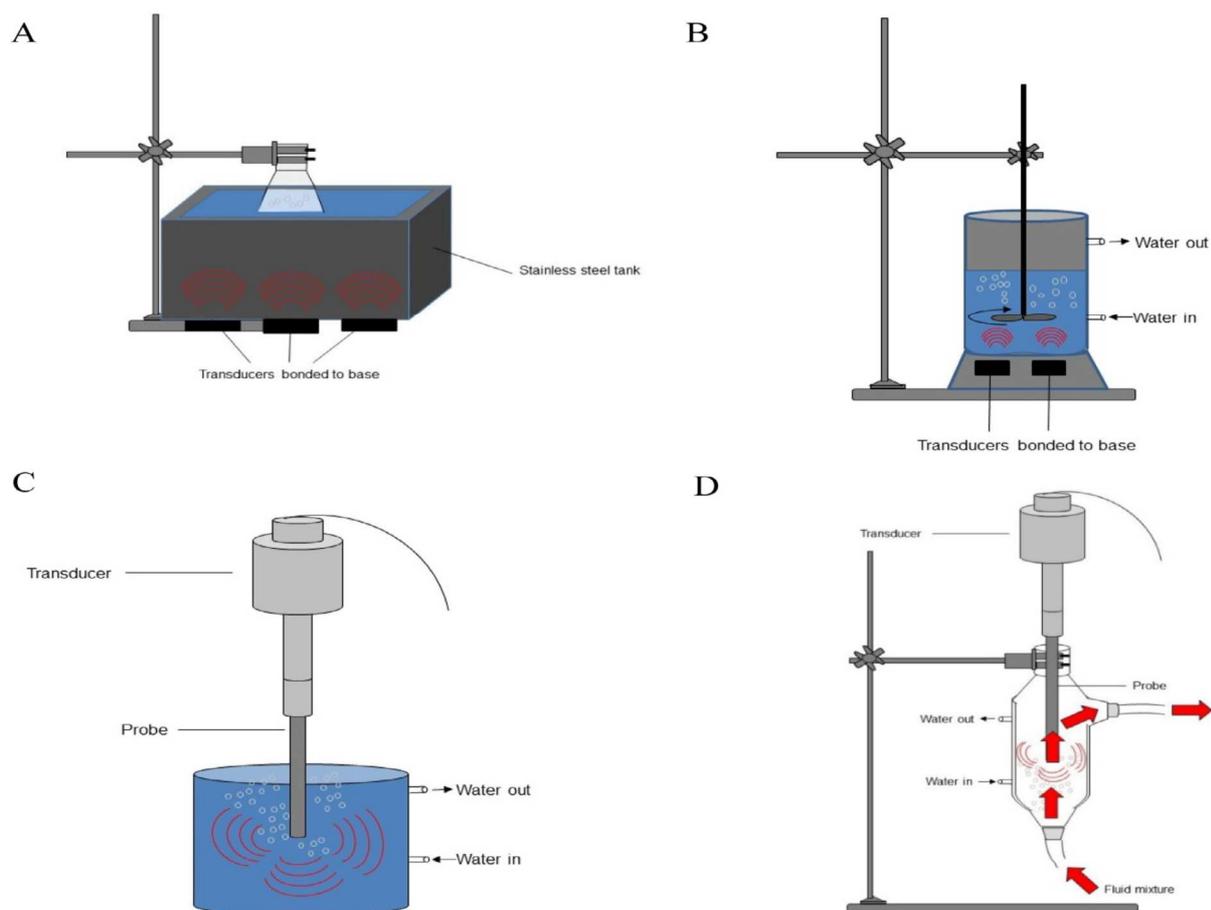


Figure 21 : Systèmes à ultrasons couramment utilisés (A: bain à ultrasons, B: réacteur à ultrasons sous agitation, C: sonde à ultrasons, D: sonication continue avec sonde à ultrasons) (Chemat et *al.*, 2017a).

L'extraction assistée par ultrasons (Priego-Capote et *al.*, 2004) est une méthode rapide, peu coûteuse, simple et efficace par rapport aux techniques conventionnelles d'extraction. Cette méthode offre de nombreux avantages en matière de rendement, de sélectivité, de temps, d'énergie et d'extraction des composés thermolabiles. Comparant la technique ultrason à d'autres techniques récentes telles que l'extraction assistée par micro-onde, UAE présente un faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération (Wang et *al.*, 2006).

1.2.4.2.6.1. Combinaison des ultrasons avec les techniques conventionnelles

1.2.2.2.6.1.1. Sono-soxhlet: extraction par soxhlet assistée aux ultrasons

Les graisses et les huiles sont traditionnellement extraites de leur matrice en utilisant l'extraction par soxhlet. Inventé en 1879, cet appareil a été largement utilisé dans divers domaines tels que les applications environnementales, denrées alimentaires et produits pharmaceutiques. Son principe est relativement facile et procède par une percolation itérative des vapeurs condensées d'un solvant bouilli, généralement du n-hexane. Néanmoins, l'extraction par soxhlet présente certains inconvénients, tels qu'une longue durée de fonctionnement (plusieurs heures) et de grands volumes de solvants. Il n'y a que peu de processus dans la littérature qui ont signalé la combinaison de l'extraction par soxhlet avec des techniques innovantes, telles que les ultrasons, pour l'accélération de l'extraction des graisses et de l'huile (Chemat et *al.*, 2017).

Les équipes de Luque de Castro et de Chemat (Luque-García et *al.*, 2004 ; Djenni et *al.*, 2012) ont développé des méthodes Sono-Soxhlet originales. L'ultrason est appliqué à l'extérieur ou à l'intérieur de la chambre d'extraction pour améliorer l'extraction de liquide solide et migration des métabolites de la matrice solide vers le solvant (Figure 22 a et b). Sono-Soxhlet combine les avantages de l'extraction effectuée avec soxhlet (extraction répétée par un nouveau solvant) et l'améliorer du transfert de masse par ultrasons (réduction du temps d'extraction). Le processus assure une extraction rapide et précise des échantillons. Ce système a également été utilisé pour l'extraction des huiles et des acides gras des graines oléagineuses, les lipides de saucisses, les graisses de fromages et les produits de boulangerie (Chemat et *al.*, 2017a).

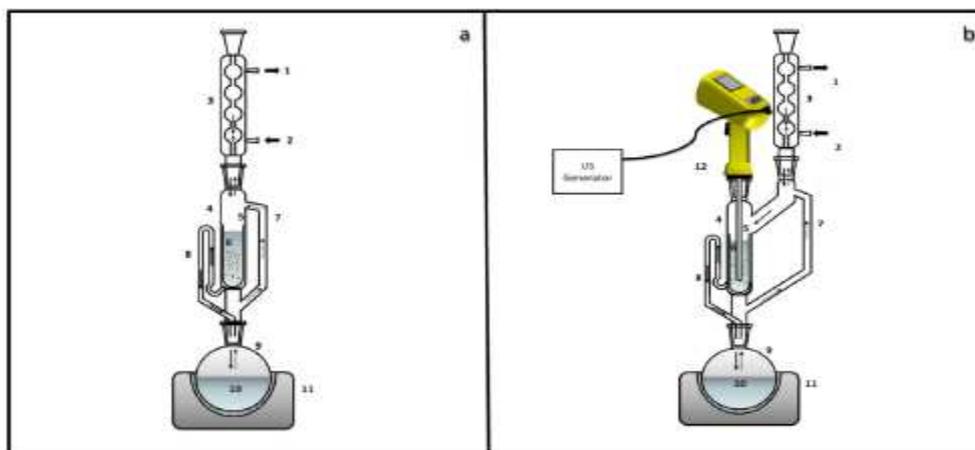


Figure 22 : (a) Soxhlet conventionnel, (b) Sono-Soxhlet (Chemat et *al.*, 2017a).

1.2.2.2.6.1.2. Sono-Clevenger: Extraction par distillation assistée aux ultrasons

La méthode traditionnelle utilisée pour isoler les composés volatils des huiles essentielles issues de matériel végétal (herbes, épices, écorces, fruits...) est la distillation alambic qui, dans les laboratoires de chimie, est aussi appelée distillation Clevenger. Cette méthode procède par la distillation itérative et ébullition de la matrice aromatique, il utilise généralement de grandes quantités d'eau et d'énergie. Le temps d'extraction peut varier de 6 à 24 heures. Pendant la distillation, les plantes odorantes exposées à l'ébullition de l'eau ou de la vapeur, libèrent leurs huiles essentielles par évaporation. La récupération de l'huile essentielle est facilitée par la distillation de deux liquides non miscibles, à savoir l'eau et l'huile essentielle. C'est basé sur le principe que, à la température d'ébullition, les pressions de vapeur sont égales à la pression ambiante. Ainsi l'ingrédient essentiel, pour lequel les points d'ébullition vont normalement de 200 à 300° C, sont évaporés à une température proche de celle de l'eau. Comme la vapeur d'eau et les vapeurs d'huile essentielle sont condensés, les deux sont collectés et séparés dans un récipient traditionnellement appelé Florentine flacon. L'huile essentielle, plus légère que l'eau flotte pendant que l'eau va au fond et est séparée (Chemat et *al.*, 2017a).

La combinaison de l'ultrason avec Clevenger ou la distillation alambic a attiré l'intérêt croissant au cours des dernières années. Cela a abouti au développement de Sono-Clevenger (Pingret et *al.*, 2013a) visant spécifiquement à obtenir des huiles essentielles issues de matières végétales. Sono-Clevenger est une originale combinaison de cavitation par ultrasons et de distillation de Clevenger à pression

atmosphérique ou sous pression réduite (Figure 23 a et b). Il offre des rendements comparables à ceux obtenus par hydrodistillation traditionnelle mais avec des temps d'extraction réduits et des rendements améliorés. Les matériaux bruts thermosensibles semblent être conservés avec cette méthode, contrairement à la distillation conventionnelle de Clevenger (Chemat et *al.*, 2017a).

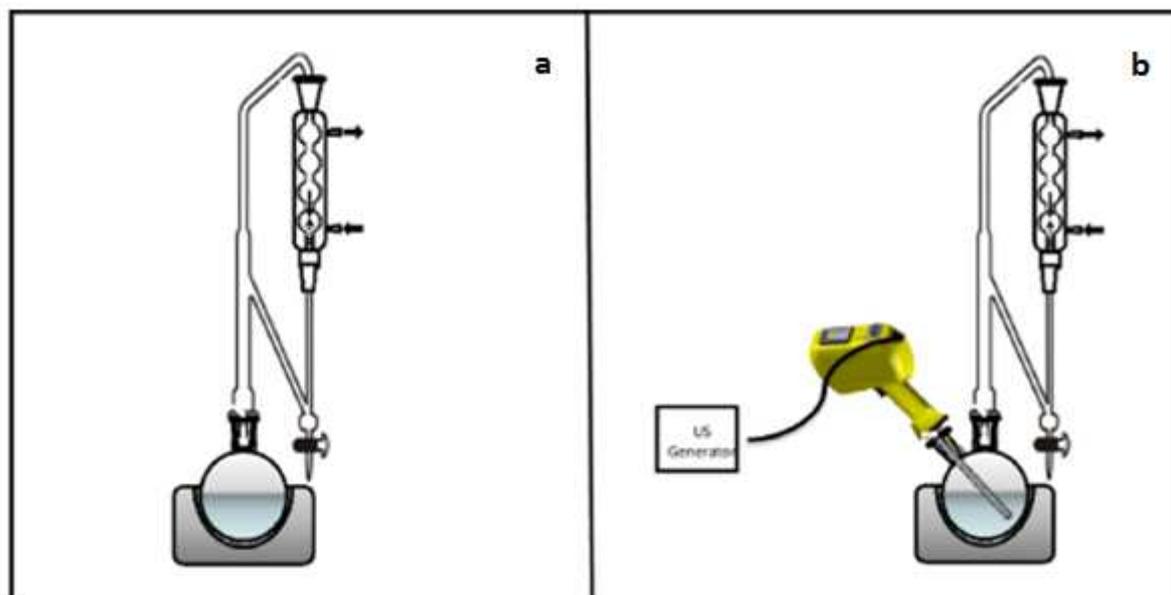


Figure 23 : (a) Clevenger classique, (b) Sono-Clevenger (Chemat et *al.*, 2017a).

1.2.4.2.6.2. Combinaison des ultrasons avec des techniques innovantes

1.2.2.2.6.2.1. Combinaison des micro-ondes et des ultrasons

La combinaison d'extraction assistée par ultrasons (EAU) et de l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) au moyen de l'irradiation (UMAE) est l'une des techniques hybrides les plus prometteuses pour des extractions rapides et efficaces. Depuis le travail de pionnier de Cravotto et *al.* (2008), plusieurs applications de l'irradiation combinée US / MW pour l'extraction des plantes sont apparus dans la littérature, le grand potentiel de cette technique hybride n'a pas encore été suffisamment exploitée (Figure 24). En raison de la haute efficacité et du très court temps d'extraction, UMAE a un grand potentiel pour l'activité de recherche académique et industrielle. C'est une solution d'extraction rentable pour une préparation rapide des échantillons et une nouvelle stratégie pour l'intensification du processus. Si, d'une part, double simultanée l'irradiation peut apporter des effets additifs ou même synergiques au phénomène d'extraction des matrices végétales,

d'autre part, les cornes non métalliques ne peuvent être utilisées qu'à puissance modérée. Comme décrit par Cravotto et Cintas (2007), les cornes de pyrex, quartz ou peek peuvent être utilisés en toute sécurité jusqu'à 90 W, au-dessus de la structure intrinsèque du matériau. L'ultrason peut dramatiquement améliorer l'extraction d'un composant cible principalement par le phénomène de cavitation. L'effet ultrasonique mécanique favorise la libération de composés solubles à partir du corps de la plante en perturbant les parois cellulaires, en améliorant le transfert de masse et en facilitant l'accès aux solvants au contenu cellulaire. Pendant ce temps, MW chauffe tout l'échantillon très rapidement induisant la migration des molécules dissoutes. L'irradiation simultanée augmente la pénétration du solvant dans la matrice, facilite la solvatisation et augmente généralement la solubilité des composés cibles. UMAE a été employé avec succès par Cravotto et Binello (2010) comme technique complémentaire d'extraction des huiles de sources végétales; à savoir, le germe de soja et une algue cultivée riche en acide docosahexaénoïque (DHA).



Figure 24 : Combinaison des micro-ondes et des ultrasons (Chemat et *al.*, 2017a).

1.2.4.2.6.2.2. Combinaison du procédé DIC et des ultrasons

Le processus de chute de pression contrôlée instantanée, abrégé DIC selon l'expression française «Détente Instantanée Contrôlée ». L'extraction DIC est basée sur des études fondamentales concernant la thermodynamique de l'instantanéité. Cela implique un traitement thermomécanique induit en soumettant le produit à une transition rapide de la pression de vapeur élevée à la dépression. L'extraction par DIC commence généralement par créer une condition de vide, suivie d'une injection de la vapeur dans le matériau pendant plusieurs secondes, puis d'une chute de

pression soudaine vers le vide (environ 5 kPa avec un taux supérieur à 0,5 MPa / s). En réduisant soudainement la pression, l'auto-vaporisation rapide de l'humidité à l'intérieur du matériau arrivera. Elle va gonfler et conduire à un changement de texture, ce qui entraîne une plus grande porosité ainsi qu'une surface spécifique accrue et résistante à la diffusion réduite. La combinaison de ces deux techniques innovantes, la cavitation (US) et la mécanique (DIC), et leur application aux processus physiques comme l'extraction semble être intéressante (Figure 25). Une combinaison de DIC (phénomènes de pression) et d'ultrasons (cavitation) a été appliquée avec succès à l'extraction avec amélioration du rendement et réduction du temps de traitement (Allaf et *al.*, 2013).



Figure 25 : Combinaison du procédé DIC et des ultrasons (Chemat et *al.*, 2017a).

1.2.4.2.6.2.3. Combinaison d'extraction par ultrasons et par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique (SFE) est une technique d'extraction relativement récente basée sur le pouvoir accru du solvant des fluides au-dessus de leur point critique. Son utilité dans les extractions est due à la combinaison de propriété de transfert de masse du type gazeux et de caractéristiques de solvation avec des coefficients de diffusion, qui sont plus élevés que ceux d'un liquide. La majorité des études SFE se sont axé sur l'utilisation du CO₂ car il est non toxique, ininflammable, facilement éliminé après une extraction et doté d'une capacité de solvation des molécules non polaires. Les principaux avantages de SFE comprennent les effets de pré-concentration, la propreté et la sécurité, le rendement

plus élevés, rapidité et simplicité. Les inconvénients de SFE est le besoin de matériel plus coûteux et de la difficulté d'extraire des molécules polaires sans ajouter de modificateurs au CO₂. En effet, les ultrasons permettent l'extraction d'une grande variété de composés utilisant des solvants polaires ou non polaires avec des équipements beaucoup plus simples. Lorsqu'ils sont combinés avec l'extraction de fluide supercritique, les ultrasons améliorent le transfert de masse des espèces d'intérêt de la phase solide au solvant utilisé pour l'extraction (Figure 26) (Balachandran et *al.*, 2006).



Figure 26 : Combinaison d'extraction par ultrasons et par fluide supercritique (Chemat et *al.*, 2017a).

1.2.4.2.6.2.4. Combinaison d'extraction par ultrasons et par extrusion

Pour la production de sucre, de vin et de jus de fruits, ou la déshydratation des déchets biologiques et dans les industries des huiles végétales, l'extraction est réalisée par pressage et extrusion. La phase de pressage est composée d'une étape de compression pour exsuder un fluide contenant les métabolites cibles de la matrice poreuse. Les cellules de fruits et les tissus végétaux sont entourés de membranes et fermés par une paroi cellulaire intégrée dans une lamelle médiane. Les composants muraux rigides empêchent les dommages faciles des membranes, et donc limiter l'extraction par pressage. La combinaison de pressage avec d'autres processus qui peuvent être étudiés dans une recherche contexte, afin d'obtenir les meilleurs extraits (qualité et quantité en fonction du temps) au stade de l'intensification du

procédé (figure 27). En général, la force d'extrusion moyenne diminue avec une augmentation en amplitude ultrasonore conduisant à une meilleure extrudât (Chen et al., 2010; Mousavi et al., 2007).

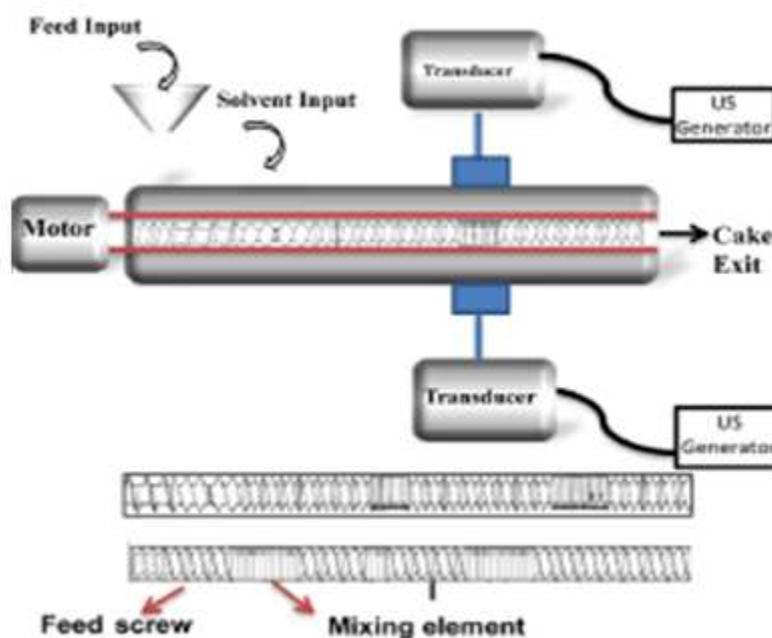


Figure 27 : Combinaison d'extraction par ultrasons et par extrusion (Chemat et al., 2017a).

I.2.5. Méthodes d'analyse des huiles essentielles

Vu l'importance industrielle des HEs, une analyse de leurs propriétés physiques et composition chimique est nécessaire pour les caractériser et les décrire. Les HEs sont généralement liquides à température ambiante et ont une odeur aromatique souvent due à un ou plusieurs composés. Ceux-ci ont souvent un carbone asymétrique. Les deux énantiomères ont alors des odeurs différentes (Bauer et al., 1990 ; Boelens & van Gemert, 1993). Les HEs sont rarement colorées quand elles sont fraîches. Leur densité est le plus souvent inférieure à celle de l'eau (à l'exception de quelques essences comme celles du sassafras, du girofle et de la cannelle). Elles ont un indice de réfraction élevé et sont généralement douées de pouvoir rotatoire. Les HEs sont très peu solubles dans l'eau mais solubles dans l'alcool, l'éther, la plupart des solvants organiques et les huiles fixes (Paris & Moyse, 1976 ; Bruneton, 1993).

La détermination de la composition chimique des HEs est généralement réalisée par la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse ou l'infrarouge (GC/MS ou GC/IRFT) sur deux colonnes de

polarité différente (Hedges and *al.*, 1991). Les composés sont alors identifiés d'après leur indice de rétention et leur spectre de masse. Suite aux travaux innovants de Formáček et *al.*, (1982), une troisième méthode consiste à identifier les composants individuels d'une HE sur la base d'un spectre RMN C₁₃ de l'HE, sans séparation préalable de ses constituants.

Pour permettre la séparation de deux énantiomères, la GC chirale est la méthode généralement utilisée. Différentes approches peuvent être distinguées: (a) l'injection directe du mélange dans la colonne chirale (l'identification nécessite souvent un système MS pour confirmer l'identité des pics), (b) la séparation sur colonne chirale des deux composés énantiomères purifiés au préalable par une technique chromatographique achirale (Casabianca et *al.*, 1994) et (c) l'utilisation de la chromatographie gazeuse multidimensionnelle (MDGC) qui permet l'injection directe de l'échantillon dans le chromatographe; la première colonne achirale conduit à une pré-séparation des composés, qui sont transférés vers la deuxième colonne chirale en utilisant la technique coupe-cœur (heart-cutting) (Bicchi et *al.*, 1990).

Les propriétés physiques et la composition chimique d'une HE sont déterminées dès leur obtention. Ces données seront utilisées pour authentifier une HE en vue de son exploitation industrielle.

I.3. LES OBJECTIFS DE LA THESE.

Les besoins accrus d'utilisation des huiles essentielles dans de nombreuses et diverses industries sont tellement massifs et croissants qu'il est indispensable d'agir en vue d'optimiser les procédés actuels de production. Et comme pour tout procédé industriel faisant face à cette problématique, l'optimisation cible essentiellement l'augmentation du rendement d'extraction, de la qualité des produits obtenus et la diminution des coûts de production. Dans ce contexte, les divers procédés d'extraction (assistée par ultrasons, assistée par micro-onde, par fluide supercritiques) sont très prometteurs en matière de : réduction de temps d'extraction, de solvant utilisé et de l'énergie consommée. De plus, l'amélioration, voire même l'augmentation et de la qualité des huiles essentielles et des arômes, pourraient être assurées par les nouvelles techniques et procédés innovants, tout en respectant leur compatibilité avec l'environnement.

Parmi les plantes aromatiques renommées, notre intérêt est porté sur la lavande *Lavandula stoechas* L. dont les huiles essentielles sont largement utilisées dans différents domaines, mais n'ayant pas fait assez d'études d'optimisation de son procédé d'extraction. Notre travail donc s'inscrit dans cette problématique et ce, en appliquant les ultrasons comme prétraitement préalable au procédé conventionnel d'extraction ou hydrodistillation.

Cette thèse intitulée : « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant d'huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. du Nord de l'Algérie, extraites par hydrodistillation et ultrasons », a pour objectifs les quatre points suivants :

- l'extraction des huiles essentielles de quatre populations de *L. stoechas* du Nord de l'Algérie par application des ultrasons sur la matière végétale, comme prétraitement au préalable à l'hydrodistillation, laquelle sera utilisée comme méthode de référence.
- la contribution à la connaissance des chémotypes issues de l'espèce *L. stoechas* et ce à travers la caractérisation chimique de leurs huiles essentielles.
- l'évaluation de l'impact du procédé d'extraction sur la composition chimique des quatre populations Algériennes de lavande.
- L'évaluation de l'impact de la méthode d'extraction sur le potentiel antioxydant et antimicrobien des HEs des quatre populations Algériennes de lavande



CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL VEGETAL

Les parties aériennes de *L. stoechas* (Tige + feuilles + inflorescences) ont été collectées au maximum de la floraison en printemps 2014 (allant de mois de mars au mois d'avril) à partir de populations sauvages situées en Nord d'Algérie. Au total, quatre populations ont été collectées au hasard (Tableau 4, Figure 28). L'identification botanique de l'espèce a été réalisée à l'herbier de département de botanique, à l'Ecole National d'Agronomie (ENA) d'Alger, ou des spécimens ont été conservés.

Tableau 4 : Sites de collectes et principales caractéristiques écologiques et géographiques des quatre populations de *L. stoechas*.

N°	Site de Collecte	Localité	Pluviométrie (mm/an)	Coordonnées géographiques			
				Latitude N	Longitude E	Altitude (m)	Pente (%)
01	Keddara	Boudouaou	De 800 à 900	36°39'00"	3°24'35"	644	> 15
02	El-kahla	Larbaatache	De 800 à 900	36°33'27"	3°21'23"	861	> 12
03	Kodiat	Taouarga	De 900 à 1000	36°47'39"	3°58'10"	536	> 12
04	Adekar	Bejaïa	De 1000 à 1200	36°42'44"	4°34'20"	866	> 15



Figure 28 : Origine géographique des 04 populations Algériennes de *L. stoechas* étudiées.

II.2. SOUCHES MICROBIENNES

Une sélection de 04 bactéries pathogènes et de 04 champignons (Tableau 5) a été utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des HEs des populations de *L.stoechas*. Toutes ces souches microbiennes appartiennent à la collection du Laboratoire du Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger (Algérie).

Tableau 5 : Souches microbiennes testées.

Nature de l'organisme	Nom scientifique	Famille/ Coloration de Gram (Pour les bactéries)	Références
Bactérie	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillaceae / Gram +	ATCC 6633
	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline	Staphylococcaceae / Gram+	MRSA 639c
	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae / Gram-	ATCC 10536
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae / Gram-	CIPA1 (Collection de l'institut Pasteur d'Alger)
Moisissure	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	Umbelopsidaceae	NRRL 1829
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Trichocomaceae	M333
	<i>Fusarium culmorum</i>	Nectriaceae	Fc1
Levure	<i>Candida albicans</i>	Saccharomycetaceae	M3

II.3. EXTRACTION ET CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES

II.3.1. Extraction par Hydrodistillation (HD)

La matière végétale (les parties aériennes fleuries) des populations de *L.stoechas* est légèrement rincée avec de l'eau pour éliminer tout débris de terre et de poussière, puis séchée à l'ombre à température ambiante, elle est ensuite broyée et conservée dans des sacs en papier propres. Dans le montage à hydrodistillation (Clevenger modifié), (50g) de la poudre végétale est introduite dans un ballon en verre de 1000 ml bicol, rempli à environ 2/3 d'eau distillée (600 ml), relié à un réfrigérant incliné. La température dans le ballon contenant l'eau et la plante est maintenue tout au long de l'extraction à 100°C, au moyen d'un thermomètre placé

dans l'un des cols du ballon et l'autre restant est utilisé pour l'ajout de l'eau distillée en cas de besoin.

L'ensemble (Eau distillée + poudre végétale) est porté à ébullition par un chauffe-ballon pour générer une vapeur d'eau saturée en composés volatiles. Le réfrigérant sert à condenser la vapeur en distillat (Hydrolat) et l'extraction débute lorsque les premières gouttes tombent dans le collecteur et se poursuit pendant 3 heures. Le distillat s'écoule goutte à goutte et est recueilli dans une ampoule à décanter de 250 ml. La séparation entre la phase organique (HE) et la phase aqueuse (l'eau aromatique) est faite en rajoutant l'éther diéthylique. Enfin, la phase organique est récupérée et séchée avec du Sulfate Anhydre de Sodium ($\text{Na}_2 \text{SO}_4$), puis l'éther diéthylique est complètement évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor). Les HEs obtenues sont pesées et conservées à 4°C dans des piluliers en verre opaque. Les extractions ont été effectuées trois fois, et les valeurs ont été reportées en tant que moyenne \pm SD.

II.3.2. Calcul du rendement en huile essentiel

Le rendement (R) des extractions des HEs de *L.stoechas*, exprimé en pourcentage, a été défini comme étant le rapport entre la masse d'HE recueillie après hydrodistillation (m_{HE}) et la quantité de la matière végétale utilisée, selon la formule suivante :

$$R = \frac{m_{\text{HE}}}{\text{Masse de la prise d'essai (Matière végétale)}} \times 100$$

II.3.3. Extraction par prétraitement aux ultrasons (US-HD)

Des ultrasons ont été appliqués sur la matière végétale comme prétraitement avant hydrodistillation. 50 g de la poudre végétale ont été mélangés avec de l'eau distillée (600 ml) dans un flacon d'Erlenmeyer. Le mélange a été soumis à des ultrasons à différents temps : 10, 20, 30, 45 et 60 min. Une tige en verre a été utilisée pour l'homogénéisation du mélange. Les traitements résultant après différents temps ont été laissés au repos pendant 30 min, puis hydrodistillés pendant 90 min. Pour l'application d'ondes ultrasonores, un bain de nettoyage à ultrasons (système

d'impulsions 270, Italie, 26 kHz, 150 W) a été utilisé (Figure 29). Afin d'assurer une comparaison rigoureuse, la même verrerie et les mêmes conditions de fonctionnement ont été utilisées pour l'hydrodistillation conventionnelle. La procédure a été effectuée au moins trois fois, et les valeurs ont été reportées en tant que moyenne \pm SD.



Figure 29 : prétraitement de *L. stoechas* dans un bain à ultrasons.

II.3.4. Caractérisation organoleptique

Les caractéristiques organoleptiques portent sur l'étude de l'aspect, la couleur et l'odeur des HEs des populations de *L.stoechas* obtenues par hydrodistillation et par prétraitement aux ultrasons.

II.3.5. Détermination de la densité relative et de l'indice de réfraction

La densité relative (d) d'une HE est le rapport entre une masse (g) d'un certain volume d'HE, quant à l'indice de réfraction, il s'agit d'une indication numérique qui sert à exprimer le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et la vitesse de la lumière dans le milieu de propagation (Kabera *et al.*, 2005). L'indice de réfraction (I) est mesuré par un réfractomètre dans lequel on introduit quelques gouttes d'eau distillée considérée comme étalon sur un prisme. L'appareil est réglé à 1,334. Ces gouttes sont essuyées et remplacées par quelques gouttes de l'HE puis on effectue

la lecture. Les indices de réfraction obtenus à température ambiante sont ramenés à 20°C par la formule suivante :

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C})$$

Où :

I_{20} : indice de réfraction à 20°C.

I_t : indice de réfraction à la température ambiante ou de mesure.

T : Température ambiante ou de mesure.

II.3.6. Analyse par GC/MS des huiles essentielles

L'analyse par CPG/MS des extraits obtenus par hydrodistillation et par prétraitement aux ultrasons au meilleur temps donnant le meilleur rendement pour chaque population étudiée, a été effectué en utilisant un CPG (Hewlett Packard Agilent6890N piloté par Chemstation (NIST002)) couplé à la spectrométrie de masse modèle Agilent 5973. La colonne capillaire est de type HP5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25µm). 1 µl de l'échantillon a été injecté en mode Split 1/30. La programmation de la température est de 50°C pendant 0 min ; 3°C/min jusqu'à 290°C. La température de l'injecteur a été fixée à 250°C. Le gaz vecteur étant l'Hélium (1ml/min). La température du spectromètre de la masse est d'interface (280°C), source (230°C), quadripôle (150°C). L'énergie d'ionisation est de 70 ev.

II.3.7. Identification des composés volatiles

Les indices de rétention (IR) des différents constituants des HEs ont été calculés en utilisant les temps de rétention (TR) des alcanes d'un mélange de n-alcanes (C₈-C₂₁) analysé dans les mêmes conditions chromatographiques (Van den Dool *et al.*, 1963) selon l'équation suivante :

$$IR = 100 \times Z + 100 \times n [(t_{RS} - t_{RZ}) / (t_{R(Z+n)} - t_{RZ})]$$

Où :

t_{RS} : temps de rétention absolu du soluté étudié ;

t_{RZ} : temps de rétention absolu de l'alcane à Z atomes de carbone qui précède le soluté ;

$t_{R(Z+n)}$: temps de rétention absolu de l'alcane à (Z+n) atomes de carbone qui suit le soluté ;

n : Différence du nombre d'atome de carbone entre les deux alcanes (Généralement n=1).

L'identification des composés volatiles des HEs a été effectuée en comparant les spectres de masse (SM) (Annexe) obtenus avec ceux de la base de données électronique NIST 05. Cette identification a été également confirmée en comparant les (IR) obtenus avec les (IR) précédemment publié par Adams (2007).

II.3.8. Analyse par GC/FID des huiles essentielles

L'analyse chromatographique des HEs de *L.stoechas* obtenues par hydrodistillation et par prétraitement aux ultrasons de la population de Kodiac a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Chrompack CP 9002, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB-5 de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25 μ m d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) réglé à 280°C et alimenté par un mélange de gaz H₂/air et d'un injecteur split splitless réglé à 250°C. Le gaz vecteur est l'azote à 1 ml/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite de 1/50, débit de fuite 66 ml/min). La température de la colonne est programmée de 50°C (3mn) à 250°C à raison de 2°C/min, puis est maintenue à 250°C pendant 10 min.

II.4. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES

L'activité antioxydante a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par les HEs de *L.stoechas* obtenues par HD et US-HD du meilleur temps de prétraitement donnant le meilleur rendement, il s'agit de la méthode la plus largement utilisée pour étudier l'activité antioxydante des drogues végétales. Le piégeage des radicaux libres de DPPH provoque un changement de couleur de la solution initial du violet foncé au jaune suite à la réduction du DPPH en DPPH-H (diphényl-picrylhydrazine). Suivant Thakral *et al.* (2010), le DPPH est solubilisé dans de l'éthanol pour en avoir une solution de 0,1Mm. 1ml de cette solution est ajouté à 2ml de l'extrait en solution dans de

l'éthanol à différentes concentrations (200 ; 400 ; 600 ; 800 et 1000 µg/ml). Après agitation, les tubes sont placés pendant 30 mn à l'obscurité à température ambiante. La lecture est effectuée par un spectrophotomètre (Modèle : T60U-UV visible, United Kingdom) pour la mesure de l'absorbance à 517nm. Le contrôle négatif est composé de 1ml de la solution DPPH (0,1 mM) et de 2ml d'éthanol. Le contrôle positif est représenté par l'acide ascorbique. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical libre DPPH est calculé par la formule suivante :

$$I \% = [(A_{blanc} - A_{\text{échantillon}})/A_{blanc}] \times 100.$$

Où:

A_{blanc} : Absorbance du contrôle négatif contenant tous les réactifs sauf l'HE ;

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon contenant une dose d'HE a testée.

La valeur de la concentration inhibitrice IC₅₀ représente la dose de l'HE qui cause la neutralisation de 50% des radicaux de DPPH. L'IC₅₀ utilisée comme une estimation de l'activité antioxydante par DPPH, est obtenue par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations (C). Tous les tests ont été effectués en triplicata, et les valeurs d'IC₅₀ ont été reportées en tant que moyenne ± SD.

II.5. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES HUILES ESSENTIELLES

Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour les microorganismes teste ont été déterminées *in vitro* en utilisant la méthode conventionnelle de dilution d'agar (Sökmen *et al.*, 2004). Des dilutions en série des HEs de *L.stoechas* obtenues par HD et US-HD du meilleur temps de prétraitement donnant le meilleur rendement, ont été préparées avec la gélose nutritive stérile, fondue et enrichie avec la gélose (10g/l) et avec le Tween-80 (0.5%, v/v) pour couvrir une gamme de concentration allant de 0.14 à 18mg/ml. Les solutions de gélose nutritive obtenues ont été immédiatement coulées dans des boites de Pétri après agitation. Ces boites ont été mises à sécher à température ambiante puis inoculées par spot de 1µl de chaque suspension de microorganisme cible en deux répétitions. Les suspensions de microorganismes ont été préparées à partir de cultures de 24h pour les bactéries et de 72h pour les champignons et ont été ajustées à environ 10⁶

CFU/ml. Le même test a été effectué sans HE comme témoin négatif. Les boîtes inoculées ont été incubées à 30°C pendant 24h pour les bactéries, et 48h pour les champignons. Après incubation, l'observation de la gamme permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance des microorganismes.

II.6. ANALYSE STATISTIQUE

Les résultats des rendements des extractions par hydrodistillation et par les différents temps de prétraitement par les ultrasons ainsi que les résultats des activités biologiques ont été exprimés par moyenne \pm SD. Les comparaisons statistiques ont été faites au moyen d'analyse de variance (ANOVA) suivi par le test d'analyse par paires Tukey's ou la valeur de $p < 0.05$ a été considérée statistiquement significative.



CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. EXTRACTION DES HES DES 04 POPULATIONS DE *L.stoechas* OBTENUES PAR HD ET PAR US-HD

III.1.1. Introduction

Les huiles essentielles sont des extraits botaniques de divers matériaux des végétaux, et ne proviennent pas seulement des fleurs, mais des herbes, des arbres et de divers autres organes des plantes. On estime que le nombre global de plantes est de l'ordre de 300 000 et environ 10% d'entre elles contiennent des huiles essentielles et pourraient être utilisées comme sources de production (Husnu et *al.*, 2010). Leurs extraits sont formés par combinaison de divers et de complexes mélanges volatils de composés chimiques, avec prédominance de terpènes associés à des aldéhydes, des alcools et des cétones qui se sont accumulés dans diverses structures de la plante (Tajidin et *al.*, 2012). Dans l'industrie, les huiles essentielles sont généralement extraites de feuilles fraîches ou partiellement séchées en utilisant diverses méthodes d'extraction et la plus courante est l'hydrodistillation. L'utilisation d'extraits de plantes médicinales fait partie d'un marché concurrentiel, qui comprend les marchés de la pharmacie, de l'alimentation, des cosmétiques et de la parfumerie, principalement pour utiliser leur substance active (Husnu et *al.*, 2010).

Conventionnellement, l'identification des constituants des mélanges naturels peut être réalisée à l'aide de différentes techniques analytiques, en fonction de l'objectif fixé, de la complexité du mélange et de la nature des constituants. L'analyse des HEs est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. L'approche la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la chromatographie gazeuse permettant l'individualisation des constituants, avec une technique de visualisation, généralement la spectrométrie de masse, permettant l'identification des constituants par comparaison des données de masses des produits de fragmentation avec celles de produits de référence ou celles contenues dans des banques de spectres. Les données de spectres de masse sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention des produits d'intérêt et de ceux d'une gamme étalon d'alcanes. Des molécules structurellement proches peuvent en effet présenter des spectres de masse similaires et un gradient chromatographique ne peut pas séparer l'ensemble des substances d'un mélange. La probabilité que deux substances aient le même indice de rétention et le même

spectre de masse est cependant rare (sauf pour des stéréo-isomères). La combinaison de ces deux informations est donc nécessaire pour assoir une identification de composé.

Les méthodes courantes pour l'extraction des huiles essentielles des plantes médicinales, y compris pour *L.stoechas*, sont l'hydrodistillation (HD), la distillation à la vapeur, la distillation à la vapeur et à l'eau, la macération, la distillation empyreumatique (ou destructive) et l'expression (Dhobi et *al.*, 2009). Il est prouvé à travers un certain nombre d'études, (Dhobi et *al.*, 2009 ; Sibel et *al.*, 2012), que la qualité de l'huile essentielle dépend principalement de ses constituants qui sont principalement influencés par leurs procédures d'extraction. En revanche, ces méthodes courantes peuvent induire une dégradation thermique, une hydrolyse et une solubilisation de certains constituants aromatiques dans l'eau. Pour pallier ce genre d'inconvénients, des méthodes avancées et améliorées comme l'extraction assistée par micro-ondes (Wang et *al.*, 2010), l'hydrodistillation ohmique (Mohsen et *al.*, 2012), l'extraction sous-critique d'eau (Mohammad et *al.*, 2007) et l'extraction assistée par ultrasons (Da porto et *al.*, 2009), ont été utilisés pour raccourcir le temps d'extraction, améliorer le rendement et le produit d'extraction et réduire les coûts d'exploitation.

Les analyses entreprises ici ont eu pour but l'étude de l'effet du temps de prétraitement par les ultrasons au préalable à l'hydrodistillation utilisée comme méthode de référence, sur les HEs des parties aériennes fleuries de *L. stoechas* récoltées sur quatre populations situées au Nord de l'Algérie (Tableau 4, Figure 25). Les extraits obtenus ont été soumis à une étude du rendement ainsi qu'à des analyses organoleptiques, physico-chimiques et compositionnelles par GC/MS et GC/ FID.

III.1.2. Résultats

III.1.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Les extractions par hydrodistillation conventionnelle (HD) et par prétraitement aux ultrasons avant hydrodistillation (US-HD) à différents temps : 10 ; 20 ; 30 ; 45 et 60 min, des parties aériennes fleuries de *L. stoechas* ont été réalisées dans des conditions opératoires strictement identiques sur les 04 populations Algériennes sauvages. Ces extractions ont fourni des HEs de *L. stoechas* ayant des colorations, des aspects à température ambiante et des odeurs variables (Figure 30, tableau 6). Franchomme et *al.* (2001) indiquent dans leur livre d'aromathérapie exactement, que les HEs le *L.stoechas* obtenues par distillation sont dotées d'un aspect liquide limpide mobile, d'une couleur jaune orangé et d'une odeur intense camphrée.

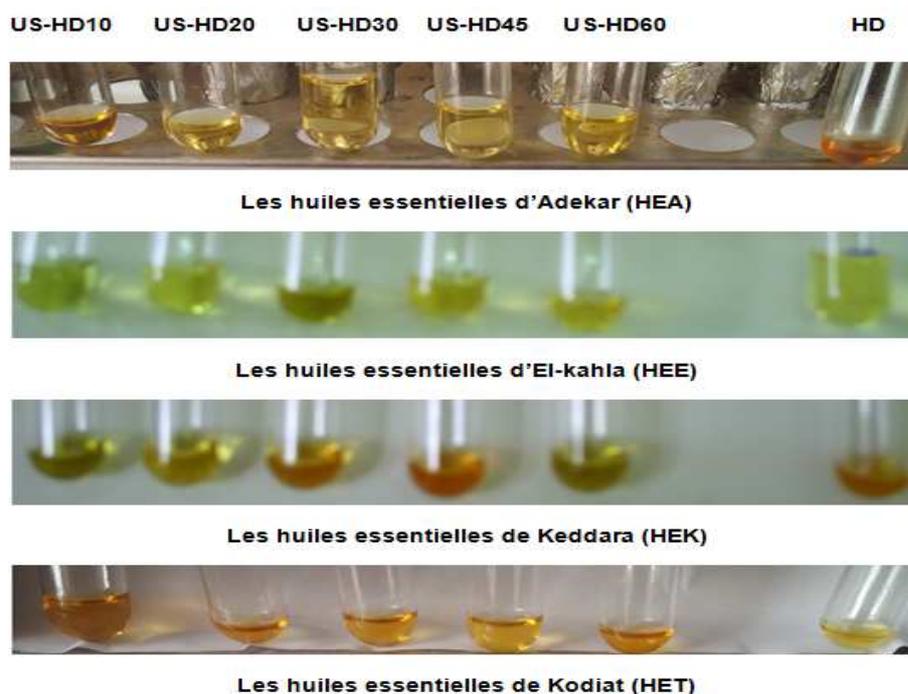


Figure 30 : Les différentes colorations des huiles essentielles de *L.stoechas* des 04 populations Algériennes obtenues par Hydrodistillation et par prétraitement aux ultrasons à différents temps.

Nos extraits obtenus par HD et US-HD d'un même échantillon présentent des aspects, des couleurs et des odeurs différents. En effet, les HEA obtenues par HD ont une couleur foncée qui vire au jaune roux avec une odeur camphrée menthée très puissante, alors que les extraits obtenus par US-HD ont une couleur qui est plutôt claire, elle varie d'un jaune doré avec une odeur camphrée menthée puissante pour HEA/US-HD10 à un jaune clair avec une odeur plutôt moins intense pour le

reste des extraits obtenus par US. Tous les extraits de cet échantillon présentent le même aspect. Les HEE obtenues avec les deux méthodes d'extraction ont des caractéristiques organoleptiques plus au moins identiques, sauf pour HEE/US-HD30 qui présente une couleur plus foncée avec une odeur plus puissante et un aspect moins limpide par rapport aux autres extraits. Les HEK montrent des variations de couleur plus importantes, elles varient d'un jaune verdâtre foncé, jaune verdâtre clair, un jaune doré et un jaune roux pour les extraits obtenus par US-HD10, US-HD20 avec US-HD60, US-HD30 et US-HD45 avec HD. Les aspects et les odeurs de ces extraits sont identiques sauf pour US-HD/30 qui est toujours moins limpide. Les deux techniques d'extraction donnent les mêmes caractéristiques organoleptiques pour les HET obtenues par HD et US-HD, sauf pour l'extrait obtenu par HD qui présente une couleur plus claire par rapport aux extraits obtenus par US-HD.

Tableau 6 : Couleur, odeur et aspect à température ambiante des huiles essentielles des 04 populations de *L.stoechas* obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) à différents temps.

		Adekar	Ei-kahla	Keddara	Kodiat
US-HD10	Aspect	Liquide, mobile	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile
	Couleur	Jaune doré	Jaune verdâtre	Jaune verdâtre foncé	Jaune doré
	Odeur	Camphrée-menthée puissante	Camphrée puissante	Camphrée très puissante	Camphrée-menthée très puissante
US-HD20	Aspect	Liquide, mobile	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile
	Couleur	Jaune claire	Jaune verdâtre	Jaune verdâtre	Jaune doré
	Odeur	Camphrée-menthée	Camphrée puissante	Camphrée très puissante	Camphrée-menthée très puissante
US-HD30	Aspect	Liquide, mobile	Liquide, mobile	Liquide, mobile	Liquide, mobile
	Couleur	Jaune claire	Jaune verdâtre foncée	Jaune doré	Jaune doré
	Odeur	Camphrée-menthée	Camphrée très puissante	Camphrée-menthée très puissante	Camphrée-menthée très puissante
US-HD45	Aspect	Liquide, mobile	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile
	Couleur	Jaune claire	Jaune verdâtre	Jaune roux	Jaune doré
	Odeur	Camphrée-menthée	Camphrée puissante	Camphrée-menthée très puissante	Camphrée-menthée très puissante
US-HD60	Aspect	Liquide, mobile	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile
	Couleur	Jaune claire	Jaune verdâtre	Jaune verdâtre	Jaune doré
	Odeur	Camphrée-menthée	Camphrée puissante	Camphrée très puissante	Camphrée-menthée très puissante
HD	Aspect	Liquide, mobile	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile, limpide	Liquide, mobile
	Couleur	Jaune roux	Jaune verdâtre	Jaune roux	Jaune claire
	Odeur	Camphrée-menthée très puissante	Camphrée puissante	Camphrée-menthée très puissante	Camphrée-menthée très puissante

III.1.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

La densité relative et l'indice de réfraction sont parmi les paramètres physico-chimiques les plus étudiés pour visualiser la qualité des huiles essentielles. L'indice de réfraction est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Cette pureté est définie dans des intervalles considérés comme acceptables. Selon Franchomme et al. (2001), la densité relative et l'indice de réfraction (à 20°C) de *Lavandula stoechas* varient de 0.922 à 0.955 et de 1.465 à 1.475, respectivement. Nos résultats (Tableau 7) montrent que les HEs obtenues par HD ont une densité relative qui varie de 0.933 à 0.956 et un indice de réfraction qui varie de 1.474 à 1.480.

Tableau 7 : Densité relative et indice de réfraction des huiles essentielles des 04 populations de *L.stoechas* obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons US-HD) à différents temps.

Population	Extrait	Densité relative (Moyenne±SD)	Indice de réfraction (Moyenne±SD)
El kahla	HD	(0.956±0.001)	(1.4803±0.001)
	US-HD60	(0.943±0.000)	(1.4758±0.001)
	US-HD45	(0.914±0.002)	(1.4825±0.000)
	US-HD30	(0.930±0.000)	(1.4830±0.000)
	US-HD20	(0.930±0.000)	(1.4783±0.000)
	US-HD10	(0.917±0.001)	(1.4732±0.001)
Keddara	HD	(0.943±0.001)	(1.4742±0.001)
	US-HD60	(0.931±0.001)	(1.4767±0.000)
	US-HD45	(0.935±0.001)	(1.4762±0.001)
	US-HD30	(0.940±0.000)	(1.4793±0.000)
	US-HD20	(0.937±0.001)	(1.4707±0.001)
	US-HD10	(0.928±0.001)	(1.4712±0.001)
Adekar	HD	0.933±0.000)	(1.4762±0.001)
	US-HD60	(0.929±0.000)	(1.4737±0.002)
	US-HD45	0.939±0.0000)	(1.4735±0.001)
	US-HD30	(0.945±0.000)	(1.4723±0.001)
	US-HD20	(0.929±0.000)	(1.4708±0.001)
	US-HD10	(0.922±0.001)	(1.4698±0.000)
Kodiat	HD	(0.946±0.000)	(1.4763±0.001)
	US-HD60	(0.917±0.001)	(1.4660±0.001)
	US-HD45	(0.959±0.001)	1.4743±0.000)
	US-HD30	(0.924±0.000)	(1.4772±0.000)
	US-HD 20	(0.946±0.000)	(1.4727±0.000)
	US-HD10	(0.924±0.000)	(1.4728±0.001)

Quant aux HEA, HEE, HEK et HET obtenues par US-HD, la densité relative est comprise entre 0.922-0.945, 0.914-0.943, 0.928-0.940 et 0.917-0.959 avec des indices de réfraction compris entre 1.469-1.476, 1.473-1.483, 1.470-1.476 et 1.466-1.477, respectivement. Les résultats d'analyse des extraits obtenus par HD et US-HD se trouvent dans des intervalles très proches voire même identiques à ceux obtenues par Franchomme et *al.* (2001).

III.1.2.3. Rendement en huiles essentielles de *L.stoechas*

Les extractions par hydrodistillation conventionnelle et par prétraitement aux ultrasons (US) à différents temps : 10 ; 20 ; 30 ; 45 et 60 min des parties aériennes fleuries de *L. stoechas* ont été optimisées puis réalisées dans des conditions opératoires strictement identiques sur 04 populations algériennes sauvages. Les rendements en HEs des populations de *L. stoechas* sont exposés dans le tableau 8 et la figure 31. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD des rendements d'extraction obtenus sur 3 extractions indépendantes. Les 04 populations étudiées ont présenté des rendements variables, allant de 0.50 % à 1.17 % pour l'extraction par HD durant 180 min et de 0.44 % à 1.60 % pour l'extraction par prétraitement aux différents temps (10 ; 20 ; 30 ; 45 et 60 min) par les US suivi de 90 min d'HD.

Il est à noter que les meilleurs rendements (1.60 et 1.59 %) ont été obtenus après 10 min de prétraitement par les ultrasons suivis de 90 min d'HD à partir des populations de Kodiat et d'Adekar, respectivement. Concernant Keddara et El-kahla, les meilleurs rendements (0.87 % et 1.03 %) ont été obtenus après 45 et 60 min de prétraitement par les ultrasons, respectivement. Les meilleurs rendements obtenus par US-HD ont montré des différences significatives ($p < 0.05$) par rapport à ceux obtenus par HD. La figure 31 montre également l'influence du temps de prétraitement par ultrasons sur le rendement en huiles essentielles de *L. stoechas* pour chaque région de récolte. Les échantillons ont montré des profils de rendement d'extraction différents. *L. stoechas* d'Adekar a atteint un rendement maximal de $1.59 \pm 0.03\%$ à seulement 10 min de prétraitement aux ultrasons, suivi d'une diminution significative ($p < 0.05$) du rendement à 20 min ($1.33 \pm 0.04\%$) et 30 min ($0.94 \pm 0.03\%$) de prétraitement. Une amélioration significative ($p < 0.05$) du rendement en huile en prolongeant le temps de prétraitement aux ultrasons jusqu'à 45 min ($1.08 \pm 0.00\%$) et 60 min ($1.07 \pm 0.01\%$). Dans les échantillons de keddara, le rendement

d'extraction des HEs a été amélioré en augmentant le temps de prétraitement aux ultrasons de 10 min à 45 min avec ($0.44 \pm 0.03\%$) et ($0.87 \pm 0.06\%$), respectivement.

Tableau 8 : Rendement en huiles essentielles des 04 populations de *L.stoechas* obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) à différents temps.

Populations	Extraits	Rendement (Moyenne±SD%)
El kahla	HD	($0.5 \pm 0.05\%$)
	US-HD60	($1.03 \pm 0.1\%$)
	US-HD45	($0.53 \pm 0.02\%$)
	US-HD30	($0.48 \pm 0.3\%$)
	US-HD20	($0.51 \pm 0.14\%$)
	US-HD10	($0.48 \pm 0.03\%$)
Keddara	HD	($0.62 \pm 0.02\%$)
	US-HD60	($0.45 \pm 0.0\%$)
	US-HD45	($0.87\% \pm 0,06\%$)
	US-HD30	($0.80 \pm 0.03\%$)
	US-HD20	($0.75 \pm 0.04\%$)
	US-HD10	($0.44 \pm 0.03\%$)
Adekar	HD	($1.17 \pm 0.01\%$)
	US-HD60	($1.07 \pm 0.01\%$)
	US-HD45	($1.08 \pm 0.0\%$)
	US-HD30	($0.94 \pm 0.03\%$)
	US-HD20	($1.33 \pm 0.04\%$)
	US-HD10	($1.59 \pm 0.03\%$)
Kodiat	HD	($0.64 \pm 0.04\%$)
	US-HD60	($0.62 \pm 0.07\%$)
	US-HD45	($0.61 \pm 0.06\%$)
	US-HD30	($1.37 \pm 0.13\%$)
	US-HD 20	($1.19 \pm 0.05\%$)
	US-HD10	($1.6 \pm 0.18\%$)

L'extension du traitement préalable aux ultrasons à 60 minutes a entraîné une diminution significative ($p < 0.05$) du rendement des HEK de 48.28%. Concernant *L. stoechas* de Kodiat, elle a atteint un rendement maximal en huile de ($1.60 \pm 0.1\%$) à seulement 10 min de prétraitement par ultrasons, suivi d'une diminution non significative ($p > 0.05$) du rendement à 20 min ($1.19 \pm 0.03\%$), suivi d'une augmentation non significative ($p = 0.05$) du rendement à 30 minutes ($1.37 \pm 0.09\%$). Une diminution significative ($p = 0.05$) du rendement en huile lors de la prolongation du temps de prétraitement aux ultrasons jusqu'à 45 min ($0.61 \pm 0.03\%$) et 60 min ($0.62 \pm 0.04\%$).

Enfin, Dans les échantillons d'El-kahla, le rendement d'extraction des HEs était plus ou moins stable en augmentant le temps de prétraitement aux ultrasons de 10

min à 45 min avec ($0.48 \pm 0.01\%$) et ($0.53 \pm 0.01\%$), respectivement. L'extension du traitement préalable aux ultrasons à 60 minutes a entraîné une augmentation significative ($p < 0.05$) du rendement en HEE ($1.03 \pm 0.07\%$).

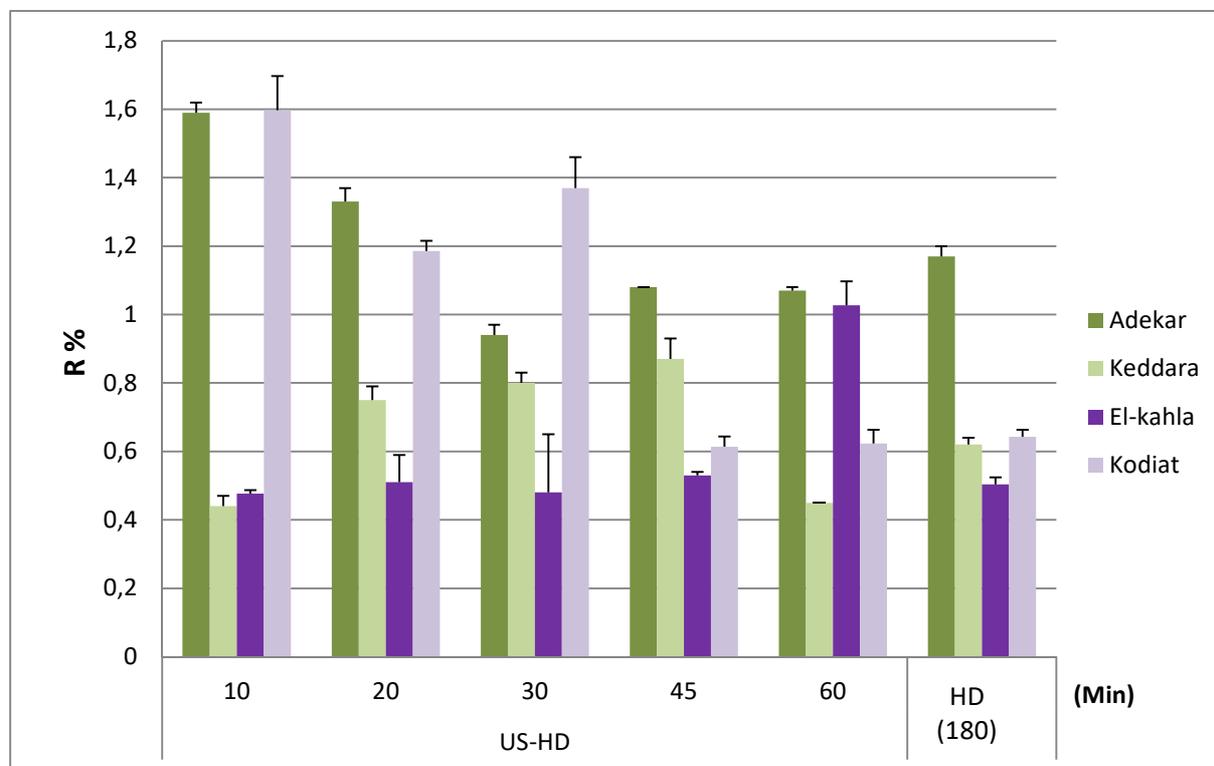


Figure 31 : Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) des HEE des 04 populations Algériennes de *L. stoechas*

III.1.2.4. Composition chimique des huiles essentielles de *L. stoechas*

Les HEE des populations de *L. stoechas* originaires de 04 localités différentes d'Algérie et obtenues par deux méthodes d'extraction : HD et US-HD, ont été soumises à des analyses détaillées par GC/FID (tous les extraits de la région de Kodiat) et GC/MS (les extraits de tous les sites de récoltes obtenus par HD et par US-HD donnant le meilleur rendement). L'identification des constituants a été réalisée par l'utilisation des indices de rétention (IR) sur colonne apolaire, par l'analyse des spectres de masse des composés constitutifs (Annexe) et par la comparaison de ces données à celles de la base de données électroniques NIST et de la base bibliographique (Adams, 2007). Les constituants identifiés, leurs indices de rétention et leurs pourcentages relatifs sont listés dans le tableau 8 selon leur ordre d'élution sur les colonnes apolaires HP-5 (GC/MS) et DB-5 (GC/FID).

Tableau 9 : Analyse par GC/MS des huiles essentielles des parties aériennes fleuries de 04 populations algériennes sauvages de *L.stoechas* obtenues par hydrodistillation et par prétraitement aux ultrasons au meilleur temps.

N°	Composés*	IR _e	IR _L	Composition (%)							
				HEA		HEK		HET		HEE	
				US-HD	HD	US-HD	HD	US-HD	HD	US-HD	HD
1	Tricyclene	917	921	-	0,2	-	-	-	0,18	-	-
2	α -Pinene	927	932	0,18	0,17	0,16	0,23	0,47	0,36	0,15	
3	Camphene	944	946	1,37	2,18	1,09	1,39	2,07	1,95	0,59	0,32
4	ρ -Cymene	1017	1020	0,4	0,49	-	-	0,65	-	-	-
5	Limonene	1021	1024	-	0,25	-	-	-	-	-	-
6	1,8-cineole	1026	1026	4,14	2,11	17,24	16,48	10,39	14,33	15,77	10,36
7	γ -Terpinene	1049	1054	-	-	0,15	0,3	-	-	-	-
8	<i>cis</i> -Linaloloxide	1073	1067	0,63	-	-	-	-	-	-	-
9	Fenchone	1093	1083	26,66	21,31	22,3	23,9	25,88	22,89	24,54	13,66
10	Linalool	1101	1095	0,5	0,23	-	-	-	0,01		0,32
11	α -Fenchol	1118	1114	1,41	0,95	1,39	1,36	-	1,29	1,85	1
12	Camphor	1146	1141	23,73	26,53	10,33	9,57	16,73	13,52	10,08	6,72
13	Pinocarvone	1156	1160	-	-	-	-	-	0,25	0,28	-
14	Borneol	1166	1165	2,03	1,42	-	-	0,22	1,78	-	-
15	Isoborneol	1167	1155	-	-	-	-	1,88	-	-	-
16	Terpinen-4-ol	1172	1174	0,61	0,3	0,67	0,66	0,42	0,38	0,64	0,54
18	<i>p</i> -Methylacetophenol	1176	1179	0,18	0,19	0,98	1,72	0,42	0,88	0,39	0,27
19	<i>p</i> -cymene-8-ol	1181	1179	0,9	0,65	0,93	-	0,98	0,97	0,87	0,61
20	Myrtenal	1186	1195	0,62	0,77	0,58	1,39	0,39	0,33	-	0,66
22	Myrtenol	1190	1194	1,22	-	1,02	-	0,7	0,57	3,67	1,66
23	Verbenone	1198	1204	0,86	0,49	-	0,8	0,69	1,14	0,96	0,53
24	α -Fenchyl acetate	1208	1218	0,75	1,42	0,72	0,66	1,45	1,14	0,69	0,58
25	<i>trans</i> -Carveol	1213	1215	0,42	0,2	0,28	0,29	0,32	0,32	0,37	0,36
26	Carvone	1239	1239	0,61	0,4	0,41	0,58	0,5	0,44	0,56	0,29
27	Bornyl acetate	1287	1287	6,84	10,34	3,77	3,43	7,52	5,62	1,89	1,76
28	<i>p</i> -Cymen-7-ol	1296	1289	-	-	-	-	-	0,16	-	-
29	Thymol	1306	1289	-	-	-	-	-	0,11	-	-
30	Myrtenyl acetate	1324	1324	4,46	4,09	2,22	2,7	2,65	2,25	4,4	7,36
31	Eugenol	1347	1356	-	-	0,22	0,15	0,11	-	0,31	0,2
32	Cyclosativene	1359	1369	0,51	0,61	0,71	0,67	0,63	0,61	0,62	0,51
33	α -Copaene	1365	1374	0,18	0,13	0,4	0,44	0,14	0,14	0,26	0,25
34	Geranyl acetate	1368	1379	-	-	-	0,17	-	-	-	-

Tableau 9 (Suite)

N°	Composés*	IR _e	IR _L	Composition (%)							
				HEA		HEK		HET		HEE	
				US-HD	HD	US-HD	HD	US-HD	HD	US-HD	HD
35	Sativene	1379	1369	-	-	0,12	0,09	-	0,07	-	-
36	β -Caryophyllene	1403	1408	-	-	0,14	0,14	0,2	0,12	0,25	0,31
37	Aromadendrene	1447	1439	-	-	0,29	0,16	-	-	-	-
38	<i>epi</i> -bicyclosesquiphellandrene	1460		0,24	0,13	-	-	0,11	-	-	0,43
39	Butylated Hydroxytoluene	1495	1514	-	-	-	-	0,23	-	0,43	0,47
40	γ -Cadinene	1512	1513	1,27	1,41	2,18	2,5	1,45	1,36	1,78	2,92
41	Calamenene	1515	1521	0,59	0,55	0,73	0,79	0,62	0,57	0,84	0,73
42	Cadina-1,4-diene	1524	1533	2,2	2,61	4,22	2,89	0,24	0,78	0,43	0,38
43	α -Calacorene	1534	1544	0,5	0,52	0,71	0,77	0,47	-	0,7	1,04
44	<i>cis</i> - α -Copaene-8-ol	1556		0,52	0,45	0,68	0,64	0,35	0,46	0,99	2,27
45	Palustrol	1562	1567	0,32	0,3	0,45	0,46	0,34	0,42	0,47	0,53
46	Caryophyllene oxide	1575	1582	0,68	0,65	1,03	0,87	0,64	0,74	0,97	1,65
47	Cis- β -Elemenone	1582	1589	-	-	-	-	-	0,63	0,75	0,82
48	Viridiflorol	1592	1592	4,23	4,84	5,43	5,32	4,82	5,85	5,75	7,02
49	Ledol	1601	1602	1,01	1,12	1,41	1,33	1,11	1,42	1,39	1,79
50	Guaiol	1606	1600	1,9	2,31	2,57	2,55	2,26	2,78	2,52	3,23
51	<i>1-epi</i> -Cubenol	1623	1627	0,77	0,84	1,29	1,36	0,81	0,11	1,11	1,59
52	<i>t</i> -Cadinol	1635	1638	0,91	1,04	1,44	0,7	0,69	0,65	1,37	2,26
53	<i>epi</i> - α -Muurolol	1640	1640	-	-	-	-	-	0,34	-	-
54	α -Cadinol	1649	1652	-	0,44	-	0,75	0,7	0,73	0,72	
55	Cadalene	1666	1675	-	-	-	0,54	0,44	0,61	-	0,6
Total identifié (%)				94,35	92,64	88,26	88,75	90,69	89,26	89,36	76,00
Monoterpènes Hydrocarbonés				1,95	3,29	1,4	1,92	3,19	2,49	0,74	0,32
Monoterpènes Oxygénés				76,39	71,21	62,08	62,14	70,83	67,5	66,88	46,61
Sesquiterpènes Hydrocarbonés				5,49	5,96	9,5	8,45	3,86	3,65	4,88	6,57
Sesquiterpènes Oxygénés				10,34	11,99	14,3	14,52	12,39	14,74	16,47	22,23
Autres				0,18	0,19	0,98	1,72	0,42	0,88	0,39	0,27
Durée de prétraitement par US (min)				10	0	45	0	60	0	10	0
Durée d'extraction (min)				90	180	90	180	90	180	90	180
Rendement (%)				1,59	1,17	0,87	0,62	1,03	0,5	1,6	0,64

*Composants répertoriés dans l'ordre d'éluion sur la colonne HP5-MS. IR_e Les indices de rétention déterminés expérimentalement sur la colonne mentionnée par co-injection d'une série homologue de n-alcane C8-C21. IR_L - Indices de conservation de la littérature (Adams, 2007). HEA (huile essentielle d'Adekar), HEK (huile essentielle de Keddara), HET (huile essentielle de Kodiat), HEE (huile essentielle d'El-kahla), US-HD (prétraitement par ultrasons avant hydrodistillation), HD (hydrodistillation).

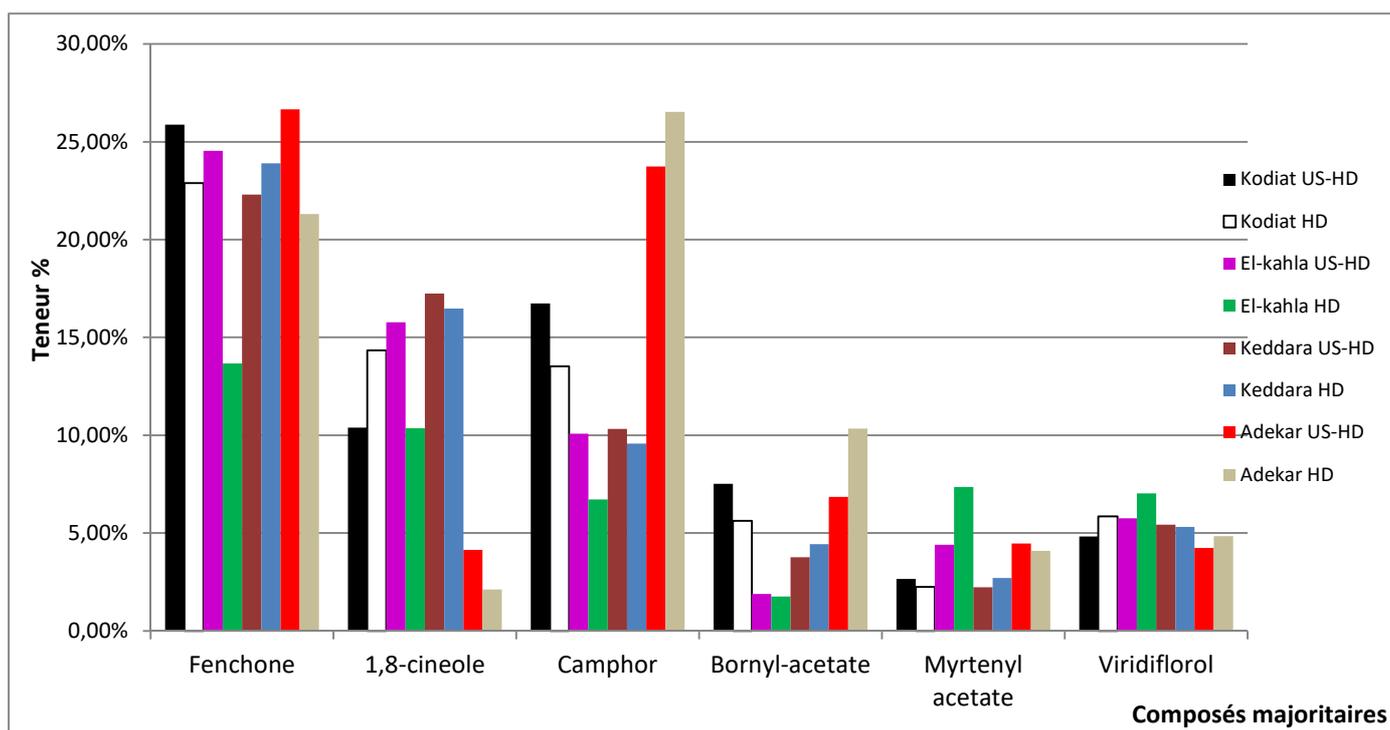


Figure 32 : Teneur en composés majoritaires des huiles essentielles de *L.stoechas* des quatre populations algériennes sauvages obtenus par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) donnant le meilleur rendement (analyse par GC/MS).

Les analyses chimiques par GC/MS ont permis d'identifier 55 composés dont la teneur est supérieure ou égale à 0.01 % avec des aires cumulées qui correspondent à 76% - 92.64% pour les extraits obtenus par HD et à 88.26% - 94.35 % pour les extraits obtenus par US-HD des aires cumulées de l'ensemble des constituants des HEs. Concernant les extraits obtenus par HD, 37 composés ont été identifiés dans HEA, HEK et HEE et 42 composés dans HET. Quant aux extraits obtenus par US-HD, un nombre de 35 composés ont été identifiés dans les HEK, de 36 composés ont été identifiés dans HEA et HEE et de 39 composés ont été identifiés dans HET. Il est à noter que dans tous les extraits obtenus par US-HD, la teneur totale en composés identifiés est supérieure à la teneur totale en composés identifiés dans les extraits obtenus par HD. Ce résultat est inversé dans les HEK (Tableau 9).

Ainsi, ces analyses ont montré la prédominance des composés monoterpéniques oxygénés (alcools, esters, éthers, aldéhydes, cétones, lactones, phénols, éthers phénoliques) avec une teneur combinée variant de 62.08 % à 76.39 % pour les HEs obtenues par US-HD et de 46.61 % à 71.21 % pour les HEs obtenues par HD. Cette fraction est dominée soit par le fenchone (de 22.3 à 26.66 %

et de 13.66 à 23.9 %, respectivement) soit par le camphre (26.53 %) dans le seul cas des HEA obtenues par HD. La figure 32 représente clairement la teneur en composés majoritaires des HEs des quatre populations de *L.stoechas* obtenues par HD et US-HD. Les structures chimiques développées de ces composés majoritaires sont représentés dans la figure 33.

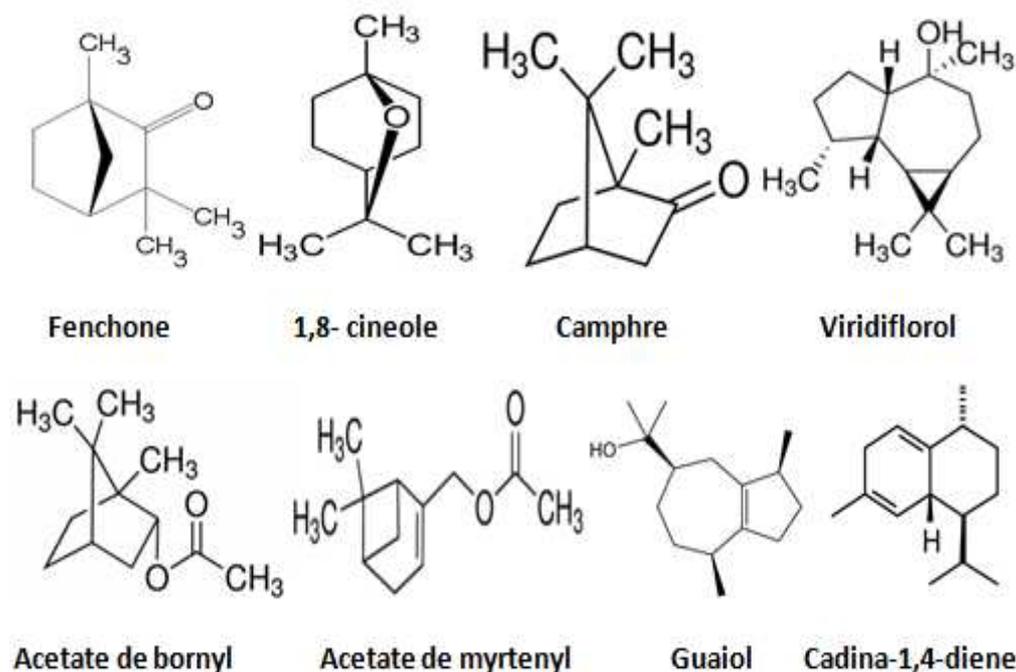


Figure 33 : Structures chimique des composés majoritaires de l'huile essentielle de *L. stoechas*

Les profils des monoterpènes oxygénés mettent en évidence l'importance du 1,8-cinéol dans les échantillons des HEs de la plupart des populations (de 4.14 à 17.24 % et de 2.11 à 16.48 %, respectivement) où il a été détecté comme deuxième ou troisième composé majoritaire. Ensuite, ce sont l'acétate de bornyl (de 1.89 à 7.52 % et de 1.76 à 10.34 %, respectivement) et l'acétate de myrtenyl (de 2.22 à 4.46 % et de 2.25 à 7.36 %, respectivement) qui sont les autres monoterpènes oxygénés les plus représentés.

Les sesquiterpènes oxygénés représentent la deuxième classe de molécules la plus abondante (de 10.34 à 16.47 % et de 11.99 à 22.23 %, respectivement). Parmi ceux-ci, le viridiflorol est le plus abondant, représentant de 4.23 % à 5.75 % et de 4.84 à 7.02 respectivement, des constituants des HEs, suivi par le guaiol (de 1.9 à 2.57 % et de 2.31 à 3.23 %, respectivement).

Les sesquiterpènes hydrocarbonés viennent en troisième classe avec la molécule abondante cadina-1,4-diene (de 0.24 à 4.22 % et de 0.38 à 2.89 %, respectivement). Les monoterpènes hydrocarbonés sont très minoritaires dans toutes les HEs analysées (Tableau 9). Cependant, malgré le travail d'analyse réalisé, il reste encore un certain nombre de composés non identifiés (de 5.65 à 11.74 % et de 7.36 à 24 %, respectivement).

De plus de ces composés identifiés par GC/MS, L'analyse par GC/FID des HEs de Kodiak obtenues par HD et par US-HD à 10, 20, 30, 45 et 60 min (Tableau 10) a permis d'identifier de nouveaux composés : α -thujene, sabinene, β -pinene, α -terpeneol, nerol, lavandulyle acetate et β -farnesene, c'est des composés minoritaires dont la teneur varie entre les HEs obtenues par HD et par US-HD.

Tableau 10 : Analyse par GC/FID des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) à différents temps des parties aériennes fleuries de *L.stoechas* de la population sauvage de Kodiak.

Composés	IR	Composition (%)					
		HD	US-HD10	US-HD20	US-HD30	US-HD45	US-HD60
<i>α-thujene</i>	917	0.12	0.17	0.10	0.07	0.11	0.09
<i>α-pinene</i>	931	0.24	0.22	0.11	0.16	0.23	0.17
Camphene	945	1.62	1.82	1.34	1.07	1.47	1.30
Sabinene	979	0.10	0.07	0.05	-	0.06	0.06
<i>β-pinene</i>	975	0.03	0.08	0.07	0.02	0.04	0.11
<i>α-terpinene</i>	1012	0.10	Trace	0.05	0.05	0.05	0.04
<i>P-Cymene</i>	1031	0.57	0.38	0.38	0.33	0.36	0.33
1.8 Cineole	1037	13.47	12.16	12.15	9.96	13.27	9.98
<i>γ-terpinene</i>	1067	0.05	0.06	0.04	0.04	0.05	0.05
Fenchone	1087	38.94	43.41	41.81	39.30	42.28	48.05
<i>Linalool</i>	1101	0.07	0.86	0.08	0.07	0.06	0.89
Camphor	1126	15.11	18.07	18.61	18.19	17.62	16.81
<i>Borneol</i>	1140	1.18	1.21	1.31	1.53	1.29	1.28
<i>α-Terpeneol</i>	1155	0.67	0.53	0.58	0.77	0.61	0.60
<i>Nerol</i>	1179	0.87	1.06	0.99	0.90	0.58	0.96
<i>Thymol</i>	1288	0.04	-	0.05	0.04	0.03	0.05
<i>Lavandulyl acetate</i>	1304	1.54	1.55	1.44	1.96	1.57	1.40
<i>Eugenol</i>	1361	0.04	0.07	0.11	0.08	0.08	0.06
<i>Geranyl acetate</i>	1385	0.03	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06
<i>β-Caryophellene</i>	1467	3.26	2.17	2.26	2.84	2.12	1.99
<i>β-Farnesene</i>	1445	2.09	1.30	1.39	1.73	1.28	1.08
Total identifié (%)		80.14	85.25	82.98	79.16	83.21	85.36
Monoterpènes Hydrocarbonés		2.83	2.80	2.14	1.74	2.37	2.15
Monoterpènes Oxygénés		70.39	77.37	75.69	70.84	75.82	78.68
Sesquiterpènes Hydrocarbonés		5.35	3.47	3.65	4.57	3.40	3.07
Sesquiterpenes Oxygénés		-	-	-	-	-	-
Autres		1.57	1.61	1.50	2.01	1.62	1.46

Une importante variation est également observée entre les différents temps de prétraitement par les US. Prenant par exemple le fenchone qui est le composé majoritaire, sa teneur est de 38.94 % dans l'HE obtenue par HD, cette teneur prend une variation plus élevée allant de 39.30 % à 48.05 % dans les HEs obtenues par US-HD, cette plus grande teneur est obtenue après 60 min de prétraitement.

La plus grande teneur du second composé majoritaire, le camphor, est obtenue à 20 min de prétraitement par les US, quant à 1.8 cineole, qui est le troisième composé majoritaire, sa plus grande teneur est observée dans l'extrait obtenu par HD (Figure 34).

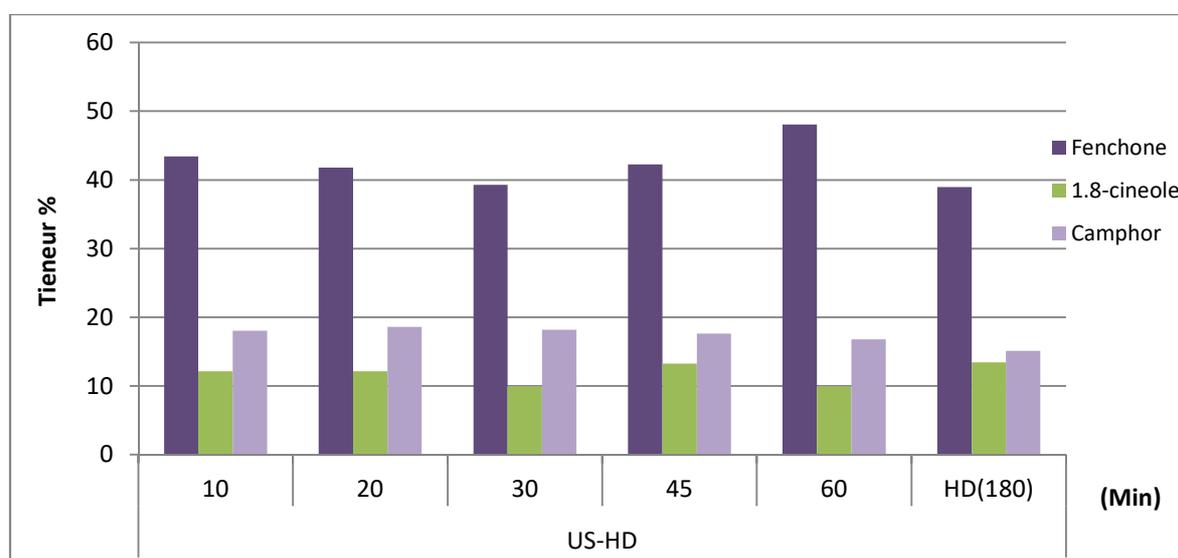


Figure 34 : Teneur en composés majoritaires des huiles essentielles de *L.stoechas* de la population algérienne sauvage de Kodiât obtenus par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) à différents temps (analyse par GC/FID).

Le pourcentage total des composés identifiés par GC/FID de l'extrait obtenu par HD est de 80.14%, ce pourcentage prend une variation allant de 79.16% à 85.36% des extraits obtenus par US-HD à différents temps de prétraitement avec également la prédominance de la fraction des monoterpènes oxygénés avec une teneur de 70.39% dans l'extrait obtenu par HD, et des teneurs allant de 70.84% à 78.68% dans les extraits obtenus par US-HD. Cette fraction est suivie de celles des sesquiterpènes hydrocarbonés et des monoterpènes hydrocarbonés.

Il est important de noter que l'analyse par GC/ MS des HEs de *L.stoechas*, a montré que certains composés tels que *cis*-linaloloxide et isoborneol n'ont été identifiés que dans les extraits obtenus par US-HD, alors que d'autres composés tel

que tricyclene et limonene n'ont été identifiés que dans les extraits obtenus par HD (Tableau 9). L'analyse par GC/FID, a également montré que sabinene et thymol ont été identifiés dans tous les extraits obtenus par HD et US-HD sauf dans ceux obtenus par US-HD à 30 min et US-HD à 10 min, respectivement (Tableau 10).

III.1.3. Discussion

L'analyse organoleptique des HEs des quatre populations algériennes sauvages de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD a présenté une variation qualitative remarquable surtout en point de vue couleur et odeur des HEs. Une telle variation est également observée entre les différents extraits exposés à différents temps de prétraitement par les US (10, 20, 30, 45 et 60 min) au sein d'un même échantillon. En général, les HEs obtenues par prétraitement aux ultrasons sont dotés d'une couleur plus foncée et d'une odeur plus puissante que celles des HEs obtenues par HD. Quant à l'analyse de la densité relative et de l'indice de réfraction de ces HEs obtenues par les deux techniques d'extraction, les résultats ont montré pratiquement le même caractère physico-chimique indiquant que le prétraitement ultrasonore fournit des HEs de qualité physico-chimique semblable à celle obtenue par HD.

L'extraction par ultrasons des plantes aromatiques et médicinales a été largement étudiée, avec de nombreux exemples, trouvés dans la littérature et les articles de recherche publiés ces dernières années. Cependant, dans cette littérature, l'étude de la qualité organoleptique et physico-chimique des HEs obtenues par prétraitement aux ultrasons a été rarement investiguée. En travaillant sur l'extraction assistée aux ultrasons de l'huile de riz (*Oryza sativa*), Krishnan et *al.* (2015), affirment que la qualité des huiles telle que la densité et l'indice de peroxyde, peuvent ne pas être affectés par le prétraitement aux ultrasons, ce qui est en accord avec nos résultats. D'autre part, l'étude comparative de l'extraction des HEs de l'ail frais (*Allium sativum*) par distillation conventionnelle, par hydrodistillation assistée aux microondes et par extraction assistée aux ultrasons, montre que les ultrasons causent moins de dommages aux molécules thermosensibles ce qui rend cette technique comme une meilleure approche pour l'extraction des composés principalement responsables de l'odeur et du goût caractéristiques de l'ail fraîchement haché (Kimbaris et *al.*, 2006). Les auteurs indiquent également, que les

ultrasons diminuent la dégradation thermique des arômes sensitifs. La technique aux ultrasons est plus efficace que d'autres méthodes d'extraction conventionnelles telles que l'hydrodistillation car elle donne lieu à un arôme plus pur, plus fidèle et proche de l'odeur naturelle de la plante cible (Mnayer, 2014), ce qui peut expliquer la couleur foncée et l'odeur puissante des extraits obtenus par prétraitement aux ultrasons ainsi que les différences d'odeur et surtout de couleur notées, des HEs d'un temps de prétraitement à autre .

Les rendements d'extractions en HEs des quatre populations algériennes sauvages de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD ont également présenté une variation importante. Des variations similaires dans le modèle de rendement d'extraction en fonction du temps de traitement par ultrasons ont déjà été rapportées pour les composés phénoliques des fruits étoilés (Annegowda et al., 2012). Peu d'études ont évalué l'effet du prétraitement par les US avant l'HD sur le rendement en huiles essentielles. Kimbaris et al., (2006) montrent que l'utilisation d'un traitement par ultrasons de 30 min pour l'extraction de l'huile essentielle d'*Allium sativum* a permis d'améliorer l'extraction en réduisant significativement le temps d'extraction ce qui est en accord avec nos résultats pour la majorité des temps de prétraitement étudiés. Également, Assami et al. (2012) ont montré que seulement 30 min de prétraitement par les US sont nécessaires pour récupérer 80% des HEs des graines de carvi, par rapport à 90 min des échantillons non traités. Cette augmentation de rendement par prétraitement aux ultrasons a été expliquée par le phénomène de sonoporation dans les études de Meullemiestre et al. (2016) qui ont comparé une levure humide (*Yarrowia Lipolityca*) traité par ultrasons avec une autre non traité. La levure traitée présente une surface cellulaire fortement impactée et des perforations de la membrane visible ont été remarqués, ce qui donne un rendement plus élevé par rapport à l'extraction conventionnelle.

Les meilleurs rendements des HEA et les HET ont été obtenus après seulement 10 min de traitement par ultrasons, ce qui peut être expliqué par les travaux de Pingret et al., (2012) pour la récupération des polyphénols totaux du marc de pomme par ultrasons et par macération. Les auteurs ont pu montrer que la cinétique d'extraction est améliorée sous ultrasons, cette amélioration semble se produire dans les premières 10 min d'extraction. Ils ont alors supposé que cette différence pourrait être due à une absorption d'eau favorisant davantage la diffusion

des polyphénols hors des grignons. Jacotet-Navarro et *al.* (2016) ont également montré que les ultrasons améliorent considérablement le rendement d'extraction en masse du gingembre, une augmentation de 126% étant observée entre la macération conventionnelle et l'extraction assistée par ultrasons tout en réduisant le temps d'extraction de 540 à 110 min. Le traitement par ultrasons des parties aériennes séchées à l'air de *Thymus daenensis* a eu un effet significatif sur l'efficacité d'extraction de son huile essentielle par hydrodistillation (Tavakolpour et *al.*, 2016). L'extraction par ultrasons suivie de l'hydrodistillation des graines d'*Elettaria cardamomum* a diminuée le temps de l'extraction, améliorée l'efficacité de l'extraction et produit une huile essentielle de cardamome de bonne qualité (Nashwa, 2015). d'autre part, cette technique n'a pas eu d'effet positif sur la cinétique d'extraction de l'huile essentielle de Lavandin et donne un rendement maximum après 60 min de distillation à la vapeur précédée de 30 min de prétraitement ultrasonore (Périno-Issartier et *al.*, 2013).

La diminution du rendement en HE après la prolongation de la durée de sonication (Figure 31) à partir de 20 min pour HEA, de 60 min pour HEK, de 20 min pour HET et de 30 min pour HEE, peut être attribuée à l'augmentation de la température du processus (Tavakolpour et *al.*, 2016), qui influence la stabilité des composés des HEs dépendant de leurs structures chimiques. En outre, une telle dégradation aurait pu probablement être produite en raison de la génération des radicaux libres, principalement les radicaux hydroxyles hautement réactifs, tels que rapportés par Annegowda et *al.* (2012).

D'un autre côté, nos quatre échantillons pourraient présenter des résultats variés, probablement en raison de leur structure et de leurs densités différentes, ainsi qu'aux caractéristiques chimiques de leurs HEs, qui pourraient être spécifiquement affectées par le traitement ultrasonore. En fait, la distribution et la structure de la glande sécrétrice d'huile peuvent varier en fonction des espèces végétales, même au sein du même genre (Arnold et *al.*, 1993), même organe (Sulborska, 2013) et même stade phénologique (Bosabalidis et *al.*, 2014). De même, des relations significatives ont été rapportées entre la composition en huile essentielle et les origines éco-géographiques des populations (Bajalan et *al.*, 2016). L'impact du prétraitement par ultrasons sur l'efficacité d'extraction des huiles essentielles pourrait être lié aux différents mécanismes impliqués lors de l'extraction par ultrasons (fragmentation,

érosion, capillarité et sonoporation). Par exemple, la comparaison des rendements d'extraction des feuilles de boldo a montré une augmentation du rendement d'extraction de 20% pour la macération conventionnelle à 25% avec l'extraction par les ultrasons (Petigny et *al.*, 2013). Sachant que les feuilles de boldo possèdent des trichomes à la surface des feuilles, les auteurs ont montré que ces structures ont été endommagées ou enlevées de la feuille après traitement aux ultrasons, ce qui n'est pas le cas des feuilles soumises à la macération. Parmi les nouvelles techniques d'extraction des HEs, l'extraction assistée par ultrasons a attiré beaucoup d'attention en raison de ses impacts positifs sur le temps d'extraction, le rendement et la consommation de solvants (Barrera Vázquez et *al.*, 2014). Ces effets positifs des ondes ultrasonores sont principalement attribués à l'événement de cavitation acoustique. Les effets de cavitation provoquent une rupture et un amincissement direct des membranes biologiques et des parois cellulaires, ce qui augmente le taux de transfert de masse des substances organiques de la matrice solide vers le solvant (Tavakolpour et *al.*, 2016). De plus, un prétraitement par ultrasons pourrait provoquer l'effritement ou la rupture des parois glandulaires plus rapidement et plus efficacement que dans l'hydrodistillation conventionnelle. Les effets mécaniques des ultrasons ainsi que l'influence de leurs paramètres ont été très bien étudiés et publiés par Chemat et *al.* (2017a).

Les analyses par GC/FID et GC/MS montrent que les HEs des quatre populations algériennes de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD contiennent plus de composés oxygénés que de composés hydrocarbonés. En plus, ces composés oxygénés sont majoritairement monoterpéniques. Les HEs des espèces *Lavandula* sont généralement riches en monoterpènes (Lis-Balchin, 2002 ; Upson & Andrews, 2004). De plus, ces analyses ont mis en évidence la présence du chémotype fenchone dans les HEs de tous les échantillons obtenus par HD et US-HD sauf pour HEA/HD où il y a la présence du chémotype camphre. Une forte variabilité de composition entre les deux méthodes d'extraction a été également observée. Ces données actuelles sont en accord avec celles rapportées par Benabdelkader et *al.*, (2011) concernant les principaux composants des HEs de onze populations algériennes sauvages de *L. stoechas*.

Bien que les HEA, HEK, HET et HEE des échantillons traités et non traités contiennent presque les mêmes principaux composés mais leurs teneurs étaient

différentes. Dans les HEA, HET et HEE obtenue avec l'US-HD, la quantité relative de fenchone (26.66, 25.88 et 24.54%) était plus élevée par rapport a celles observées dans l'HD (21.31, 22.89 et 13.66%), respectivement (Figure 32). Alors que dans les HEK, la concentration de fenchone était plus élevée dans l'échantillon non traité (23,90%) que dans l'échantillon traité (22,30%) (Figure 32). D'autre part, l'abondance relative du camphre était plus élevée dans les échantillons HEK/US-HD et HEE/US-HD que dans les HD (10,33% et 15.77% - 9.57% et 10.36%, respectivement). Ce résultat est inversé concernant les HEA et HET (23.73% et 10.39% - 26.53% et 14.33%, respectivement). Egalement, la teneur de bornyl acetate est plus élevée dans HET/US-HD et HEE/US-HD que dans HD (16.73% et 10.08% - 13.52% et 6.72%, respectivement), alors que ce résultat est inversé pour HEA et HEK (6.84% et 3.77% - 10.34% et 4.43%, respectivement). Tous les échantillons obtenus par US-HD ont une concentration plus élevée de myrtenyl acetate par rapport aux échantillons obtenus par HD (Figure 32). Ce même résultat est observé concernant 1.8-cineole, et ce, pour tous les extraits sauf pour HEE (Figure 32). Quant à viridiflorol, son abondance est plus importante dans les extraits obtenus par HD que dans les extraits obtenus par US-HD sauf pour HEK ou la teneur de ce dernier est légèrement supérieure dans l'extrait obtenu par US-HD (5.43%) que dans celui obtenu par HD (5.32%). Ces mêmes variations de concentration sont également observées pour les composés minoritaires indiquant, finalement, que l'extraction des HEs par US-HD donne une teneur totale des composés identifiés plus élevée en comparant avec l'extraction par HD à l'exception des HEK dans le cas de l'analyse par GC/MS (Tableau 9) et des HET obtenues par US-HD30 dans le cas de l'analyse par GC/FID (Tableau 10). Jacotet-Navarro et *al.* (2016) ont montré que la quantité des composés phénoliques extraits du gingembre était améliorée de 29%, en comparant la macération conventionnelle (CM) à l'extraction assistée par ultrasons. L'effet du prétraitement par ultrasons sur la composition chimique des HEs des quatre échantillons de *L.stoechas* pourrait être lié aux propriétés de la température et à la solubilité de leurs divers composants (Mullakaev et *al.*, 2015). Il a été trouvé que les abondances relatives de fenchone et de camphre étaient plus élevées à 150 ° C pour *L. stoechas* de la Turquie, alors que la solubilité du myrtenol et de l'acétate de bornyle était plus élevée à 125 ° C. Au contraire, l'alcool fenchylique a atteint la quantité relative maximale à seulement 100 ° C (Giray et *al.*, 2008).

Des études antérieures ont montré que, généralement, le procédé US-HD peut améliorer le rendement d'extraction des HEs en fournissant des composants plus précieux que la HD classique. L'influence du procédé d'extraction sur la labilité des constituants des HEs explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Le chauffage prolongé et puissant engendre en effet la dégradation de certaines de molécules aromatiques. Au cours de l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisation, mais aussi réarrangements, isomérisations, racémisations, oxydations, etc... et ce d'autant plus que la distillation est longue et le pH acide (Granger *et al.*, 1975). En comparant l'extraction par prétraitement aux ultrasons avec l'hydrodistillation et l'extraction assistée aux micro-ondes, Kimbaris *et al.*, (2006) montrent que le prétraitement ultrasonore diminue considérablement la dégradation thermique des composés aromatiques volatiles de l'ail. De plus, le comportement des principaux composés volatils pourrait présenter des formes différentes dans la même espèce végétale selon le matériel de l'organe (Ait-kaci Aourahoun *et al.*, 2016).

Il est également important de noter l'influence du temps d'extraction sur la cinétique d'extraction des composés majoritaires ainsi que des composés minoritaires obtenus avec US-HD. L'analyse par GC/FID a montré que la teneur des composés des HET varie d'un temps de prétraitement par US à un autre. L'abondance de fenchone, camphre et 1.8-cineole est plus importante à des temps de prétraitement ultrasonores de 60, 20 et 45 min, respectivement (Figure 34). De telles études des méthodes d'extraction développées, comme l'extraction par ultrasons (Assami *et al.*, 2012) et l'extraction sous-optique (SbCW) combinées à l'HD (Giray *et al.*, 2008) ont montré l'effet du temps d'extraction sur la composition chimique des HEs. En effet, l'extraction par SbCW des HEs des fleurs de *L. stoechas* turcs pour le composé le plus abondant, le fenchone, a été principalement complétée à 15 min. Les autres composants majeurs, le camphre, le 1,8-cinéol, le myrténol et l'acétate de myrtényle ont atteint la quantité maximale relative à 20 min de l'extraction.

La présence et l'absence de certains composés identifiés dans les HEs obtenues par HD et US-HD (analyse par GC /MS) ainsi que dans les HET obtenues

par HD et US-HD à 10, 20, 30, 45 et 60 min (GC/FID) peuvent être expliquées par leurs différences de solubilité dans le solvant utilisé, la température, la durée d'extraction et la fragmentation de la plante (Goetz, 2004).

III.2. ACTIVITES BIOLOGIQUES *in vitro* DES HES DES 04 POPULATIONS SAUVAGES DE *L. stoechas* OBTENUES PAR HD ET PAR US-HD :

III.2.1. Introduction

Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne et a toujours été faites de façon empirique (Svoboda and Svoboda, 2000). De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. Leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnues et répertoriées, et donc mises à profit, dans le cadre des médecines traditionnelles et également dans la médecine allopathique moderne (Bourgaud *et al.*, 2001; Kar, 2007). Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent pour 90% du traitement médicales. Jusqu'en 2004, on a estimé que près de 75% de la population africaine a toujours recours aux plantes pour se soigner. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce (Kar, 2007).

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles pour l'industrie agroalimentaire, ils se sont avérés utiles dans la prophylaxie ou le traitement de plusieurs pathologies. Il a été démontré que les peuples utilisant une alimentation riche en antioxydants sont moins exposés à des maladies cardiovasculaires (Vinson *et al.*, 1995) ou à certaines formes de cancer (Hertog *et al.*, 1993). Les antioxydants naturels sont apparus comme une alternative aux antioxydants de synthèses qui sont de moins en moins utilisés dans l'industrie alimentaire à cause de leurs effets secondaires nuisibles pour la santé humaine. Les

antioxydants de synthèses les plus couramment utilisés sont le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), le gallate de propyle (PG) et le *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) (Sherwin, 1990). Cependant, le BHA et le BHT sont suspectés d'être responsables des dommages au foie et d'induire certains cancers (Grice, 1986 ; Wichi, 1988). Par conséquent, le développement et l'utilisation d'antioxydants plus efficaces d'origine naturelle sont souhaités.

Il ne fait aucun doute que les maladies infectieuses ont existé depuis la préhistoire, mais leur rôle y est le plus souvent méconnu, elles ont de tout temps accompagné l'homme, mais celui-ci ne le sait que depuis plus d'une centaine d'années, vers 1876 avec les découvertes de Pasteur et Koch. La preuve de leur existence en ces âges lointains existe pour certaines d'entre elles, dont les lésions spécifiques ou plus rarement les agents infectieux sont retrouvés sur les ossements ou sur les momies et même dans les anciens écrits (Dedet, 2007; Panzer et *al.*, 2014). Les premiers antimicrobiens utilisés étaient des vaccins (Edward Jenner en 1796, Louis Pasteur depuis 1880-1885), des colorants de synthèse chimique comme le bleu de méthylène, le salvarsan ou arsphénamine, le prontosil, etc., et enfin les antibiotiques : pénicilline 1928, gramicidine S 1942, streptomycine 1944, etc., qui sont des produits naturels issus de microorganismes. L'ère des antibiotiques a transformé totalement l'univers des maladies infectieuses, au point qu'on a pensé un temps pouvoir les faire disparaître (Dedet, 2007). Cependant, ces dernières années, de profonds changements ont marqué les connaissances en microbiologie médicale, spécialement le nombre croissant de microorganismes impliqués dans les processus pathologiques et la résistance aux traitements appliqués (Eberlin, 1997). Il est donc nécessaire de trouver une alternative : de nouveaux remèdes plus efficaces ayant moins d'effets secondaires que les antibiotiques et moins onéreux, comme les plantes médicinales et aromatiques.

A cet effet, nous avons jugé utile d'évaluer l'effet de prétraitement par les ultrasons à différents temps avant hydrodistillation, sur l'activité antioxydante et antimicrobienne des HEs de 04 populations algériennes sauvages de *L. stoechas*, et ce, en comparant avec une hydrodistillation conventionnelle afin de mieux valoriser cette immense source naturelle tout en justifiant la technique la plus appropriée pour son obtention.

III.2.2. Résultats

III.2.2.1. Activité antioxydante des huiles essentielles

L'activité antioxydante des HEs de *L. stoechas* évaluée par le test DPPH est exprimée en IC50. L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé ou d'une HE, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante est grande. Les valeurs d'IC50 pour les 04 HEs de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD du meilleur temps de prétraitement donnant le meilleur rendement, ainsi que pour l'acide ascorbique comme composé de référence, sont présentées dans le tableau 10. Les concentrations testées (200 ; 400 ; 600 ; 800 et 1000 µg/ml) des échantillons d'HEs sont très fortes par rapport à l'acide ascorbique qui est un antioxydant puissant, d'où la nécessité de diminuer ces concentrations en : 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 µg/ml afin de permettre une meilleure comparaison graphique.

Sur la base de ce test, nos 04 HEs obtenues par les deux méthodes d'extraction, ont montré des différences significatives ($p < 0.05$) dans leur capacité d'inhibition (I%) du radical libre DPPH (Figure 35). Toutes les HEs obtenues par US-HD avaient des IC50 plus faible et donc un pouvoir antioxydant plus efficace par rapport aux HEs obtenues par HD (Tableau 11).

Tableau 11 : IC50 des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) des parties aériennes fleuries des 04 populations sauvages de *L.stoechas*.

Huiles essentielles	IC50 ± SD (µg/ml)
Kodiat HD	3903,73± 21,65
Kodiat US-HD	3547,9± 42,23
Ei-kahla HD	2361,34± 16,76
Ei-kahla US-HD	1670,62± 39,38
Keddara HD	2786.94 ± 17.32
Keddara US-HD	2564.10 ± 16.45
Adekar HD	1663.96 ± 9.69
Adekar US-HD	1547.29 ± 42.23
Ascorbic acid	16.16 ± 1.16

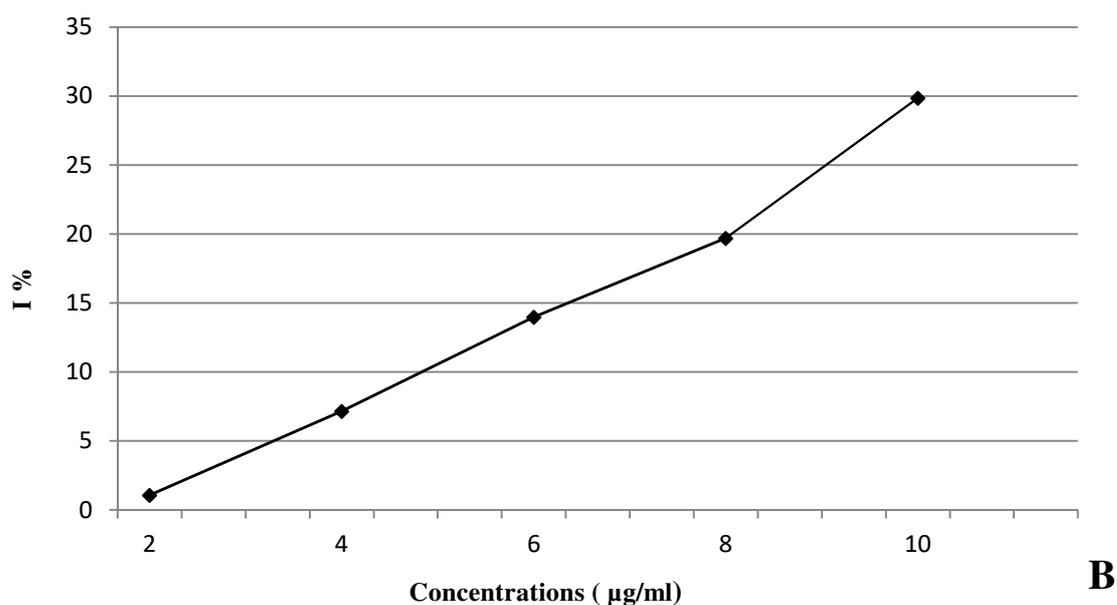
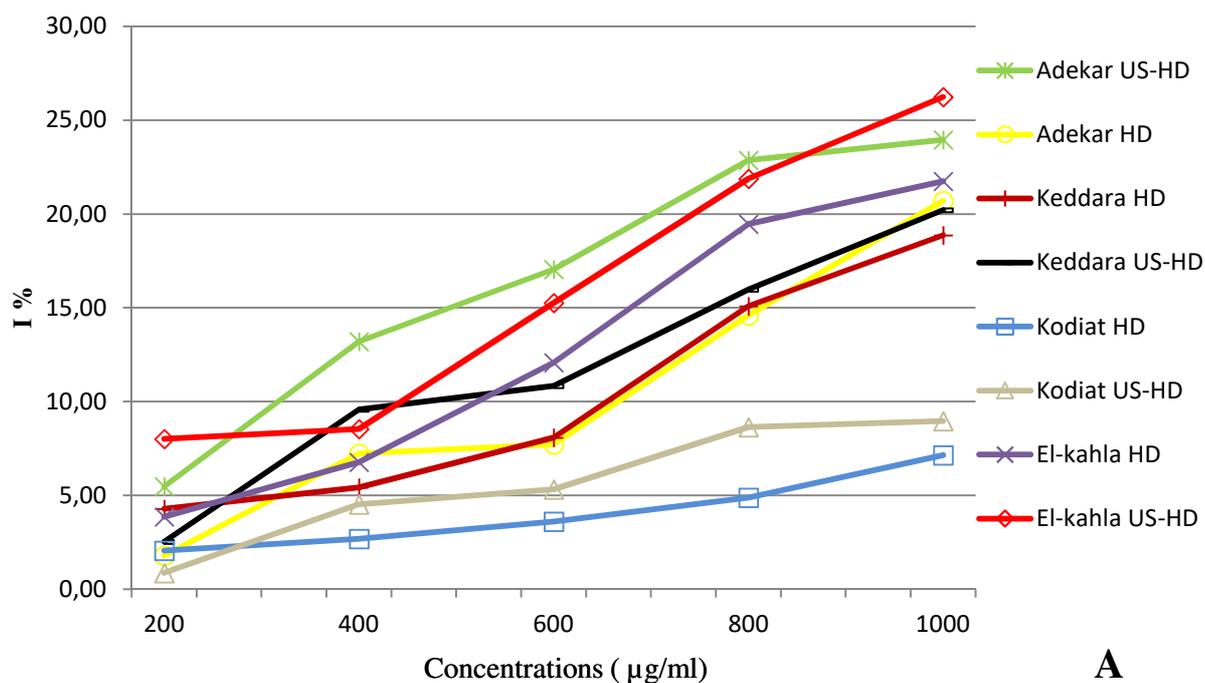


Figure 35 : Activité antioxydante : (A) des huiles essentielles des 04 populations sauvage de *L. stoechas* obtenues par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) et (B) de l'acide ascorbique (standard contrôle).

L'HEA obtenue par US-HD était la plus active et pouvait ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) violet en diphényl-picrylhydrazine jaune avec un IC50 de 1547.29 µg/ml ± 42.23. Cette même HE obtenue par HD avait un IC50 plus élevé (1663.96 µg/ml ± 9.69). L'HET obtenue par HD était la moins active avec un IC50 de 3903.73 µg/ml ± 21. Cette même HE obtenue par US-HD avait un IC50 plus faible (3547.9 µg/ml ± 42.23). Les HEE et HEK obtenues par US-HD avaient des IC50 de 1670.62 µg/ml ± 39.38 et de 2564.10 µg/ml ± 16.45, ces IC50 prennent des valeurs allant jusqu'à 2361,34 µg/ml ± 16,76 et 2786.94 µg/ml ± 17.32, respectivement, dans le cas d'extraction par HD. Lorsque l'activité antioxydante des huiles des deux méthodes d'extraction est comparée à celle de la substance de référence (l'acide ascorbique), toutes les HEs de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD étaient trouvées moins efficaces. L'acide ascorbique présente un IC50 très inférieure (16.16 µg/ml ± 1.16).

III.2.2.1. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les HEs des 04 populations algériennes sauvages de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD du meilleur temps de prétraitement donnant le meilleur rendement, ont également fait l'objet d'une étude *in vitro* de l'activité antimicrobienne sur 08 microorganismes pathogènes à l'Homme ou phyto-pathogènes.

Lors de cette étude, les tests ont été réalisés par la technique de micro-dilution en milieu solide car elle fournit des données quantitatives précises sous forme de concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats de ce criblage sont résumés dans le tableau 12.

Le tween-80 est ajouté dans le milieu pour améliorer la solubilité des HEs. Un milieu avec le tween-80 et l'eau distillée à la place des HEs a servi de contrôle négatif. Selon Aligiannis *et al.* (2001), l'activité antimicrobienne est considérée comme forte lorsque les valeurs de CMI sont comprises entre 0.05 mg/ml et 0.50 mg/ml, modérée quand elles sont entre 0.6 mg/ml et 1.50 mg/ml et faibles quand elles sont supérieures à 1.50 mg/ml. En accord avec la grande variabilité de leurs compositions chimiques, les HEs obtenues par les deux méthodes d'extraction des 04 populations que nous avons testées ont été différenciellement efficaces envers les microorganismes cibles.

Tableau 12 : Activité antimicrobienne (CMI) des huiles essentielles des 04 populations algériennes de *L. stoechas* obtenues par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD).

Microorganismes		CMI (mg/ml)							
		HEE HD	HEE US-HD	HEK HD	HEK US-HD	HEA HD	HEA US-HD	HET HD	HET US-HD
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 18	< 0,14	18	> 18	> 18	> 18	> 18	> 18
	<i>Bacillus subtilis</i>	> 18	2,25	18	0,14	> 18	18	1,12	9
Gram-	<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	> 18	< 0,14	9	0,14	1,12	4,5	> 18	> 18
	<i>E. coli 25922</i>	> 18	> 18	18	> 18	> 18	> 18	> 18	> 18
moisissure	<i>Umbilopsis ramaniana</i>	> 18	4,5	4,5	> 18	1,12	> 18	> 18	4,5
	<i>Fusarium culmorum</i>	> 18	18	18	> 18	> 18	4,5	> 18	> 18
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	> 18	0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	1,12	1,12
levure	<i>Candida albicans</i>	> 18	0,14	9	4,5	1,12	1,12	0,28	1,12

Pour les bactéries, des valeurs de CMI allant de 1.12 mg/ml jusqu'à des valeurs supérieures à 18 mg/ml ont été notées pour les HEs obtenues par HD, quant aux HEs obtenues par US-HD, les valeurs de CMI varient entre des valeurs inférieures à 0.14 mg/ml jusqu'à des valeurs supérieures à 18 mg/ml. Ce même résultat de CMI a été obtenu sur les moisissures pour les HEs des deux méthodes d'extraction. Concernant la levure *Candida albicans*, la CMI des HEs obtenues par HD prend des valeurs inférieures à 0.14 mg/ml jusqu'à une valeur supérieure à 18 mg/ml, alors que celle des HEs obtenues par US-HD, elle prend des valeurs inférieures à 0.14 mg/ml jusqu'à une valeur de 1.12 mg/ml. D'après ces résultats, les HEs des 04 populations de *L.stoechas* obtenues par les deux méthodes d'extraction possèdent un pouvoir antimicrobien faible à modéré mais généralement, les HEs obtenues par US-HD ont une activité antimicrobienne plus efficace sur les bactéries et la levure *Candida albicans* par apport aux HEs obtenues par HD. La figure 36 présente les CMI cumulées de chaque HE de *L. stoechas* envers les 08 souches testées, l'HEE obtenue par US-HD présente, *in vitro*, une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des microorganismes testés avec une CMI cumulée de 43.31mg/ml, alors que cette même HE obtenue par HD présente, *in vitro*, la plus faible activité antimicrobienne avec une CMI cumulée de 144 mg/ml. HEK, HEA et HET obtenues par HD et US-HD

présentent pratiquement le même pouvoir antimicrobien avec des CMI cumulées de 94.64 ; 76.92 mg/ml, 75.5 ; 82.26 mg/ml et 92.52 ; 87.74 mg/ml, respectivement.

Il est important de noter que contrairement à HEA, HEK et HET obtenues par US-HD demeurent plus efficaces par rapport à ceux obtenues par HD.

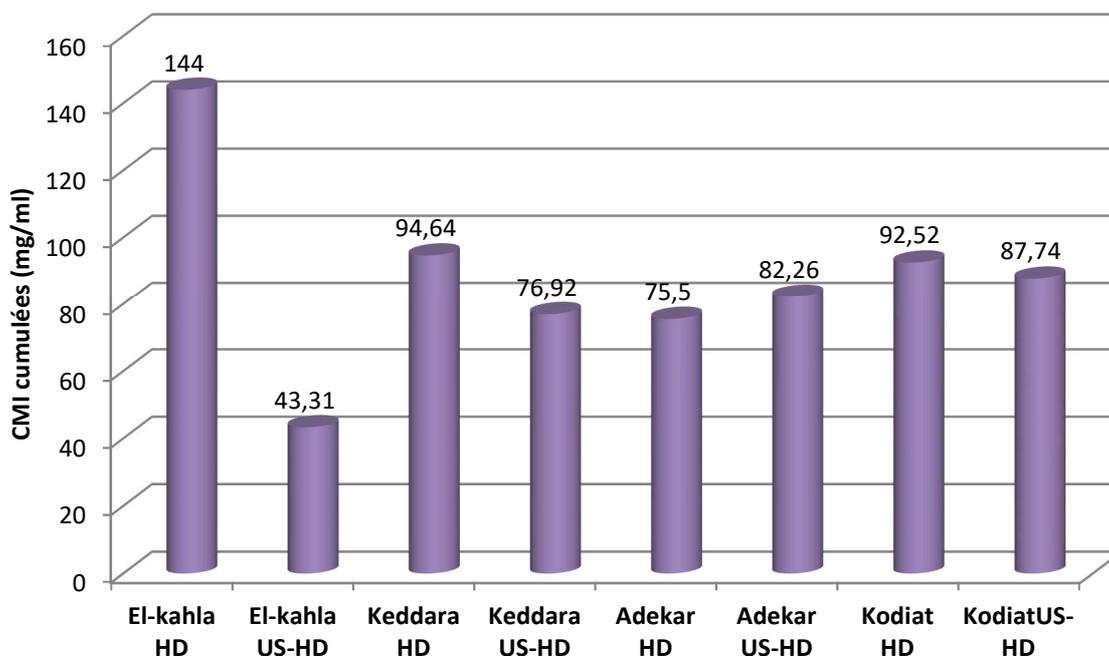


Figure 36 : CMI cumulées de chaque HE des 04 populations sauvages de *L. stoechas* obtenues par Hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) envers les 08 souches cible.

La figure 37 présente les CMI cumulées des HEs des 04 populations sauvages de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD sur chacune des souches de microorganisme testées. Les microorganismes étudiés n'ont pas manifesté la même sensibilité vis-à-vis des HEs testées. Toutes les souches se sont avérées plus sensibles aux HEs de *L. stoechas* obtenues par US-HD qu'aux HEs obtenues par HD sauf pour *U. ramanniana* qui s'est avérée, contrairement aux autres souches, plus sensible aux HEs obtenues par HD ainsi que pour *E. coli* 25922 qui a manifesté la même sensibilité vis-à-vis des HEs des deux méthodes d'extraction. Cette dernière est la souche la plus résistante à nos HEs avec une CMI cumulée de 72 mg/ml. En revanche, la moisissure *A. carbonarius* s'est montrée comme étant la souche la plus sensible à nos HEs obtenues par HD et US-HD avec des CMI cumulées de 19.4 et 1.54 mg/ml, respectivement. *C. albicans*, s'est également montré très sensible à nos

HEs avec des CMI cumulées de 28.4 et 6.88 mg/ml, respectivement. Il est à noter que, d'une part, la bactérie *S.aureus* et la moisissure *F. culmorum* ont présenté presque la même tolérance envers les HEs avec des CMI cumulées de 72 et 54.14 mg/ml et de 72 et 58.5 mg/ml, respectivement. D'autre part, les bactéries *P. aeruginosa* et *B. subtilis* et la moisissure *U. ramanniana* ont également présenté la même tolérance vis-à-vis de nos HEs avec des CMI cumulées de 46.12 et 22.78 mg/ml, de 55.12 et 29.39 mg/ml et de 41.62 et 45 mg/ml, respectivement.

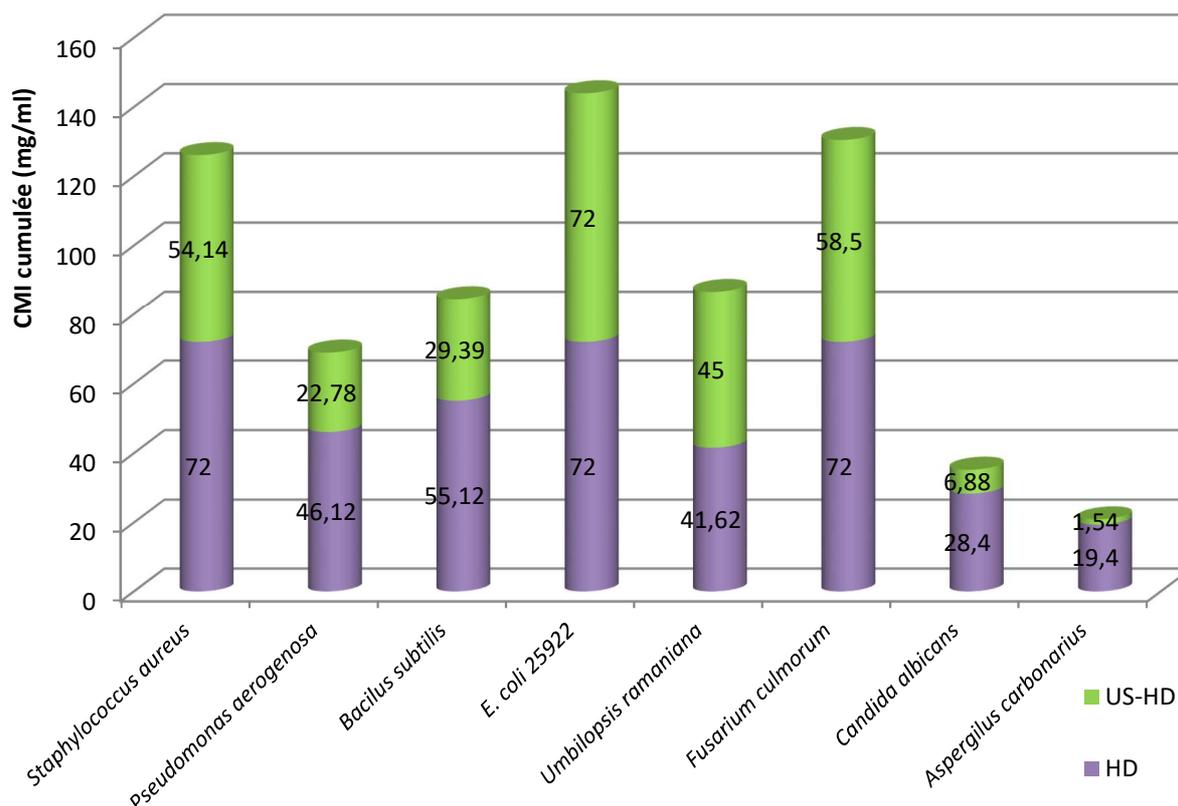


Figure 37 : CMI cumulées des HEs de *L. stoechas* des 04 populations obtenues par hydrodistillation (HD) et par prétraitement aux ultrasons (US-HD) sur chaque souche de microorganisme cible

III.2.3. Discussion

Les HEs sont des sources potentielles de constituants chimiques naturels doués d'activité antioxydante. Les HEs ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'auto-oxydation (Okuda *et al.*, 1989; Teissedre *et al.*, 1996; Bohm *et al.*, 1998; Debra *et al.*, 2001). De nombreuses études ont montré que les activités biologiques des HEs des plantes aromatiques sont liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires. Cependant, des

composés minoritaires peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activités biologiques.

Plusieurs composés que nous avons détectés dans les HEs de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD ont déjà été décrits comme antioxydants lors de tests de criblage chimique. Il s'agit notamment de l'eugénol, du thymol, de l' α -terpinène, du γ -terpinène (Ruberto et al., 2000) et du terpinène-4-ol (Lertsatitthanakorn et al., 2006). L'analyse par GC / MS montre que la teneur en terpinène-4-ol est plus importante dans tous les extraits obtenus par US-HD que dans ceux obtenus par HD. La même chose pour l'eugénol dont le contenu est totalement absent dans HEA/HD et HET/HD. Quant au thymol, il n'a été détecté que dans HET obtenu par HD alors que γ -terpinène, il n'a été détecté que dans HEK avec une teneur plus considérable dans l'extrait obtenu par HD.

En revanche, l'analyse par GC / FID de HET a montré que l'abondance de l'eugénol est plus élevée dans les extraits US-HD, tandis que la teneur en α -terpinène est plus élevée dans l'extrait obtenu par HD. Quant à γ -terpinène et à thymol, ils ont plus ou moins les mêmes teneurs pour les huiles essentielles des deux méthodes d'extraction sachant que le thymol est complètement absent dans l'extrait de l'US-HD10. D'autre part, il semble que l'activité antioxydante des HEs de *L.stoechas* est liée à la présence des composés phénoliques. Le rôle principal de ces composants comme réducteur des radicaux libres a été précédemment rapporté (Villano et al., 2001). Le camphre qui est le principal composé dans HEA/HD avec une teneur de 26.53%, à une forte activité antioxydante (Svoboda et al., 1999). Pour cette même HE obtenue avec US-HD, la teneur de camphre prend une valeur de 23.73%, alors que dans le reste des extraits, le camphre est plus abondant dans les HEs obtenus par US-HD.

Très peu d'études ont évalué l'effet de prétraitement par les ultrasons sur l'activité antioxydante des HEs. Annegowda et al. (2012) ont montré que le traitement par ultrasons augmente significativement les composés antioxydants dans les extraits méthanoliques du fruit étoilé comparé aux extraits aqueux, ils affirment que le traitement par ultrasons est une méthode permettant l'amélioration de l'extraction des antioxydants naturels, qui peuvent jouer un rôle important dans la prévention de plusieurs maladies physiologiques et dégénératives chez les consommateurs. De plus du domaine pharmaceutique, pour les domaines alimentaire et cosmétique, Da

porto *et al.* (2009) affirment que l'extraction assistée par ultrasons a non seulement amélioré le rendement de *Lavandula augustifolia*, mais c'est une méthode qui est rapide et fonctionne à basse température, le produit final a généralement montré moins de dégradation thermique que la méthode traditionnelle ou assistée par micro-ondes. Ceci est particulièrement important en cas de nourriture ou de cosmétique car dans ces deux domaines, les huiles essentielles doivent être de haute qualité et de bonne saveur. En raison des différences dans les constituants des différentes essences, différents comportements sont observés dans leurs propriétés antioxydantes, mais en général, le prétraitement par ultrasons a amélioré le pouvoir antioxydant par rapport à la méthode d'hydrodistillation et ces résultats sont cohérents avec les déclarations des chercheurs.

L'activité antimicrobienne des HEs des 04 populations de *L.stoechas* obtenues par HD et US-HD a été signalée comme étant liée spécifiquement à la présence de composés antimicrobiens. Récemment, des tentatives ont été faites pour identifier les composés responsables d'une telle bioactivité. Les molécules oxygénées qui entrent dans la composition des HEs sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées qui sont, par contre, connues pour leurs faibles pouvoirs antimicrobiens (Kalemba *et al.*, 2003). En effet, tous nos extraits obtenus par US-HD ont révélé une activité antimicrobienne plus importante par rapport à celle des extraits obtenus par HD, sauf pour HEA ou le pouvoir antimicrobien des HEs obtenus par HD est légèrement supérieur à celui des HEs obtenus par US-HD (Figure 36). Ces extraits (HEK, HET, HEE et HEA) présentent des teneurs en composés oxygénés (76.38, 83.22, 83.35 et 86.73 %) plus élevées par rapport aux extraits obtenus par HD (76.66, 82.24, 68.84 et 83.2 %) (Tableau 9). Parmi ceux-ci on cite à titre d'exemple, le camphre, le linalol, le 1,8-cinéol (Pattnaik *et al.*, 1997), le carvacrol, l'eugénol, le perillaldehyde (Burt, 2004), le terpinène-4-ol (Carson *et al.*, 2002), l'oxyde de caryophyllène, le spathulénol (Ulubelen *et al.*, 1994), le bornéol (Tabanca *et al.*, 2001), le viridiflorol, le *trans*-pinocarvéol, le lédol (Guinoiseau, 2010) et le myrténal (Angioni *et al.*, 2006) qui manifestent une puissante activité antiseptique.

L'HEE obtenu par US-HD qui présentait le plus fort pouvoir antimicrobien était caractérisée, tout comme les autres HEs, par la présence dominante du fenchone. Le fenchone est, cependant, connu pour être peu, voire pas, actif (Lis-Balchin &

Roth, 2000). Il ne peut donc être responsable des effets générés par les HEs sur les microorganismes. Les travaux de Joshi (2010), ont indiqué que les composés majoritaires peuvent ne pas être nécessairement responsables de l'activité antibactérienne des HEs. Cependant, plusieurs composés connus pour leurs activités antimicrobiennes sont présents dans nos HEs en tant que constituants majoritaires ou minoritaires. De ce fait, nous pouvons suggérer que la bonne activité antimicrobienne des HEs obtenues par US-HD est peut être due à la richesse en camphre et en 1,8-cinéol par rapport aux HEs obtenues par HD, sauf pour HEA/HD où la bonne activité antimicrobienne peut-être due à la richesse en camphre et en bornyl-acetate.

Bien que l'utilisation des ultrasons ait été largement analysée, jusqu'à maintenant l'étude de l'effet de l'extraction par les ultrasons sur le pouvoir antimicrobien des HEs demeure rare. Il a été rapporté que les HEs obtenues par l'extraction assistée aux ultrasons de *Zingiber officinale* Rose, de *Bosenbergia pandurata* Holtt et de *Curouma longa* Linn ont une plus grande activité antimicrobienne envers *Salmonella Typhimurium* et une faible activité antimicrobienne envers *Listeria monocytogenes* par rapport aux HEs obtenues par les méthodes conventionnelles (Thongson et al., 2004). L'application des ultrasons a été utilisée avec succès pour l'inactivation microbienne des échantillons d'aliments ayant une forte teneur en lipides par rapport aux méthodes conventionnelles, avec l'avantage d'application de douces températures qui préviennent la dégradation des composés thermosensibles (Chemat et al., 2011 ; Piyasena et al., 2003). D'autre part, il a été rapporté que l'application des ultrasons a haute intensité pour l'extraction des variétés de composés biologiquement actifs réduits l'activité antimicrobienne d'une manière dépendante du temps et de la puissance (Soria et al., 2010), mais en général, l'ultrason s'est révélée d'être une technique innovante très efficace applicable à de nombreux processus, tel que l'émulsification, la cristallisation, l'homogénéisation, l'hydrolyse, l'extraction et l'inactivation microbienne. Cette technique prometteuse a présenté de nombreux avantages par rapport aux techniques conventionnelles (Pingret et al, 2013).



CONCLUSION

CONCLUSION

Pour faire face à un besoin croissant en produits naturels, spécialement les huiles essentielles (HEs), les procédés industriels permettant leur obtention sont soumis à une amélioration constante de leurs performances. L'optimisation de ces procédés prend alors en compte les critères suivants : l'augmentation du rendement, la qualité des huiles ainsi que la réduction du temps et des coûts de production. De plus, dans un contexte de développement durable, la réduction de la pollution est devenue une nécessité. En outre, une adaptation des procédés est nécessaire pour la production d'huiles essentielles thermosensibles ou contenant des composés d'intérêts thermosensibles.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet du prétraitement par les ultrasons au préalable à l'hydrodistillation sur l'extraction des HEs des parties aériennes fleuries de *Lavandula stoechas* L. sauvage récoltée à partir de quatre sites différents situés au Nord de l'Algérie. Pour atteindre cet objectif, nous avons réalisé, dans un premier temps, une étude de l'extraction des HEs par hydrodistillation, cette méthode conventionnelle représente le procédé de référence. Une extraction par prétraitement aux ultrasons à différents temps (10, 20, 30, 45 et 60 min) est ensuite réalisée dans des conditions opératoires strictement identiques, et comparée à la méthode conventionnelle en matière de rendement, de la qualité organoleptique et physico-chimique ainsi que de la composition chimique des HEs obtenues. Dans un second temps, nous avons évalué le potentiel antioxydant et antimicrobien des HEs des deux techniques d'extraction.

Nos résultats d'extraction montrent que le prétraitement par ultrasons avant hydrodistillation (US-HD) fournit plus d'huiles essentielles de valeur que la méthode traditionnelle d'hydrodistillation (HD). Un prétraitement ultrasonore de *L.stoechas* de Kodiat de 10 min suivi de 90 min d'HD fournit une quantité d'HEs supérieure au double (1.6%) de celle des HEs obtenues par 180 min d'HD (0.64%). Ce même temps de prétraitement a pu fournir, également, un rendement de 1.59% en HEs contre un rendement d'HD de 1.17% pour l'échantillon d'Adekar. 45 min et 60 min de prétraitement par ultrasons ont pu procurer des rendements très importants en HEs (0.78 et 1.03%) par rapport à ceux obtenus par HD (0.62 et 0.5%) pour les

échantillons de Keddara et d'El-kahla, respectivement. En général, ces extraits obtenus par US-HD sont dotés d'une qualité organoleptique plus remarquable.

L'analyse chimique des HEs des parties aériennes fleuries des quatre populations de cette plante : Adekar (HEA), Keddara (HEK), Kodiat (HET) et El-kahla (HEE), obtenues par HD et par US-HD du meilleur temps de prétraitement donnant le meilleur rendement, a été effectuée par GC/MS. Pour ces extraits, nous avons constaté une variabilité chimique importante. Toutes les HEs obtenues par HD et US-HD étaient dominées par le fenchone sauf pour l'HEA obtenues par HD ou le fenchone prenait une deuxième place après le camphre. La teneur de ce composé majoritaire était supérieure dans les extraits obtenus par US-HD à l'exception de l'HEE. Ces HEs sont caractérisées aussi par la présence importante de bornyl acetate, 1,8-cinéol et viridiflorol avec, dans la majorité des cas, une teneur plus importante dans les extraits obtenus par US-HD. Une grande variation qualitative et quantitative de tous les constituants dans les différents échantillons a été observée, donnant lieu à une teneur totale plus intéressante dans les extraits obtenus par US-HD à l'exception des HEK. Une analyse chimique par GC/FID des extraits obtenus par HD et US-HD à tous les temps de prétraitement des HET choisi pour son meilleur rendement a été également réalisée, permettant d'identifier de nouveaux composés. Une variation remarquable des teneurs en composés a été notée entre HD et les différents temps de prétraitement de l'US-HD. La teneur la plus élevée du fenchone et du camphre comme composés majoritaires est obtenue à 60 et 20 min de prétraitement aux US, respectivement. Quant au 1,8-cinéol qui prend la troisième place, sa concentration prend la plus grande valeur dans l'extrait obtenu par HD. Les connaissances acquises sur l'effet du prétraitement par les ultrasons sur le rendement, la qualité et la composition chimique des HEs de *L.stoechas* élargissent davantage les connaissances actuelles sur l'utilisation du prétraitement ultrasonore comme une bonne alternative pour l'extraction des huiles essentielles des herbes. Néanmoins, notre étude confirme également des variations qualitatives et quantitatives entre les différents temps de prétraitement par les ultrasons qui peuvent être exploités selon les besoins des chercheurs et des industries.

L'activité antioxydante des HEs des 04 populations Algériennes sauvages de *L. stoechas* obtenues par HD et US-HD du meilleur temps de prétraitement donnant le

meilleur rendement, a été évaluée par la méthode de DPPH. On a remarqué que nos extraits ont montré des différences significatives d'activité antioxydante. Cependant, ce pouvoir antioxydant demeure faible par comparaison à l'antioxydant de référence (acide ascorbique). Les données de cette étude, montrent que les HEs obtenues par US-HD sont plus efficaces par rapport aux HEs obtenues par HD. L'analyse de ces résultats suggère que cette bonne activité anti-radicalaire des extraits obtenus par US-HD peut être intéressante du fait de la diversité des substances actives qui étaient présentes en quantités plus importantes en comparant avec les extraits obtenus par HD.

L'activité antimicrobienne (CMI) des HEs des 04 populations Algériennes sauvages de *L. stoechas* obtenues par les deux techniques d'extraction : HD et US-HD du meilleur temps de prétraitement donnant le meilleur rendement, a été évaluée *in vitro* envers huit microorganismes pathogènes (bactéries Gram positives, bactéries Gram négatives, moisissures et levure reconnues pour leur impact clinique, sanitaire et économique). En parallèle avec l'activité antioxydante, l'activité antimicrobienne des extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction était très variable en relation avec la variation en composition chimique. Toutes les HEs obtenues par US-HD étaient plus efficaces envers tous les microorganismes sauf pour la moisissure *Fusarium culmorum* qui a présenté plus de sensibilité vis-à-vis des HEs obtenus par HD et pour la bactérie *E.coli* qui a manifesté une sensibilité identique envers les HEs des deux techniques d'extraction. L'extraction par prétraitement aux ultrasons des HEs de *L.stoechas* fournit des extraits plus riches en molécules bioactives dotées d'un pouvoir antimicrobien et peuvent donc avoir un plus grand potentiel applicatif dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaire et de protection des cultures. En outre, cette technique verte offre beaucoup d'avantages à savoir : des temps d'extraction plus courts, un débit de traitement plus élevé avec une consommation moindre d'eau et d'énergie et un taux d'extraction accru sans perte de qualité du produit final. Tous ces avantages font du prétraitement par ultrasons une bonne alternative pour l'extraction des huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales qui pourrait être utilisée à l'échelle pilote et industrielle dans plusieurs secteurs.

Les différentes conclusions obtenues par cette étude de comparaison soulèvent de nouvelles questions, ouvrant ainsi plusieurs perspectives.

- Le prétraitement par les ultrasons est une technique innovante en voie de développement, et afin d'enrichir notre présente étude, il serait important d'élargir l'intervalle des temps de prétraitement par les ultrasons pour l'extraction des HEs afin d'améliorer l'étude de la cinétique d'extraction, d'une part, et l'analyse de l'effet du temps de prétraitement sur la qualité des HEs, d'autre part.
- Les études menées par Chemat et al, (2017) indiquent que les ultrasons provoquent des modifications physiques sur les glandes sécrétrices des HEs, et ce, par comparaison avec une technique conventionnelle, Il serait, donc, intéressant d'approfondir la compréhension de l'effet du temps de prétraitement par les ultrasons sur le comportement des cellules sécrétrices des HEs par une analyse microscopique complémentaire (à chaque temps de prétraitement étudié).
- Les HEs, en tant qu'un produit naturel, constituent une riche source de molécules naturelles pour la découverte de nouveaux médicaments et composés bioactifs d'intérêt. L'extraction de ces composés bioactifs par prétraitement aux ultrasons ainsi que l'effet du temps de prétraitement sur leurs rendements et leurs efficacités pourrait être une bonne perspective à l'origine de beaucoup d'informations complémentaires.
- L'effet antimicrobien et antioxydant des HEs de *L. stoechas* obtenues par prétraitement aux ultrasons devra également être exploré sur un spectre plus large de microorganismes et d'agents responsables de stress oxydatif, en utilisant plusieurs méthodes d'évaluation antimicrobiennes et antioxydantes, ce qui pourra servir de base au développement de nouveaux antibiotiques et antioxydants afin de contribuer à élargir l'arsenal thérapeutique dont nous disposons.
- Les recherches actuelles montrent que la protection de l'homme et de l'environnement nécessite l'utilisation des techniques d'extractions vertes qui ont pour but la réduction de l'exploitation des énergies, des solvants, de l'eau ainsi que la réduction de l'émission du CO₂. A cet effet, la comparaison des nouvelles méthodes et de leurs effets possibles sur la structure chimique des HEs extraites pourrait fournir des informations utiles en termes de possibilités d'approches par rapport à d'autres huiles essentielles similaires.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abert Vian, M., Fernandez, X. et al. (2008). Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography A*. 1190, 14-17.
- Adams, R.P. (2007). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. *Allured Publishing Co.* Illinois. USA.
- Ait-kaci Aourahoun, K., Fazouane, F. et al. (2016). Glandular Hairs and Essential Oils of Stem and Leave from the Promosing Medicinal Legume *Cytisus triflorus* L'Hérit. using Ultrasounds: Comparison with Conventional Hydrodistillation. *Industrial Journal of Natural Sciences*. 6 (35): 10911-10922.
- Aleksovski, S.A. and Sovova, H. (2007). Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *The Journal of supercritical fluids*. 40, 239-245.
- Aligiannis, N., Kalpotzakis, E. et al. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chem*. 40, 4168-4170.
- Allaf, K., Louka, N. et al. (1993). Brevet Français N° 9309726.
- Allaf, T., Tomao, V. et al. (2013). Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20, 239–246.
- Angioni, A., Barra, A. et al. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chem*. 54(12), 4364-4370.
- Anizon, J.Y., Lemaire, B. et al. (2003). Extraction assistée par micro-ondes. *Techniques de l'Ingénieur*, F3060.
- Annegowda, H.V., Bhat, R. et al. (2012). Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *Journal of Food Science and Technology*. 49, 510-514.

- Arnold, N. and Bellomaria, B. (1993). Observations morpho-anatomiques et histochimiques dans les *Salvia willeana* (Holmboe) Hedge et *Salvia fruticosa* Mill. de Chypre. *Flora Mediterranea*. 3, 283-297.
- Asimgil, A. (1997). *Sifali Bitkiler*. İstanbul: Timas Yayınları. pp. 147–148.
- Assami, K., Pingret, D. et al. (2012). Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 62, 99-105.
- Ayala, R.S. and Luque de Castro, M.D. (2001). Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*. 75, 109-113.

B

- Bachelot, C., Blaise, A. et al. (2005). Les huiles essentielles. Licence en BIOLOGIE, U.C.O Bretagne Nord, 27 p.
- Bachiri, L., et al. (2017). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux espèces de lavande : *Lavandula dentata* spp. *dentata* et *Lavandula pedunculata* spp. *pedunculata*. *European Scientific Journal*. 13(21), 293-311.
- Bajalan, I., Rouzbahani, R. et al. (2016). Variation in chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of wild populations of *Phlomis olivieri*. *Chemistry and Biodiversity*. 14(5), 1-8 (e1600444).
- Bakkali, F., Averbeck, S. et al. (2008). Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical toxicology*. 46, 446-475.
- Balachandran, S., Kentish, S.E. et al. (2006). Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*. 13, 471–479.
- Balz, R. (1986). Les huiles essentielles et comment les utiliser. Ed. Rodolphe BALZ. 152 p.
- Barrera Vázquez, M.F., Comini, L.R. et al. (2014). Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae). *Ultrasonics Sonochemistry*. 21, 478-484.

- Basile, A., Jiménez-Carmona, M.M. et al. (1998). Extraction of rosemary by superheated water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 5205-5209.
- Bauer, K., Garbe, D. et al. (1990). *Common Fragrance and Flavor Materials*, VCH Publishers, New York.
- Bayramoglu, B., Sahin, S. et al. (2008). Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*. 88, 535-540.
- Baytop, T. (1999). *Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present)*. No. 3255 (2nd ed., pp. 244-245). Istanbul: Publications of the Istanbul University.
- Belaiche, P. (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. *Edition Maloine-S-S, tome I*. Beloued. pp 54 -70.
- Ben Amor, B. (2008). Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs; texturation par détente instantanée contrôlée DIC. Thèse de Doctorat de l'université de la Rochelle, France. 187p
- Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes Aillées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato, un Complexe d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique. Thèse de Doctorat de l'école Normale Supérieure de Kouba, Alger-Algerie, 259p.
- Benabdelkader, T., Zitouni, A. et al. (2011). Essential Oils from Wild Populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: Composition, Chemical Variability, and in vitro Biological Properties. *Chem. Biodivers.* 8(5), 937-953.
- Bendahou, M., Muselli, A. et al. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food chemistry*. 106,132-139.
- Bicchi, C. and Pisciotta, A. (1990). Use of two-dimensional gas chromatography in the direct enantiomer separation of chiral essential oil components. *Journal Chromatography A*. 508, 341-348.
- Boelens, M. H. (1995). Chemical and sensory evaluation of *Lavandula* Oils. *Perfume and Flavor*. 20, 23-51.

- Boelens, M. H. and van Gemert, L. J. (1993). Volatile character-impact sulfur compounds and their sensory properties. *Perfume and Flavor*. 18, 29-39.
- Bohm, H., Boeing, H. et al. (1998). Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z. Ernährungswissenschaft*. 37(2), 147-63.
- Bosabalidis, A. M. and Sawidis, T. (2014). Glandular and non-glandular hairs in the seasonally dimorphic *Origanum dictamnus* L. (Lamiaceae) as a means of adaptation to cold stress. *Acta Agrobotanica*. 67(1), 15-20.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A. et al. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161, 839-851.
- Bousbia, N., AbertVian, M. et al. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*. 90, 409-413.
- Bousbia, N., AbertVian, M. et al. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*. 14, 355-362.
- Boutemak K. (2011). Contribution à l'étude des procédés d'extraction conventionnels et innovants appliqués à la récupération de l'huile essentielle de l'armoise blanche d'Algérie *Artemisia herba ALBA*. Thèse de Doctorat de l'université de Blida, Algérie. 173p.
- Brat, P. (2001). Application d'un nouveau procédé d'extraction (jus, pulpe, huile essentielle): la flash-détente. *Fruittrop*. 85, 11-13. Journée professionnelle Techno-fruits. Montpellier, France. < <http://technofruits2001.cirad.fr> >
- Brat, P. (2001). Application du procédé de flash-détente sous vide aux fruits tropicaux et méditerranéens pour la préparation de purées et huiles essentielles. Thèse de Doctorat de l'Université de la Réunion, 137p.
- Brat, P. Ollé, D. et al. (2001). Essential oils obtained by flash vacuum-expansion of peels from lemon, sweet orange, mandarin and grapefruit. *Fruits*. 56, 395-402.
- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Lavoisier. Paris. pp. 405-426.

- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Ed. TEC & DOC. Lavoisier. Paris.
- Buess-Herman, C., Dumont, F. (2003). Principe d'analyse instrumentale. Edition DeBoeck Université. 1^{ère} édition. 968p.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94, 223-253.
- Buyukokuroglu, M. E., Gepdiremen, A. et al. (2003). The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *Journal of Ethnopharmacology*. 84(1):91-4.

C

- Carrasco, A., Ortiz-Ruiza, V. et al. (2015). *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography–mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Industrial Crops and Products*. 73, 16–27.
- Carson, C. F., Mee, B. J. et al. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46(6), 1914-1920.
- Casabianca, H. and Graff, J. B. (1994). Separation of linalyl acetate enantiomers: Application to the authentication of bergamot food products. *Journal of High Resolution Chromatography*. 17, 184-186.
- Cavanagh, H. M. A., and Wilkinson, J. M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research*. 16, 301-308.
- Chemat, F., Tomao, V. et al. (2008). Ultrasound-assisted extraction in food analysis. In handbook of food analysis instruments by semih otles. Boca Raton, Florida, USA: CRC press. pp. 85-103.
- Chemat, F., Abert Vian, M. et al. (2009). Microwave Isolation of Essential oils. In Essential Oils and Aromas Green Extractions and Applications. *Har Krishan Bhalla & Sons*. India.

- Chemat, F., Lucchesie, M.E. et al. (2004). Solvent Free Microwave Extraction of volatile natural substances. US 0187340 A1.
- Chemat, F., Rombaut, N. et al. (2017a). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrasonics Sonochemistry*. 34, 540-560.
- Chemat, F., Rombaut, N. et al. (2017b). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 41: 357- 377.
- Chemat, F., Smadja, J. et al. (2003). Solvent Free Micro-wave extraction of volatile natural compound. EP 1 439218 B1.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, et al. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. 18(4), 813-835.
- Chemat, F., Vian, M. et al. (2008). Microwave hydrodiffusion for isolation of natural products. EP 1 955 749 A1.
- Chen, F., Sun, Y. et al. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14, 767-778.
- Chen, J., Chen, Y. et al. (2010). Physical and chemical effects of ultrasound vibration on polymer melt in extrusion. *Ultrasonics Sonochemistry*. 17, 66-71.
- Cravotto, G. and Cintas, P. (2007). The combined use of microwaves and ultrasound: improved tools in process chemistry and organic synthesis. *Chemistry*. 13, 1902-1909.
- Cravotto, G., and Binello, A. (2010). Innovative techniques and equipments for flavours extraction. Application and effectiveness of ultrasound and microwaves. *Household Personal Care Today*. 1, 32-34.
- Cravotto, G., Boffa, L. et al. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15, 898-902.

D

- Da Porto C. and Decorti, D. (2009). Ultrasound-assisted extraction coupled with under vacuum distillation of flavor compounds from spearmint (carvone-rich) plants: Comparison with conventional hydrodistillation. *Ultrasonics Sonochemistry*. 16, 795-799.
- Danh, L.T., Mammucari, R. et al. (2009). Response surface method applied to supercritical Carbon dioxide extraction of *Vetiveria Zizanioides* essential oil. *Chemical Engineering Journal*. 155, 617-626.
- Debra, A., Pearson, H. H. S. et al. (2001). Inhibition of in vitro low density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas. *Methods in Enzymology*. 335, 2001. 350-60.
- Dedet, J.P. (2007). La microbiologie, de ses origines aux maladies émergentes. Ed. Dunod. Paris. 889p.
- Dhobi, M., Mandal, V. et al. (2009). Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan-silybinin. *Journal of Chemical Metrology*. 3(1), 13-23.
- Djenni, Z., Pingret, D. et al. (2012). Sono–Soxhlet: in situ ultrasound assisted extraction of food products. *Food and Analytical Methods*. 6, 1229–1233.
- Donelian, A., Carlson, L.H.C. et al. (2009). Review: Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon Cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. *The Journal of supercritical fluids*. 48, 15-20.

E

- Eberlin, T. (1997). Les Infections Microbiennes, Tome1: Agents Infectieux. Nathan Université, Paris.
- Ebrahimzadeh, H., Yamini, Y. et al. (2003). Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extracts of *Zataria multiflora* boiss. *Food Chemistry*. 83, 357-361.
- Elhajili, M., Baddouri, K. et al. (2001). Diuretic activity of the infusion of flowers from *Lavandula officinalis*. *Reproduction Nutrition Development*. 41(5):393-9.

F

- Ferhat, M.A., Meklati, B.Y. et al. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance journal*. 22, 494-504.
- Fernández-Pérez, V., Jiménez-Carmona, M. M. et al. (2000). An approach to the static-dynamic subcritical water extraction of laurel essential oil: Comparison with conventional techniques. *The Analyst*. 125, 481- 485.
- Formáček, V. and Kubeczka, K. H. (1982). *Essential Oil Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy*, John Wiley and Sons, Chichester.
- Franchomme, P., Pénoel, D. et al. (2001). L'aromathérapie exactement (Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques). Ed. Roger Jollois. 490p.

G

- Gámez, M. J., Jimenez, J. et al. (1987). Hypoglycemic activity in various species of the genus *Lavandula*. I: *Lavandula stoechas* L. and *Lavandula multifida* L. *Pharmazie*. 42, 706-707.
- Gàmiz-Gracia, L., Luque De Castro, M.D. (2000). Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*. 51, 1179-1185.
- Ganzler, K., Salgo, A. et al. (1986). Microwave extraction- a novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*. 371, 299-306.
- Garnero, J. (2003). les huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, K345.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., et al. (1999). Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica*. 65(8): 700-3.
- Giray, E. S., Kırıcı, S. et al. (2008). Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta*. 74, 930-935.
- Glisic, S., Ivanovic, J. et al. (2010). Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, Chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids*. 52, 62-70.

- Glisic, S.B., Mistic, D.R. et al. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of carrot essential oil. Chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 105, 346- 352.
- Goetz, P. (2004). Plaidoyer pour la tisane médicinale. *Phytothérapie*. 1, 8-15.
- Golmakani, M.T. and Rezaei, K. (2008). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*. 109, 925-930.
- Golmakani, M.T. and Rezaei, K. (2008). Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* boiss. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 110, 448-454.
- González-Coloma, A. Martín-Benito, D. et al. (2006). Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 609-616.
- Granger, R., Passet J. et al. (1975), Sur les essences dites de "Marjolaine" *Riv. Ital. Essenza Profumi Plante Officinal. Rivista italiana essenze, profumi, piante officinali, aromi, saponi, cosmetici, aerosol.* 57, 199-208.
- Grice, H. C. (1986). Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food and Chemical Toxicology*. 24, 1127-1130.
- Grosso, C., Ferraro, V. et al. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chemistry*. 111, 197-203.
- Guenther, E. (1972). The essential oils. *Ed. Robert Krieger publishing Co. H. Huntington*. New York.
- Guinoiseau, E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'université de Corse. 148p.
- Guyot-Declerck, C., Renson, S. et al. (2002). Floral quality and discrimination of *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia*, and *Lavandula angustifolia x latifolia* honeys. *Food Chemistry*. 79, 453-459.

H

- Haddouchi, F. et Benmansour, A. (2008). Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de Laboratoire*. 8, 20-27.

- Hajhashemi, V., Ghannadi, A. et al. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*. 89(1), 67-71.
- Hamburger, M., Baumann, D. et al. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants- effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis*. 15, 46-54.
- Hedges, L. M. and Wilkins, C. L. (1991). Component analysis of eucalyptus oil by gas chromatography-fourier transform-infrared spectrometry-mass spectrometry. *Journal of Chromatography Sciences*. 29, 345-350.
- Herrero, M., Cifuentes, A. et al. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, Food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chemistry*. 98, 136-148.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. et al. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoïds of tea infusions, wine and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41, 1242-1246.
- Husnu, K. C. B. and Gerhard, B. (2010). Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. *Taylor and Francis Group*. NW.

I

- Iserin, P. (1997). Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparation et soins. *Larousse- Bordas*. pp 1-130.

J

- Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N. et al. (2016). Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green Chemistry*. 18(10), 3106-3115.
- Jiménez-Carmona, M.M., Ubera, J.L. et al. (1999). Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. *Journal of Chromatography A*. 855, 625-632.
- Joshi, R.K. (2010). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Craniotome furcata*. *Journal of Applied and Natural Science*. 2(1), 57-62.

K

- Kabera, J., Koumaglo, K.H. et al. (2005). Caractérisation des huiles essentielles d'*Hyptis spicigera* Lam., *Pluchea ovalis* (Pers.) DC. et *Laggera aurita* (L.F.) Benth. Ex. C.B. Clarke. plantes aromatiques tropicales. In série Sciences exactes, naturelles et appliquées. Etudes rwandaises. 10, 7-18.
- Kalemba, D. and Kunicka A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10, 813-829.
- KAR, A. (2007). Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie. 2eme Ed. New Age International Publishers. p: 1-30.
- Khajeh, M., Yamini, Y. et al. (2004). Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 86, 587-591.
- Khajeh, M., Yamini, Y. et al. (2010). Comparison of essential oils compositions of *Nepeta persica* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation methods. *Food and Bioproducts Processing*. 88, 227-232.
- Khosravi, M., Mortazavi, S.A. et al. (2013). Comparison of ultrasound assisted and Kelavenger extraction methods on efficiency and antioxidant properties of Fennel's oil essence and its optimization by response surface methodology. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 5 (21), 2521-2528.
- Kim, N. S. and Lee, D. S. (2002). Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 982, 31-47.
- Kimbaris, A.C., Siatis, N.G. et al. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*. 13, 54-60.
- Krishnan, V.C.A., Kuriakose, S. et al. (2015). Ultrasound assisted extraction of oil from rice bran: A response surface methodology. *Journal of Food Processing and Technology*. 6(6), 454-461.

L

- Lang, Q., Wai, S.M. (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies- A practical review. *Talanta*. 53, 771-782.

- Lee, K.G. and Shibamoto T. (2002). Determination of antioxidant potential of volatil extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(17), 4947-52.
- Legrand, G. (1994). Manuel du préparateur en pharmacie a l 'usage des élèves préparateurs, et étudiants stagiaires en pharmacie. *Edition : Elsevier Masson*. Paris. pp 1-20.
- Lertsatitthanakorn, P., Taweechaisupapong, S. et al. (2006). *In vitro* bioactivities of essential oils used for acne control. *International Journal of Aromatherapy*. 16, 43-49.
- Lewith, G. T., Godfrey, A.D. et al. (2005). A single-blinded, randomized pilot study evaluating the aroma of *Lavandula angustifolia* as a treatment for mild insomnia. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 11(4):631-7.
- Lis-Balchin, M. (2002). *Lavender, the genus Lavandula*. London & New York: Taylor and Francis, 268p.
- Lis-Balchin, M. and Hart, S. (1999). Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytotherapy Research*. 13(6):540-2.
- Lis-Balshin, M. and Roth, G. (2000). Composition of the essential oils of *Pelargonium odoratissimum*, *P. exstipulatum* and *P. x fragras* (*Geraniaceae*) and their bioactivity. *Flavour and Fragranc Journal*. 15, 391-394.
- Lucchesie, M. E. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : Conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat de l'Université de la Réunion, 142p.
- Lucchesie, M.E., Chemat, F. et al. (2004). Solvent-Free microwaves extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*.1043, 323-327.
- Lucchesie, M.E., Chemat, F. et al. (2004). Solvent-Free microwaves extraction of essential oil from spices. *Flavour and Fragrance Journal*, 19,134-138.
- Lucchesie, M.E., Smadja, J. et al. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elleteria cardamom* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*. 79,1079-1086.

- Luque De Castro, M.D. & Jiménez, C. M. M. (1998). Potential of water for continuous automated sample leaching. *Trends in Analytical Chemistry*. 17, 441-447.
- Luque De Castro, M.D. Jiménez-Carmona, M.M. (2000). Where is supercritical Fluid extraction going. *Trends in analytical chemistry*. 19, 223-228.
- Luque de Castro, M.D., Jiménez-Carmona, M.M. et al. (1999). Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends in Analytical Chemistry*. 18, 708-716.
- Luque-Garcia J.L. and Luque de Castro M.D. (2004). Ultrasound-assisted soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment: application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*. 1034, 237–242.
- Luque-Garcia, J.L. and Luque de Castro, M.D. (2003). Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*. 22, 41-47.

M

- Mahmoudi, Y. (1982). *La thérapeutique par les plantes communes en Algérie*. Blida, Algérie: Palais de livre. pp. 55-58.
- Martini, M.C. et Seiller, M. (1999). Actifs et additifs en cosmétologie. 2^{ème} éditions, TEC & DOC. Lavoisier. Paris.
- Mengal, P. et Mompon, B. (1994). Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. FR 2 705 035.
- Mesplède, J. (2004). Chimie MP-PT. Les nouveaux précis, Ed. Bréal. France. 223 p.
- Metaxas, A.C. and Meredith, R.J. (1983). Industrial Microwave Heating. *Peter Peregrinus Ltd*. London.
- Meullemiestre, C., Breil, M. et al. (2016). Microwave, ultrasound, thermal treatments, and bead milling as intensification techniques for extraction of lipids from oleaginous *Yarrowia lipolytica* yeast for a biojetfuel application. *Bioresource Technology*. 211, 190-199.
- Miller, D.J. and Hawthorn, S.B. (2000). Solubility of liquid organic flavour and fragrance compounds in subcritical (hot/liquid) water from 298 to 473 K. *Journal of Chemical Engineering Data*. 45, 315-318.

- Mnayer, D. (2014). Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens. Thèse de Doctorat de l'université d'Avignon. 142p.
- Mohammad, H.E., Fereshteh, G. et al. (2007). Subcritical water extraction of essential oil from coriander seeds (*Coriandrum sativum L.*). *Journal of Food Engineering*. 80, 735-740.
- Mohsen, G., Asgar, F. et al. (2012). Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oil from *Thymus vulgaris L.* *Journal of Innovative Food Science and Emerging Technology*. 14, 85-91.
- Moon, T., Wilkinson, J.M. et al. (2006). Antiparasitic activity of two *Lavandula* essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitology Research*. 99(6), 722-8.
- Motomura, N., Sakurai, A. et al. (2001). Reduction of mental stress with lavender odorant. *Perceptual and Motor Skills*. 93(3):713-8.
- Mousavi, S.A.A.A., Feizi, H. et al. (2007). Madoliat, Investigations on the effects of ultrasonic vibrations in the extrusion process. *J. Mater. Proc. Technol.* 188, 657-661.
- Mullakaev, M.S., Volkova, G.I. et al. (2015). Effect of ultrasound on the viscosity-temperature properties of crude oils of various compositions. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 49(3), 287-296.

N

- Nadkarni, K. M. (1982). *Indian Materia Medica*, third ed. Popular Prakashan, Bombay, p.730.
- Nashwa, F. S.M. (2015). A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom (*Elettaria cardamomum L. Maton*) essential oil using ultrasound as a pretreatment. *Industrial Crops and Products*. 65, 287-292.
- Normes AFNOR. (1992). Recueil des normes françaises, huiles essentielles. AFNOR. Paris.

O

- Okoh, O.O., Sadimenko, A.P. et al. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *rosmarinus officinalis L.* obtained

by hydrodistillation and solvent free microwave methods. *Food Chemistry*. 120, 308-312.

- Okuda, T., Yoshida, T. et al. (1989). Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med.* **55**(117), 122.

P

- Padrini, F., & Lucheroni, M. T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles : Guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'arôme-massage énergétique avec plus de 100 photographies. *Ed. De Vecchi*, 15 p.
- Palma, M. and Barroso, C.G. (2001). Ultrasound assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytical Chemistry*. 458, 119-130.
- Panzer, S., Peschel, O. et al. (2014). Reconstructing the Life of an Unknown (ca. 500 Years-Old South American Inca) Mummy- Multidisciplinary Study of a Peruvian Inca Mummy Suggests Severe Chagas Disease and Ritual Homicide, *PLoS ONE*. 9(2): e89528.
- Paré, J.R.J. (1992). Microwave assisted process for extraction and apparatus therefore. *Brevet canadien*, CA 2055390.
- Paré, J.R.J. (1994). Microwave extraction of volatile oils. *Brevet américain*, US 5 338557.
- Paré, J.R.J., Sigouin, M. et al. (1990). Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet européen*, EP 398798.
- Paré, J.R.J., Sigouin, M. et al. (1991). Microwave assisted natural product extraction. *Brevet américain*, US 5 002 784.
- Paris, H. and Moyse, R. R. (1976). Précis de matière médicale, 2ème ed (tome1), *Masson et Cie*. Paris.
- Paton, A. J., Springate, D. et al. (2004). Phylogeny and evolution of basils and allies (*Ocimeae*, *Labiatae*) based on three plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31, 277-299.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R. et al. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*. 89, 39-46.

- Périno-Issartier, S., Ginies, C. et al. (2013). A Comparison of Essential Oils Obtained From Lavandin via Different Extraction Processes: Ultrasound, Microwave, Turbohydrodistillation, Steam and Hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*. 1305, 41-47.
- Petigny, L., Perino, S. et al. (2013). Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *International Journal of Molecular Sciences*. 14(3), 5750-5764.
- Pharmacopée européenne 1. (1996). conseil de l'Europe. Maison neuve S. A. Editions, Sainte Ruffine.
- Phutdhawong, W., Kawaree, R. et al. (2007). Microwave-Assisted Isolation of Essential oil of *Cinnamomum iners* Reinw. ex Bl.: Comparison with conventional Hydrodistillation. *Molecules*. 12, 868-877.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S. et al. (2012). Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple pomace. *Journal of Food Engineering*. 111, 73-81.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S. et al. (2013a). An improved ultrasound Clevenger for extraction of essential oils. *Food Analytical Methods*. 7, 9–12.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., et al. (2013b). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*. 31, 593-606.
- Piyasena, P., Mohareb, E. et al. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 87(3), 207-216.
- Priego-Capote, F. and Luque de Castro, M.D. (2004). Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (9), 609-676.

R

- Raynaud, J. (2006). Prescription et conseil en Aromathérapie. éditions TEC & DOC. Lavoisier. Paris.
- Reverchon, E. and De Marco, I. (2006). Supercritical Fluid extraction and fractionation of natural matter – A review. *The Journal of supercritical fluids*. 38, 146-166.

- Rezvanpanah, S., Rezaei, K. et al. (2008). Use of microwave-assisted hydrodistillation to extract the Essential Oils from *Satureja hortensis* and *Satureja Montana*. *Food Science and Technology Research*. 14, 311-314.
- Rezzoug, S.A., Baghdadi, M.W. et al. (1998). Study of a new extraction process: Controlled instantaneous decompression. Application to the extraction of essential oil from rosemary leaves. *Flavour and fragrance journal*. 13, 251-258.
- Rezzoug, S.A., Boutekedjiret, C. et al. (2005). Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 71, 9-17.
- Richter, G. (1993). « Métabolisme des végétaux » Physiologie et biochimie, Presses polytechniques et universitaires. Romandes, 292p.
- Roldàn-Gutiérrez, J.M., Ruiz-Jiménez, J. et al. (2008). Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. *Talanta*, 75, 1369-1375.
- Romdhane, M., Gourdan, C. (2002). Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*. 87, 11-19.
- Roussy, G. and Pearce, J.A. (1995). Foundations and Industrial Applications of Microwaves and Radio Frequency Fields. *John Wiley & Sons Ltd*. Chichester.
- Ruberto, G. and Baratta, M. T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 69, 167-174.

S

- Sahraoui, N., Abert Vian, M. ET AL. (2008). Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils. Comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*. 1210, 229-233.
- Said, H. M. (1996). *Medicinal Herbs*, Vol. 1., Bait al-Hikmah, Madinat al-Hikmah: Pakistan.

- Sanchez-Prado, L., Garcia-Jares, C. et al. (2010). Microwave-assisted extraction : Application to the determination of emerging pollutants in solid samples. *Journal of Chromatography A*. 1217, 2390-2414.
- Santos, H.M., Lodeiro C. et al. (2009). The Power of Ultrasound. *Capelo-Martinez J.L Ed .Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinhei, p.1-16.
- Sherwin, E. R. (1990). Antioxidants, In: Food Additives. *Eds. Branen, A.L., Davidson, P.M. and Salminen, S*. Marcel Dekker, New York, pp. 139-193.
- Sibel, K., Sedef, N. et al (2012). Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary. *Journal of Food Science Technology*. 51(6), 1056-65.
- Simonpoli, P. (1993). In Arburi, Arbigliule, Savoirs populaires sur les plantes de corse. Parc Naturel Regional de la Corse, Ajaccio, Corsica.
- Skoula, M., Abidi, C. et al. (1996). Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*. 24, 255-260.
- Smadja, J. (2009). Essential Oils: Chemical Composition and Localization in Essential Oils and Aromas, Green Extractions and Applications. *Farid Chemat editor. Har Krishan Bhalla&Son*, India.
- Smallfield, B. (2001). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*, 45, 1- 4.
- Sökmen, A., Gulluce, M. et al. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*. 15, 627-634.
- Soria, A. C. and Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21, 323-331.
- Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E. et al. (2004). Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1025, 105-113.
- Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E. et al. (2004). 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. *Journal of Chromatography A*, 1025, 93-103.
- Sulborska, A. (2013). Structure and distribution of glandular and non-glandular trichomes on above-ground organs in *Inula helenium* L. (Asteraceae). *Acta Agrobotanica*. 66 (4), 25-34.
 - Suslick, K. (1989). The chemical effects of ultrasound. *Scientific American*, 138, 88-93.
 - Svoboda, K. and Svoboda, T. (2000). Secretory structures of aromatic and medicinal plants. Ed. Microscopix Publications. p: 7-12.
 - Svoboda, K.P. and Hampson, J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland UK., KA6 5HW.

T

- Tabanca, N., Kırimer, N. et al. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. *Journal Agrocultural and Food Chemistry*. 49, 4300-4303.
- Tajidin, N.E., Ahmad, S.H. et al. (2012). Chemical Composition and Citral Content in Lemongrass (*Cymbopogon Citratus*) essential oil at three maturity stages. *International Journal of Biotechnology*. 11(11), 2685-2693.
- Tavakolpour, Y., Moosavi-Nasab, M. et al. (2016). Comparison of Four Extraction Methods for Essential Oil from *Thymus daenensis* Subsp. *Lancifolius* and Chemical Analysis of Extracted Essential Oil. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(4), e13046.
- Teissedre, T. L., Frankel, E. N. et al. (1996). Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wine. *J. Sci. Food Agr.* 70, 55-61.
- Thakral, J., Borar, S. et al. (2010). Antioxidant Potential Fractionation from Methanol extract of Aerial Parts of *Convolvulus arvensis* Linn. (*Convolvulaceae*). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2, 219-223.

- Thongson, C., Davidson, P.M. et al. (2004). Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Letters in Applied Microbiology*. 39, 401-406.
- Tigrine-Kordjani, N., Meklati, B.Y. et al. (2006). Microwave 'dry' distillation as a useful tool for extraction of edible essential oils. *The International Journal of Aromatherapy*. 16, 141-147.

U

- Ulubelen, A., Topcu, G. et al. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*. 36, 971-974.
- Upson, T. and Andrews, S. (2004). The genus *Lavandula*. Portland and Oregon, USA: Timber Press. p 442.
- Usmanghani, K., Saeed, A. et al. (1997). *Indusynic Medicine. Traditional Medicine of Herbal, Animal and Mineral Origin in Pakistan*, University of Karachi, (1997). University of Karachi Press, p 273.

V

- Valcaracel, M., Tena, M.T. (1997). Applications of supercritical Fluid extraction in food analysis. *Fresenius' Journal of analytical Chemistry*. 358, 561-573.
- Van den Dool, H., and Kratz, P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 11, 463- 471.
- Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S. et al. (2001). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71, 230–235.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8, 303-313.
- Vinatoru, M., Toma, M. et al. (1999). Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from plants and their constituents. *T.J. Mason TJ, editor. Advances in Sonochemistry. JAI Press*. p. 209-248.
- Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A. et al. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 2800-2802.

W

- Wang, H., Liu, Y. et al. (2010). Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. *Journal of Industrial Crops and Product*. 36, 229-237.
- Wang, L. and Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & technology*. 17, 300-312.
- Wenqiang, G., Shufen, L. et al. (2007). Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry*. 101, 1558-1564.
- Wichi, H. P. (1988). Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chemical Toxicology*. 26, 717-723.
- Wichtl, M., et Anton, R. (2003). Plantes thérapeutiques. 2ème éditions. TEC & DOC. *Lavoisier*. Paris. 692 p.

Y

- Yamini, Y., Khadjeh, M. et al. (2008). Comparison of essential oil compositions of *Salvia mirzayanii* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*. 108, 341-346.



ANNEXES

The Effect of Ultrasound Pre-treatment on the Yield, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil from Wild *Lavandula stoechas* L.

Chekoual Lilia ^{1, 2}, Aissat Abdelkader ¹,
Ait-Kaci Aourahoun Karima ³, Benabdelkader Tarek ⁴

¹ Laboratory of Biotechnology of Aromatic and Medicinal Plants (BPAM),
Department of Biotechnology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of
Blida1 (09000), Algeria

² Laboratory of Organic Chemistry, Department of Process Engineering, Faculty
of Engineering Sciences, University of Boumerdes (35000), Algeria

³ Research Laboratory of Food Technology, Faculty of Engineering Sciences, University of
Boumerdes (35000), Algeria

⁴ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Boumerdes (35000), Algeria

Received 12 July 2017; accepted in revised form 23 January 2018

Abstract: In this present work, the aim is to evaluate the effect of different times of ultrasound pre-treatment prior to hydrodistillation (US-HD) on the yield, chemical composition and antioxidant activity of essential oils of two wild *Lavandula stoechas* L. from the North of Algeria. The results indicate that ultrasound treatment engenders a rapid release of essential oils (1.59 %) recovery after only 10 min of sample of Adekar treated by ultrasound and followed by 90 min of hydrodistillation (HD) versus 180 min of hydrodistillation of untreated sample (1.17 %). However, the yields of Keddara sample treated by 45 min versus untreated samples were 0.87 % versus 0.62 %. 94.30 % and 88.26 % of total compounds were identified using chromatography- mass spectrometry (GC-MS) in samples of Adekar and Keddara treated by ultrasound versus untreated samples (92.64 % and 88.75 % respectively). A difference in chemical composition between the essential oils of the two harvesting sites and between the extracts obtained by HD and by US-HD was found. The percentage of the most of the major compounds (fenchone, camphor, 1,8-cineole, bornyl-acetate, myrtenyl-acetate and viridiflorol) and other compounds identified is higher in treated *L. stoechas* L. than untreated *L. stoechas* L. The study of antioxidant power was carried out by 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. The results showed that antioxidant power of treated samples is superior to antioxidant power of untreated samples. Antioxidant activity of both samples (treated and untreated) is less effective compared with antioxidant activity of ascorbic acid.

Key words: Ultrasound pre-treatment, *Lavandula stoechas* L. essential oil, yield, GC-MS, antioxidant activity.

Introduction

Belonging to the genus *Lavandula*, of the *Lamiaceae* family, *Lavandula stoechas* L. occurs naturally in Mediterranean countries. Its essential oils rich in bioactive compounds with intense and pleasant aroma are the cause of their

wide use in medicine, pharmaceutical preparations, food industries, cosmetics and perfumery. Up to now, several conventional extraction techniques have been reported for the extraction of essential oils from *L. stoechas* like Hydrodistillation (HD). These conventional extraction techniques may

*Corresponding author (Chekoual Lilia)

E-mail: <chekoual.lilia@gmail.com >

♥ 2018, Har Krishan Bhalla & Sons

either cause the degradation of the targeted compounds due to high temperature and long extraction times. In recent years, various novel extraction techniques have been developed and the use of ultrasound sonication has opened up some great expectations with a promising results. Different plant extracts and bioactive metabolites have been obtained with this technique^{19,23}. Ultrasound assisted extraction utilizes acoustic cavitation to cause molecular movement of solvent and sample, offering advantages like improved efficiency, high level of automation, reduced extraction time and energy consumed and contribute to environmental preservation by reducing the use of water and solvents, elimination of wastewater, fossil energy and generation of hazardous substances, as compared to conventional extraction techniques^{11,13,18}. In this direction, for the first time, various pre-treatment times by ultrasound before hydro distillation (US-HD) have been used for the extraction of essential oil from *L. stoechas* in order to develop a more advantageous alternative in terms of quality and quantity of essential oils. This study evaluates the effect of ultrasound treatment of *L. stoechas* on extraction time, yield, chemical composition and antioxidant activity.

Materials and methods

Plant material

The flowering tips of *L. stoechas* were collected at maximum flowering stage in April 2014, from wild populations located in two regions in northern Algeria: Keddara (Location: Boumerdes, Latitude: 36°39'0 N, Longitude: 3°24'35 E, Altitude: 644 m, Slope: > 15 %) and Adekar (Location: Bejaia, Latitude: 36°42'44 N, Longitude: 4°34'20 E, Altitude: 86 6m, Slope: > 15 %). The botanical authentication was performed at the herbarium of the Botany Department of National School of Agriculture (Algiers), where voucher specimen was deposited. The plant material was washed and dried in the dark and well-ventilated area at room temperature and stored in paper bags.

Hydrodistillation procedure (HD)

50 g of the ground flowering tips of the plant were hydrodistilled for 180 min using a modified Clevenger-type apparatus according to the Euro-

pean Pharmacopoeia. The essential oils were collected, dried with anhydrous Na₂SO₄ and stored at 4°C until analysis. Extractions were performed at least three times, and the mean values are reported.

Ultrasound assisted extraction prior Hydro distillation (US-HD)

Ultrasounds were applied on the plant materials as a pre-treatment before hydrodistillation according to Ait-kaci Aourahoun, *et al.*² methodology. 50 g of the ground flowering tips was mixed with 0.8 L deionized water in Erlenmeyer flask. The mixture was submitted to ultrasound at the fixed-frequency of 26 kHz for different times: 10, 20, 30, 45 and 60 min. A glass rod was used for homogenization of the mixture. The resulted treatments following different times were then hydrodistilled for 90 min. For applying ultrasonic waves, an ultrasound cleaning bath (pulse system 270, Italy, 26 kHz, 150 W) was used. To ensure a rigorous comparison, the same glassware and same operating conditions were used for conventional Hydrodistillation. The procedure was performed at least three times, and the mean values are reported.

GC-MS analysis

To evaluate the effect of ultrasonic pre-treatment of *L. stoechas* flowering tips on the chemical composition of distilled oils, AEO and KEO samples obtained at 10 min and 45 min of ultrasonic pre-treatment extraction, respectively, were chosen for their high efficiency. The qualitative and semi-quantitative analysis of essential oil samples were carried out using a Hewlett Packard Agilent 6890N gas chromatograph (GC) coupled to a 5973 mass spectrometer (MS) detector and equipped with a fused-silica-capillary column with a non-polar stationary phase HP-5MS™ (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness). GC-MS were obtained using the following conditions: carrier gas He; flow rate 1 ml/min; split 1:30; injection volume 1 μl; injection temperature 250°C; oven temperature progress from 50°C to 290°C at 3°C/min; the temperature of the mass spectrometer (280°C), ion source (230°C), quadrupole (150°C). The ionization mode used was

electronic impact at 70 eV.

Retention indices (RI) were calculated for all constituents related to the retention time (TR) of n-alkanes that were analyzed under the same chromatographic conditions³⁰. The identification of the essential oil constituents was based on the comparison of the mass spectra with those of the NIST05 and NIST libraries (computer matching) and published mass spectra¹. The identification was confirmed by comparing the RI with those of previously published RI¹.

DPPH Free radical-scavenging activity

The antioxidant capacity of the *L. stoechas* essential oils was performed using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging assay as previously described by Thakral *et al.*²⁹. Briefly, 1 ml of different concentrations of the essential oils (200, 400, 600, 800, and 1000 µg/ml) were added to 1 ml of 0.1 mM ethanol solution of DPPH and incubated in obscurity at 27°C during 30 min. The disappearance of the DPPH radical was read spectrophotometrically at 517 nm against a blank (EtOH solution). DPPH radical-scavenging activity, expressed as inhibition percentage (I%), was calculated using the following formula:

$$I \% = \left[\frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{blank}}} \right] \times 100$$

Where A_{blank} is the absorbance of the control

reaction containing all reagents except the essential oil and A_{sample} is the absorbance of the test reaction containing also the oil. Ascorbic acid was used as a reference antioxidant. The $EC_{50(\text{DPPH})}$ value (µg/ml) represented the concentration of essential oil that scavenged 50% of the DPPH radicals and was used as an estimate of the radical-scavenging activity. It was calculated from the plot of I% against the essential oil concentrations. All tests were carried out in triplicate and the $EC_{50(\text{DPPH})}$ values were reported as means ± SD.

Statistical analysis

Results of essential oil yield and antioxidant activity are reported as mean ± SD. Significant differences between the means was made by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's pair wise test. Differences with $P < 0.05$ were considered statistically significant

Results and discussion

Effect of ultrasonic pre-treatment time on the yield

Figure 1 shows the influence of pre-treatment time by ultrasound on the yield of essential oils of *L. stoechas* from harvesting regions Adekar (AEO) and Keddara (KEO). Samples showed different yield extraction profiles. Adekar *L.*

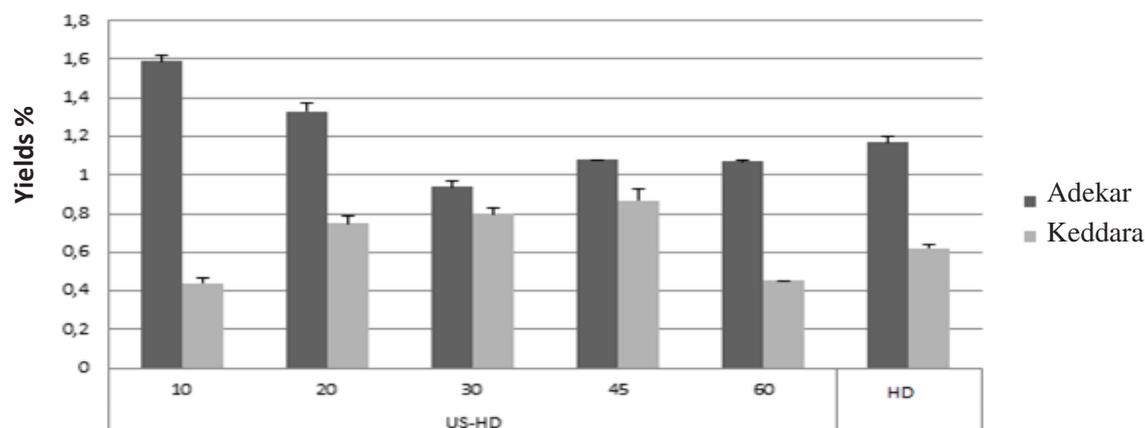


Fig. 1. Yields of wild Adekar and Keddara *Lavandula stoechas* essential oils obtained by different times of ultrasound pre-treatment prior Hydrodistillation (US-HD) and by Hydrodistillation (HD)

stoechas reached maximal oil yield of $(1.59 \pm 0.03 \%)$ at only 10 min of ultrasound pre-treatment, followed by a significant decrease ($p < 0.05$) of yield at 20 min $(1.33 \pm 0.04 \%)$ and 30 min $(0.94 \pm 0.03 \%)$ of pre-treatment. A significant ($p < 0.05$) improvement in oil yield when prolonging the ultrasonic pre-treatment time up to 45 min $(1.08 \pm 0.00 \%)$ and 60 min $(1.07 \pm 0.01 \%)$. In keddara samples, the EO extraction yield was improved by rising the ultrasonic pre-treatment time from 10 min to 45 min with $(0.44 \pm 0.03 \%)$ and $(0.87 \pm 0.06 \%)$, respectively. The extension of sonication pre-treatment to 60 minutes resulted in significant decrease ($p < 0.05$) in yield of KEO by 48.28 %. Similar variations in the pattern of extraction yield depending on sonication treatment time have previously reported for the phenolics of star fruits³.

The decrease in EO yield after the extended sonication time duration (starting from 20 min for AEO and at 60 min for KEO) might be attributed to the temperature increase of the medium process²⁸, which influences the stability of EO compounds depending on their chemical structure. Moreover, a probable degradation that could have occurred due to the generation of free radicals, mainly the highly reactive hydroxyl radicals as reported by Annegowda *et al.*³. On another hand, our two samples could exhibit varied results probably due to their different oil gland structure and density as well as chemical characteristics of their EOs, which could be specifically impacted by the ultrasound treatment. In fact, the distribution and structure of oil secretory gland may vary depending on plant species even within the genus⁴, organ²⁷, phenological stage¹⁰. Similarly, significant relationships have been reported between the essential oil composition and the eco-geographical origins of the populations⁶. The impact of ultrasonic pre-treatment on extraction oil efficiency might be related to different mechanisms involved during ultrasound extraction (fragmentation, erosion, capillarity, detexturation and sonoporation). For example, Comparison of extraction yields of boldo leaves showed enhancement of extraction yield from 20 % for conventional maceration to 25 % with ultrasound extraction²⁵. Knowing that boldo leaves possess trichomes on the surface of

leaves, the authors showed that these structure have been damaged or removed from the leaf after ultrasound treatment, which is not the case of leaves submitted to maceration. Jacotet-Navarro *et al.*¹⁶ also showed that ultrasound considerably improve the mass extraction yield of ginger, as a rise of 126 % was noticed between conventional maceration and ultrasound assisted extraction while reducing the extraction time from 540 to 110 min. Mechanical impacts of ultrasound and other influencing parameters factors have been very good reviewed by Chemat *et al.*¹².

Comparison of *L. stoechas* essential oils obtained by HD and US-HD

Conventional hydrodistillation method was compared to hydrodistillation preceded with different times of pre-treatment by ultrasound (Figure 1). Results shows that in sample of Adekar, only 10 min of ultrasound pre-treatment followed by 90 min of hydrodistillation provide $(1.59 \pm 0.03 \%)$ of yield comparing to $(1.17 \pm 0.03 \%)$ of yield ($p < 0.05$) of untreated sample submitted to 180 min of hydrodistillation. However, overall yield of essential oils of Keddara sample treated by 45 min $(0.87 \pm 0.06 \%)$ and untreated sample $(0.62 \pm 0.02 \%)$ are not significantly different.

Few studies have evaluated the effect of pre-treatment of ultrasound prior the hydrodistillation on essential oils yield. Assami *et al.*,⁵ showed that only 30 min are required to recover 80 % of total essential oil from caraway seeds pretreated with ultrasound, against 90 min for untreated samples. Ultrasound treatment of the air dried aerial parts of *Thymus daenensis* had significant effect on extraction efficiency of its essential oil by hydrodistillation²⁸. Ultrasonic extraction followed by hydrodistillation of *Elettaria cardamomum* seeds facilitated short time extraction, improved extraction efficiency and produced good quality cardamom essential oil²². on the other hand, this technique, have not provide a positive effect on extraction kinetics of Lavandin essential oil and gives a maximum yield after 60 min of steam distillation preceded by 30 min of ultrasound pre-treatment²⁴. Among the new oil extraction techniques, ultrasound assisted extraction, has attracted significant attention due to its positive impacts on

extraction time, yield and solvent consumption⁸. These positive effects by ultrasound waves are mostly attributed to the acoustic cavitation event. The cavitation effects cause directly disruption and thinning of biological membranes and cell walls, consequently heating increasing the mass transfer rate of organic substances from the solid matrix to the solvent²⁸. Furthermore, ultrasonic pre-treatment could cause the glandular walls to crumble or rupture more rapidly and more efficiently than in conventional hydrodistillation. Among the novel extraction methods application of ultrasound attracted lots of attentions due to a short time and enough extraction efficiency. The comparison of the novel methods and their possible effects on the chemical structure of extracted essential oil could provide useful information in the term of possibility of approach about other similar essential oil.

Chemical composition of essential oils

Table 1 reports the chemical analysis of both AEO and KEO obtained by US-HD and HD, and

giving the best yield (at 10 min and 45 min, respectively, of ultrasonic pre-treatment). Forty-seven compounds were identified. Thirty-seven compounds were identified similarly in both Adekar and Keddara samples untreated by ultrasound versus 36 and 35 compounds in treated samples, respectively. 94.30 % and 92.64 % of the total oil were identified in Adekar US-HD and HD samples, respectively, with most dominant compounds fenchone and camphor. In Keddara, 88.26 % and 88.75 % of the total oil was determined in treated and untreated samples with predominant constituents fenchone and 1,8-cineol. These present data are in agreement with those reported by Benabdelkader *et al.*⁹ in relation to major EO components from several wild populations of Algerian *L. stoechas*.

Although AEO and KEO of treated and untreated samples contain almost the same principal compounds but their behavior was different. In AEO obtained with US-HD, the relative amount of fenchone (26.66 %) was higher than in HD (21.31 %) (Fig. 2). Whereas in KEO,

Table 1. Chemical composition of *Lavandula stoechas* L. essential oils obtained by US-HD and HD

No.	Compounds ^a	RI ^c	RI ^L	Composition (%)			
				AEO		KEO	
				US-HD	HD	US-HD	HD
1	Tricyclene	917	921	-	0.20	-	-
2	α -Pinene	927	932	0.18	0.17	0.16	0.23
3	Camphene	944	946	1.37	2.18	1.09	1.39
4	ρ -Cymene	1017	1020	0.40	0.49	-	-
5	Limonene	1021	1024	-	0.25	-	-
6	1,8-cineole	1026	1026	4.14	2.11	17.24	16.48
7	γ -Terpinene	1049	1054	-	-	0.15	0.30
8	<i>cis</i> -Linaloloxide	1073	1067	0.63	-	-	-
9	Fenchone	1093	1083	26.66	21.31	22.30	23.90
10	Linalool	1101	1095	0.50	0.23	-	-
11	α -Fenchol	1118	1114	1.41	0.95	1.39	1.36
12	Camphor	1146	1141	23.73	26.53	10.33	9.57
13	Borneol	1166	1165	2.03	1.42	-	-
14	Terpinen-4-ol	1172	1174	0.61	0.30	0.67	0.66
15	<i>p</i> -Methylacetophenon	1176	1179	0.18	0.19	0.98	1.72
16	<i>p</i> -cymene-8-ol	1181	1179	0.90	0.65	0.93	-
17	Myrtenal	1186	1195	0.62	0.77	0.58	1.39
18	Myrtenol	1190	1194	1.22	-	1.02	-

table 1. (continued).

No.	Compounds ^a	RI ^e	RI ^L	Composition (%)			
				AEO		KEO	
				US-HD	HD	US-HD	HD
19	Verbenone	1198	1204	0.86	0.49	-	0.80
20	α -Fenchyl acetate	1208	1218	0.75	1.42	0.72	0.66
21	<i>trans</i> -Carveol	1213	1215	0.42	0.20	0.28	0.29
22	Carvone	1239	1239	0.61	0.40	0.41	0.58
23	Bornyl acetate	1287	1287	6.84	10.34	3.77	3.43
24	Myrtenyl acetate	1324	1324	4.46	4.09	2.22	2.70
25	Eugenol	1347	1356	-	-	0.22	0.15
26	Cyclosativene	1359	1369	0.51	0.61	0.71	0.67
27	α -Copaene	1365	1374	0.18	0.13	0.40	0.44
28	Geranyl acetate	1368	1379	-	-	-	0.17
29	Sativene	1379	1390	-	-	0.12	0.09
30	<i>cis</i> -Caryophyllene	1403	1408	-	-	0.14	0.14
31	Aromadendrene	1447	1439	-	-	0.29	0.16
32	<i>allo</i> -Aromadendrene	1460	1458	0.24	0.13	-	-
34	γ -Cadinene	1512	1513	1.27	1.41	2.18	2.50
35	Calamenene	1515	1521	0.59	0.55	0.73	0.79
36	Cadina-1.4-diene	1524	1533	2.20	2.61	4.22	2.89
37	α -Calacorene	1534	1544	0.50	0.52	0.71	0.77
38	<i>cis</i> - α -Copaene-8-ol	1556	-	0.52	0.45	0.68	0.64
39	Palustrol	1562	1567	0.32	0.30	0.45	0.46
40	Caryophyllene oxide	1575	1582	0.68	0.65	1.03	0.87
41	Viridiflorol	1592	1592	4.23	4.84	5.43	5.32
42	Ledol	1601	1602	1.01	1.12	1.41	1.33
43	Guaiol	1606	1600	1.9	2.31	2.57	2.55
44	1- <i>epi</i> -Cubenol	1623	1627	0.77	0.84	1.29	1.36
45	t-Cadinol	1635	1638	0.91	1.04	1.44	0.70
46	α -Cadinol	1649	1652	-	0.44	-	0.75
47	Cadalene	1666	1675	-	-	-	0.54
	Total identified (%)			94.30	92.64	88.26	88.75
	Monoterpene Hydrocarbons			1.95	3.29	1.40	1.92
	Oxygen-containing Monoterpenes			76.39	71.21	62.08	62.14
	Sesquiterpene Hydrocarbons			3.59	3.65	6.93	5.91
	Oxygen-containing Sesquiterpenes			10.34	11.99	14.30	14.52
	Others			0.18	0.19	0.98	1.72
	US treatment time (min)			10	00	45	00
	Extraction time (min)			90	180	90	180
	Yield (%)			1.59	1.17	0.87	0.62

^a Components listed in order of elution on HP5-MS column, RI^e- Experimentally determined retention indices on the mentioned column by co-injection of a homologous series of n-alkanes C8-C21; RI^L- Literature retention indices (Adams, 2007); AEO (Adekar Essential Oil); KEO (Keddara Essential Oil); US-HD (Ultrasound assisted extraction prior Hydrodistillation); HD (Hydrodistillation).

fenchone concentration was higher in untreated samples (23.90 %) than in treated ones (22.30 %) (Fig. 2). On the other hand, relative abundances of camphor and bornyl-acetate were slightly highest in KEO/US-HD samples than those of HD (10.33 - 3.77 % and 9.57 - 3.43 %, respectively). Whereas, inversed concentrations patterns were obtained in the case of AEO samples. As can be seen in Figure 2, 1,8-cineol was the only main compound which the relative amount was higher in both AEO (4.14 %) and KEO (17.27 %) extracted with US-HD process compared to HD (2.11 % and 16.48 %, respectively). It should be also noted that some minor compounds, such as myrtenol, were detected only in EOs obtained with US-HD (Table 1). Inversely, other minor compounds such as α -cadinol were detected only in EOs obtained with HD. The effect of ultrasonic treatment on chemical composition of both AEO and KEO could be connected with temperature properties and solubility of their various components²¹. It has been found that relative abundances of fenchone and camphor were highest at 150°C, in Turkish *L. stoechas*, whereas solubility of myrtenol and bornyl acetate was highest at 125°C. On the contrary fenchyl alcohol reached maximum relative amount at only 100°C¹⁵.

Previous studies showed that generally US-HD process might enhance EO extraction yield or provide more valuable EO components than conventional HD. Additionally, the behavior of main

volatile compounds could present different patterns in the same plant species according to the organ material². It is also important to note the influence of extraction time on the extraction kinetics for major components obtained with developed extraction methods, such as ultrasonic extraction⁵ and subcritical water (SbCW) extraction, both combined with HD. Indeed, extraction by SbCW of flower EOs from Turkish *L. stoechas* for most abundant two components, fenchone and camphor, was mostly completed at 15 min. Other major components, 1,8-cineol, myrtenol and myrtenyl acetate were reached the relative maximum amount at 20 min of the extraction¹⁵. Jacotet-Navarro *et al.*¹⁶ showed that quantity of ginger phenolics compounds extracted was improved by 29 %, by comparing conventional maceration (CM) to ultrasound assisted extraction (UAE).

Antioxidant activity

The effects of antioxidants on DPPH radical scavenging was thought to be due to their hydrogen donating ability. DPPH is a stable free radical and accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule²⁶. Results of DPPH free radical scavenging activity by essential oils of pre-treated samples giving the best yield and untreated samples compared to ascorbic acid as a standard antioxidant are summarized in Table 2 and Figures 3A and 3B. The reducing power of essential oils of treated and

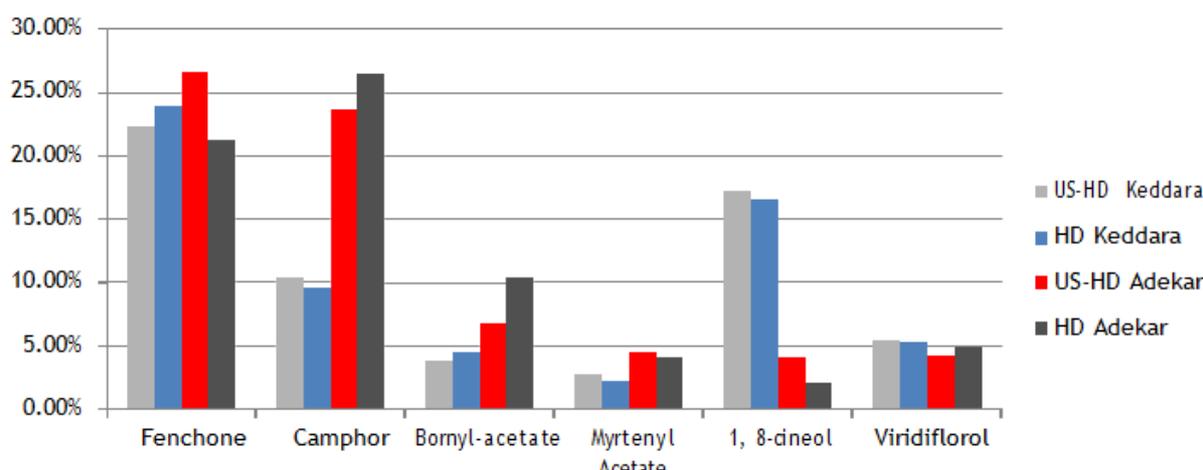
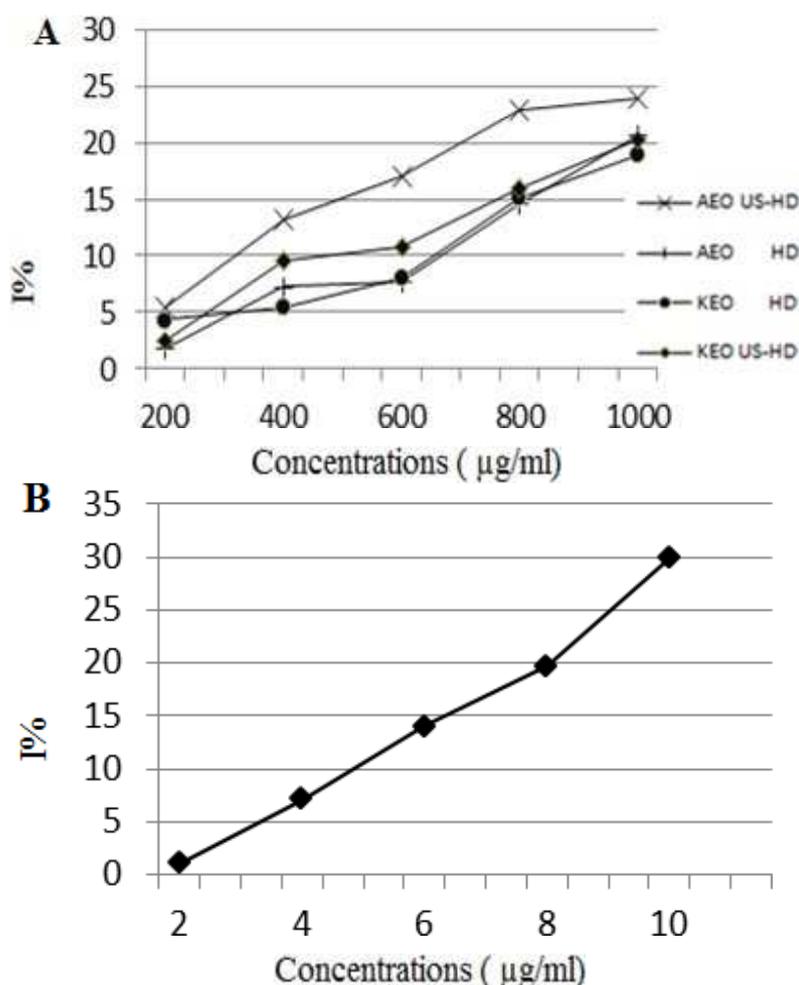


Fig. 2. Main compounds of Adekar and Keddara *Lavandula stoechas* essential oils obtained by hydrodistillation (HD) and ultrasound assisted extraction prior hydrodistillation (US-HD)

Table 2. Antioxidant activity of *Lavandula stoechas*

essential oils obtained by US-HD and HD

Essential oil	EC50 ± SD (µg/ml)
Keddara HD	2786.94 ± 17.32
Keddara US-HD	2564.10 ± 16.45
Adekar HD	1663.96 ± 9.69
Adekar US-HD	1663.96 ± 9.69
Ascorbic acid	

**Fig. 3. DPPH radical-scavenging activity (I %) of (A) essential oils of *Lavandula stoechas*, (B) ascorbic acid**

untreated *L. stoechas* was concentration dependent. As the concentrations tested for EOs samples were very powerful in the case of the reference ascorbic acid which is a strong antioxidant, hence the following concentrations were tested: 2; 4; 6; 8 and 10 µg/ml. The percentages

of antioxidant activity of all samples were very lower than that ascorbic acid. At the concentration of 1000 mg/ml, KEO and AEO of treated and untreated *L. stoechas* samples have revealed a percent of inhibition of DPPH free radical of (20.22 ± 1.72 %) and (18.88 ± 2.08 %), (23.96 ±

3.08 %) and (20.70 ± 4.41 %) respectively. These results clearly show that antioxidant power of essential oils obtained by US-HD was higher than antioxidant power of essential oils obtained from untreated samples. The EC_{50} values studied graphically, express the effective concentration of the antioxidant extract necessary for trapping and lowering 50 % of moles of DPPH dissolved in ethanol. According to these values which have shown an efficacy very inferior to that of ascorbic acid (16.16 ± 1.16 $\mu\text{g/ml}$), EC_{50} of untreated samples is always higher than EC_{50} of treated samples of the two harvest sites (Table 2) with a significant difference ($p < 0.05$) between KEO/US-HD and KEO/HD, and insignificant difference between AEO/US-HD and AEO/HD, which means that samples treated by ultrasound is more effective antioxidant compared to untreated samples. In spite of this insignificant difference of AEO, it is important to note that the treatment with ultrasound saved us time by reducing the time of hydrodistillation of the half. Our EOs have a low antioxidant activity comparing to EOs of Mohammedi *et al.*,²⁰ and Barkat *et al.*,⁷ who found EC_{50} of (1852.76 ± 55.74 $\mu\text{g/ml}$) and (584 ± 0.58 $\mu\text{g/ml}$) of leaves and flowers of *L. stoechas* harvested from Tlemcen and Constantine (Algeria), respectively.

Antioxidant activities of the essential oils from aromatic plants are mainly attributed to the active compounds present in them. This can be due to the high percentage of the main constituents, but also to the presence of other constituents in small quantities or to synergy among them¹⁷. Ultrasound assisted extraction not only improved yield but as the method is fast and run at low temperature, the final product usually showed less thermal degradation than traditional or microwave assisted method. This is especially important in case of food or cosmetic because in these two fields, essential oils have to be of high quality and good flavor¹⁴. Due to the different in constituents of different essences, different behaviors are observed in their antioxidant properties but in general, the ultrasound method has improved the antioxidant properties compared to the hydro distillation method and this finding is consistent with the researcher's statements.

Conclusion

The objective of this work is to show the advantage of ultrasound treatment of plant material before hydrodistillation process, in order to recover essential oils from two wild populations of Algerian *L. stoechas* L. US-HD extraction took shorter time compared to conventional hydrodistillation method. Total extraction time of 100 min and 135 min (consisting of 10 min and 45 min time, respectively, of ultrasonic pre-treatment plus 90 min of hydrodistillation) was used during US-HD whereas 3 h was required in HD extraction. The comparative study of the main compounds showed a qualitative and quantitative difference between AEO and KEO, as well as between EOs obtained by HD and US-HD. The antioxidant activity of EOs from samples pre-treated by ultrasound was higher compared to untreated samples.

The novel method US-HD provided useful informations in the term of possibility of approach with other wild *L. stoechas* populations and other similar essential oils.

In relation to green aspects, the use of ultrasound as a pre-treatment prior hydrodistillation improved the extraction of essential oil with the same amount of biomass and water, but in shortened extraction time without loss of quality of the final product. So, the energy consumption, although it is not calculated, should be lower, reflecting in less pollutants emission, making this method greener than conventional hydrodistillation. Other key extraction parameters (frequency and intensity of ultrasound, temperature of the water) should be studied in the future to scaling up the US-HD extraction process of lavender (*L. stoechas*) essential oils.

Green extraction processing especially for essential oils such as ultrasound pre-treatment prior hydrodistillation, could be a new concept to protect both the environment and consumers, and in the meantime enhance competition of industries to be more ecologic, economic and innovative.

Acknowledgments

We thank a lot Pr. EL HACHEMI M. the Dean of the Faculty of Engineering of the University of Boumerdes for his help.

References

1. **Adams, R.P. (2007).** Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadru- pole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co. Illiois, USA.
2. **Ait-kaci Aourahoun, K., Fazouane, F., Benayache, S. and Souici, F. (2016).** Glandular Hairs and Essential Oils of Stem and Leave from the Promosing Medicinal Legume *Cytisus triflorus* L'Hérit. Using Ultrasounds: Comparison with Conventional Hydrodistillation. Ind. J. of Natural Sciences. 6 (35):10911-10922.
3. **Annegowda, H.V., Bhat, R., Min-Tze, L., Karim, A.A. and Mansor, S.M. (2012).** Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. J. of Food Science and Technologie.49: 510-514.
4. **Arnold, N. and Bellomaria, B. (1993).** Observations morpho-anatomiques et histochimiques dans les *Salvia willeana* (Holmboe) Hedge et *Salvia fruticosa* Mill. de Chypre. Flora Medi- terranea. 3: 283-297.
5. **Assami, K., Pingret, D., Chemat, S., Meklati, B.Y. and Chemat, F. (2012).** Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. 62: 99-105.
6. **Bajalan, I., Rouzbahani, R., Ghasemi Pirbalouti, A. and Maggi, F. (2016).** Variation in chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of wild populations of *Phlomis olivieri*. Chemistry and Biodiversity. 14(5): 1-8 (e1600444).
7. **Barkat, M. and Laib, I. (2012).** Antioxidant activity of the essential oil from the flowers of *Lavandula stoechas*. J. of Pharmacognosy and Phytotherapy. 4(7): 96-101.
8. **Barrera Vázquez, M.F., Comini, L.R., Martini, R.E., Núñez Montoya, S.C., Bottini, S. and Cabrera, J.L. (2014).** Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and micro-wave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (*Rubiaceae*). Ultrasonics Sonochemistry. 21: 478-484.
9. **Benabdelkader, T., Zitouni, A., Guitton, Y., Jullien, F., Maitre, D., Casabianca, H., Legendre, L. and Kameli, A. (2011).** Essential oils from wild populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: composition, chemical variability and *in vitro* biological properties. Chemistry and Biodiversity. 8(5):937-953.
10. **Bosabalidis, A. M. and Sawidis, T. (2014).** Glandular and non-glandular hairs in the seasonally dimorphic *Origanum dictamnus* L. (*Lamiaceae*) as a means of adaptation to cold stress. Acta Agrobotanica. 67(1): 15-20.
11. **Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Périno-Issartier, S., Fabiano-Tixier, A.S. and Vian, M. (2017a).** Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 41: 357- 377.
12. **Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S. and Abert-Vian, M. (2017b).** Ultrasound assisted extraction of food and natural products: Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. Ultrasonics Sonochemistry. 34: 540-560.
13. **Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J. and Wang, Z. (2007).** Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. Ultrasonics Sono- chemistry. 14: 767-778.
14. **Da porto, C., Decorti, D. and Kikic, I. (2009).** Flavour compounds of *Lavandula augustifolia* L., to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. Food Chemistry. 112: 1072.
15. **Giray, E.S., Kirici, S., Kaya, D.A., Türk, M., Sönmez, O. and Inan, M. (2008).** Comparing the

- effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta*. 74: 930-935.
16. **Jacotet-Navarro, M., Rombaut, N., Deslis, S., Fabiano-Tixier, A.S., Pierre, F.X., Bily, A. and Chemat, F. (2016).** Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green Chemistry*.18(10):3106-3115.
 17. **Joshi, R.K. (2010).** *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Cranio- tome furcata*. *J. of Applied and Natural Science*. 2(1): 57-62.
 18. **Luque-Garcia, J.L. and Luque de Castro, M.D. (2003).** Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*. 22: 41-47.
 19. **Luque-Garcia, J.L. and Luque de Castro, M.D. (2004).** Ultrasound assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *J. of Chromatography A*. 1034: 237-242.
 20. **Mohammedi, Z. and Atik, F. (2012).** Pouvoir antifongique et antioxydant de l’huile essentielle de *Lavandula stoechas* L.. *Nature and Technologie*. 06: 34-39.
 21. **Mullakaev, M.S., Volkova, G.I. and Gradov, O.M. (2015).** Effect of ultrasound on the viscosity-temperature properties of crude oils of various compositions. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 49(3): 287-296.
 22. **Nashwa, F. S.M. (2015).** A short extraction time of high quality hydrodistilled cardamom (*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment. *Industrial Crops and Products*. 65:287-292.
 23. **Palma, M. and Barroso, C.G. (2001).** Ultrasound assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytical Chemistry*. 458: 119-130.
 24. **Périno-Issartier, S., Ginies, C., Cravotto, G., Chemat, F. (2013).** A Comparison of Essential Oils Obtained From Lavandin via Different Extraction Processes: Ultrasound, Microwave, Turbo- hydrodistillation, Steam and Hydrodistillation. *J. of Chromatography A*. 1305 : 41-47.
 25. **Petigny, L., Perino, S., Wajsman, J. and Chemat, F. (2013).** Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *Int. J. of Molecular Sciences*. 14(3): 5750-5764.
 26. **Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P. and Almeida, L.M. (1997).** Antioxidant activity of some extracts of *thymus zygis*. *Free Radical Research*. 26: 469- 478.
 27. **Sulborska, A. (2013).** Structure and distribution of glandular and non-glandular trichomes on above-ground organs in *Inula helenium* L. (*Asteraceae*). *Acta Agrobotanica*. 66 (4): 25-34.
 28. **Tavakolpour, Y., Moosavi-Nasab, M., Niakousari, M., Haghghi-Manesh, S., Hashemi, S.M.B., Khaneghah, A.M. (2016).** Comparison of Four Extraction Methods for Essential Oil from *Thymus daenensis* Subsp. *Lancifolius* and Chemical Analysis of Extracted Essential Oil. *J. of Food Processing and Preservation*. 41(4): e13046.
 29. **Thakral, J., Borar, S., Kalia, R.A.N. (2010).** Antioxidant Potential Fractionation from Methanol Extract of Aerial Parts of *Convolvulus arvensis* Linn. (*Convolvulaceae*). *Int. J. of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2: 219-223.
 30. **Van den Dool, H., and Kratz, P.D. (1963).** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatography A*.11:463-471.

Comparative Study of Yield, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Wild Algerian *Lavandula stoechas* L. Obtained by Ultrasound Pre-treatment and by Conventional Hydrodistillation

Étude comparative du rendement, de la composition chimique et de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. algérienne sauvage obtenues par prétraitement aux ultrasons et par hydrodistillation conventionnelle

L. Chekoual · A. Aissat · K. Ait-Kaci Aourahoun · T. Benabdelkader

© Lavoisier SAS 2018

Abstract The paper presents research results concerning the influence of ultrasonic pre-treatment (time intervals of 10, 20, 30, 45, and 60 min) on the process of extraction of essential oils from wild Algerian *Lavandula stoechas*. Tests were carried out in two populations. A sonication pre-treatment time of 10 min followed by 90 min of hydrodistillation (US-HD) gives a yield of $1.60 \pm 0.1\%$ of Kodiac essential oils (KEO). This pre-treatment time proved to be the best when compared with other pretreatment times. However, overall best yield ($1.03 \pm 0.07\%$) of El-Kahla essential oils (EEO) was obtained at 60 min of pre-treatment. These yields are higher compared with those ($0.64 \pm 0.02\%$ and $0.50 \pm 0.02\%$) obtained after 180 min of only hydrodistillation (HD) for the two samples of *Lavandula stoechas*, respectively. About 90.69% and 89.36% of total compounds were identified using chromatography–mass spectrometry (GC–MS) in KEO and EEO treated by ultrasound versus untreated

samples (89.26% and 76%, respectively). A qualitative and quantitative difference in chemical composition between the essential oils of treated and untreated samples of the two harvesting sites was found. The percentage of most of the major compounds (fenchone, camphor, 1,8-cineole, bornyl-acetate, myrtenyl-acetate, and viridiflorol) and other compounds identified is higher in treated samples. GC/FID (flame ionization detector) analysis of KEO showed that the percentage of fenchone and camphor as major components is greater at 60 and 20 min of ultrasonic (US) pre-treatment, respectively, compared with HD and the other US pre-treatment times. Results of the present study clearly indicated that sonication treatments are effective in enhancing the antioxidant activity of *Lavandula stoechas* extracts and could be further explored for commercial purposes to benefit consumers and the environment.

Keywords Ultrasound pre-treatment · *Lavandula stoechas* L. · Essential oils · Yield · GC/MS · DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Résumé L'article présente des résultats de recherche concernant l'influence du prétraitement par les ultrasons (intervalles de temps de 10, 20, 30, 45 et 60 minutes) sur le processus d'extraction des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. algérienne sauvage. Les tests ont été réalisés sur deux populations. Un temps de prétraitement par les ultrasons de 10 minutes suivi de 90 minutes d'hydrodistillation (US-HD) donne un rendement de $1,60 \pm 0,1\%$ des huiles essentielles de Kodiac (KEO). Ce temps de prétraitement s'est avéré le meilleur en comparant avec les autres temps de prétraitement. Cependant, le meilleur rendement global ($1,03 \pm 0,07\%$) des huiles essentielles d'El-kahla (EEO) a été obtenu après 60 minutes de prétraitement. Ces rendements sont plus élevés par rapport à ceux ($0,64 \pm 0,02\%$ et $0,50 \pm 0,02\%$) obtenus

L. Chekoual (✉) · A. Aissat
Laboratoire de biotechnologie des plantes aromatiques et médicinales (BPAM), département de biotechnologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, université de Blida1(09000), Algérie
e-mail : chekoual.lilia@gmail.com

L. Chekoual
Laboratoire de chimie organique, département de génie des procédés, faculté des sciences de l'ingénieur, université de Boumerdes (35000), Algérie

K. Ait-Kaci Aourahoun
Laboratoire de recherche de technologie alimentaire, faculté des sciences de l'ingénieur, université de Boumerdes (35000), Algérie4.

T. Benabdelkader
Département de biologie, faculté des sciences, université de Boumerdes (35000), Algérie

après 180 minutes d'hydrodistillation (HD) pour les deux échantillons de *Lavandula stoechas*, respectivement. 90,69 et 89,36 % du nombre total de composés ont été identifiés en utilisant la chromatographie sur phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) dans KEO et EEO traitées par les ultrasons par rapport aux échantillons non traités (89,26 et 76 %, respectivement). Une différence qualitative et quantitative dans la composition chimique des huiles essentielles des échantillons traités et non traités des deux sites de récolte a été trouvée. Le pourcentage de la plupart des composés majoritaires (fenchone, camphor, 1,8-cinéole, bornyl-acétate, myrtenyl-acétate et viridiflorol) ainsi que d'autres composés identifiés est supérieur dans les échantillons traités. L'analyse par GC/FID de HEK a montré que l'abondance de fenchone et de camphor comme composés majoritaires est plus importante à 60 et 20 minutes de prétraitement ultrasonore, respectivement, en comparant avec HD et les autres temps de prétraitement par US. Les résultats de la présente étude indiquent clairement que les traitements par ultrasons sont efficaces pour améliorer l'activité antioxydante des extraits de *Lavandula stoechas* et pourraient être explorés à des fins commerciales pour le bénéfice du consommateur et de l'environnement.

Mots clés Prétraitement aux ultrasons · *Lavandula stoechas* L. · huiles essentielles · rendement · GC/MS · DPPH

Introduction

Lavandula genus is an important member of Labiatae (Lamiaceae) family. *Lavandula* species are widely distributed in the Mediterranean region, and have great commercial value due to their intense and pleasant aroma. Both the plant material and its essential oils (EOs) are mainly used in perfumery, cosmetic, and food industries [1]. The EOs are formed by a combination of diverse and complex volatile mixtures of chemical compounds, with a predominance of terpene associated to aldehydes, alcohols, and ketones which accumulate in various structures of the plant [2].

The common methods to extract essential oil from medicinal and aromatic plants, including *Lavandula stoechas* L., are hydrodistillation (HD), steam distillation, and maceration [3]. It has been proved through a number of studies [3,4], that the quality of the extracted essential oil mainly depends on its constituents, which is primarily influenced by their extraction procedures. Certain extraction methods can induce thermal degradation, hydrolysis, and water solubilization of some fragrance constituents. In addition, the oil obtained through solvent aided extraction contains residues that pollute the food fragrances to which they are added. As

a means to overcome these drawbacks, advanced and improved methods such as microwave-assisted extraction [5], subcritical water extraction [6], and ultrasound-assisted extraction [7] have been applied to shorten extraction time, improve the extraction yield, and reduce the operational costs and environmental pollution.

Recently, ultrasound assisted extraction procedures for isolating essential oils have become attractive for use in laboratories and industry due to their efficiency and lower energy and water consumption; these procedures have also proved to be environmentally friendly. Ultrasound causes many physical phenomena that influence mass transfer in a solid-liquid system. The most important are cavitation and microstreamings. These phenomena provide a greater penetration of solvent into cellular materials, destroy plant tissues, and improve the release of cell contents into the bulk medium. The use of ultrasonic treatment for the extraction of essential oil proved to diminish the risk of thermal degradation and aid extraction by significantly reducing extraction times [8].

However, there has been no research on the simultaneous comparison of hydrodistillation (HD) and ultrasonic pre-treatment procedure at different times before hydrodistillation (US-HD) for the extraction of *Lavandula stoechas*. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of ultrasound pre-treatment times on the yield, chemical composition, and antioxidant activity of wild Algerian *Lavandula stoechas*.

Material and methods

Plant material

The flowering tips of *Lavandula stoechas* were collected at maximum flowering stage in April 2014, from wild populations located in two regions in northern Algeria: Kodiat (location: Taouarga, latitude: 36°47'39"N, longitude: 3°58'10"E, altitude: 536m, slope: > 12%) and El-Kahla (location: Larbaatache, latitude: 36°33'27"N, longitude: 3°21'23"E, altitude: 861 m, slope: >12%). Botanical authentication was performed at the herbarium of the Botany Department of the National School of Agriculture (Algiers), where a voucher specimen was deposited. The plant material was washed and dried in a dark and well-ventilated area at room temperature and stored in paper bags.

Hydrodistillation procedure (HD)

50 g of the ground flowering tips of the plant were hydrodistilled for 180 min using a modified Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia. The essential oils were collected, dried with anhydrous Na₂SO₄, and

Lavoisier

stored at 4 °C until analysis. Extractions were performed at least three times, and the yield values were reported as means \pm SD (standard deviation).

Ultrasound assisted extraction prior hydrodistillation (US-HD)

Ultrasound was applied on the plant materials as a pre-treatment before hydrodistillation according to the Ait-kaci Aourahoun et al. [9] methodology. 50 g of the ground flowering tips was mixed with 0.8 L deionized water in an Erlenmeyer flask. The mixture was exposed to ultrasound for different times: 10, 20, 30, 45, and 60 min. A glass rod was used for homogenization of the mixture. The resultants of the treatments following different times were then hydrodistilled for 90 min. For applying ultrasonic waves, an ultrasound cleaning bath (pulse system 270, Italy, 26 kHz, 150 W) was used. To ensure a rigorous comparison, the same glassware and same operating conditions were used for conventional hydrodistillation. The procedure was performed at least three times, and the yield values were reported as means \pm SD.

GC/FID and GC/MS analysis

To evaluate the effect of ultrasonic pre-treatment of *Lavandula stoechas* flowering tips on the chemical composition of *Lavandula stoechas* EO obtained by hydrodistillation and by ultrasonic pretreatment at 10, 20, 30, 45, and 60 min of Kodiak sample, chosen for its best yield, GC/FID analysis was carried out on a Chrompack CP 9002 electronic pressure-regulating gas chromatograph equipped with a silica capillary column, 30 m long, 0.25 mm in diameter and with 0.25 μ m film thickness. The flame ionization detector (FID) was kept at 280 °C and fed by a gas mixture of H₂/air and a splitless split injector at 250 °C. The carrier gas was nitrogen at 1 ml/min. The injection mode was divided (1/50 leakage ratio, 66 ml/min leakage flow). The temperature of the column was programmed from 50 °C (3 min) to 250 °C at 2 °C / min; it was then maintained at 250 °C for 10 min.

Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis of distilled oils of KEO and EEO samples obtained at 10 min and 60 min of ultrasonic pre-treatment extraction, respectively, were chosen for their high efficiency compared to other pre-treatment times. The qualitative and semi-quantitative analysis of these essential oil samples were carried out using a Hewlett Packard Agilent 6890N gas chromatograph (GC) coupled to a 5973 mass spectrometer (MS) detector and equipped with a fused-silica-capillary column having a non-polar stationary phase HP-5MSTM (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m film thickness). GC-MS were obtained using the following conditions: carrier gas He; flow rate

1 ml/min; split 1:30; injection volume 1 μ l; injection temperature 250 °C; oven temperature increased from 50 °C to 290 °C at 3 °C/min; the temperature of the mass spectrometer (280 °C), ion source (230 °C), quadrupole (150 °C). The ionization mode used was electronic impact at 70 eV.

Component identification

Retention indices (RI) were calculated for all constituents related to the retention time (TR) of n-alkanes that were analyzed under the same chromatographic conditions [10]. The identification of the essential oil constituents was based on the comparison of their mass spectra with those of the NIST05 and NIST libraries (computer matching) and published mass spectra [11]. The identification was confirmed by comparing the RI with those of previously published RIs [11].

DPPH free radical scavenging activity

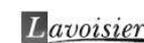
The antioxidant capacity of *Lavandula stoechas* essential oils was performed using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay as previously described by Thakral et al. [12]. Briefly, 1 ml of different concentrations of the essential oils (200, 400, 600, 800, and 1000 μ g/ml) were added to 1 ml of 0.1 mM ethanol solution of DPPH and incubated in obscurity at 27 °C for 30 min. The disappearance of the DPPH radical was read spectrophotometrically at 517 nm against a blank (EtOH solution). DPPH radical scavenging activity, expressed as an inhibition percentage (I%), was calculated using the following formula:

$$I\% = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100,$$

where A_{blank} is the absorbance of the control reaction containing all reagents except the essential oil and A_{sample} is the absorbance of the test reaction containing the oil. Ascorbic acid was used as a reference antioxidant. The $EC_{50(\text{DPPH})}$ value (μ g/ml) represented the concentration of essential oil that scavenged 50% of the DPPH radicals and was used as an estimate of the radical scavenging activity. It was calculated from the plot of I% against the essential oil concentrations. All tests were carried out in triplicate and the $EC_{50(\text{DPPH})}$ values were reported as means \pm SD.

Statistical analysis

Results of essential oil yield and antioxidant activity are reported as mean \pm SD. Significant differences between the means was made by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's pair-wise test. Differences with $P < 0.05$ were considered statistically significant.



Results and discussion

Effect of ultrasonic pre-treatment time on the yield

Figure 1 shows the influence of pre-treatment with ultrasound (for varying durations) on the yield of essential oils of *Lavandula stoechas* from harvesting regions Kodiak (KEO) and El-Kahla (EEO). Samples showed different yield extraction profiles. Kodiak *Lavandula stoechas* reached maximal oil yield ($1.60 \pm 0.1\%$) at only 10 min of ultrasound pre-treatment, followed by an insignificant decrease ($P > 0.05$) in yield at 20 min ($1.19 \pm 0.03\%$), followed by an insignificant increase ($P > 0.05$) in yield at 30 min ($1.37 \pm 0.09\%$). A significant ($P < 0.05$) diminishing in oil yield was observed when the ultrasonic pre-treatment time was prolonged up to 45 min ($0.61 \pm 0.03\%$) and 60 min ($0.62 \pm 0.04\%$). In El-Kahla samples, the EO extraction yield was more or less stable over rising ultrasonic pre-treatment time from 10 min to 45 min with ($0.48 \pm 0.01\%$) and ($0.53 \pm 0.01\%$), respectively. The extension of sonication pre-treatment to 60 minutes resulted in significant increase ($P < 0.05$) in yield of EEO ($1.03 \pm 0.07\%$). Similar variations in the pattern of extraction yield depending on sonication treatment time have previously been reported for the phenolics of star fruits [13].

The decrease in EO yield after the extended sonication time duration (starting from 20 min for KEO and at 30 min for EEO) might be attributed to the temperature increase of the medium process [14], which influences the stability of EO compounds depending on their chemical structure. Moreover, a probable degradation could have occurred due to the generation of free radicals, mainly the highly reactive hydroxyl radicals as reported by Annegowda et al. [13]. On the other hand, our two samples exhibited varied results probably due to their different oil gland structure and density as well as chemical characteristics of their EOs, which could be specifically impacted by the ultrasound treatment. In fact,

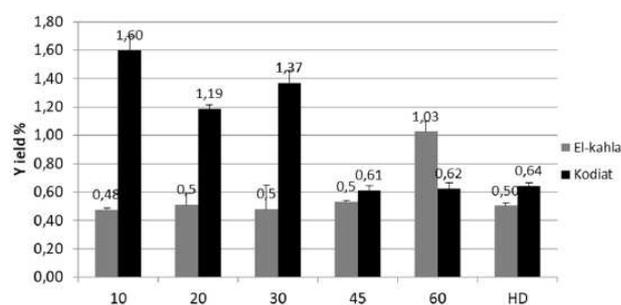


Fig. 1 Yields of wild Kodiak and El-Kahla *Lavandula stoechas* essential oils obtained after different times of ultrasound pre-treatment prior hydrodistillation (US-HD) and by hydrodistillation (HD)

the distribution and structure of oil secretory gland may vary depending on plant species even within the genus [15], organ [16], and phenological stage [17]. Similarly, significant relationships have been reported between the essential oil composition and the eco-geographical origins of the populations [18]. The impact of ultrasonic pre-treatment on extraction oil efficiency might be related to the different mechanisms involved during ultrasound extraction (fragmentation, erosion, capillarity, detexturation and sonoporation). For example, comparison of extraction yields of boldo leaves showed enhancement of extraction yield from 20% for conventional maceration to 25% with ultrasound extraction [19]. Knowing that the boldo leaves possess trichomes on their surface, the authors showed that these structures were damaged or removed from the leaf after ultrasound treatment, which is not so in the case of leaves subjected to maceration. Mechanical impacts of ultrasound and other influencing parameter factors have been excellently reviewed by Chemat et al. [20].

Comparison of *Lavandula stoechas* essential oils obtained by HD and US-HD

Conventional hydrodistillation method was compared to hydrodistillation preceded by different duration of pre-treatment with ultrasound (Fig. 1). Results showed that in a sample from Kodiak, only 10 min of ultrasound pre-treatment followed by 90 min of hydrodistillation provide $1.60 \pm 0.1\%$ of yield compared to $0.64 \pm 0.02\%$ of yield ($P < 0.05$) of untreated sample submitted to 180 min of hydrodistillation. However, overall yield of essential oils of El-Kahla sample treated with 60 min of ultrasound ($1.03 \pm 0.07\%$) and untreated sample ($0.50 \pm 0.02\%$) were significantly different.

Few studies have evaluated the effect of pre-treatment with ultrasound prior hydrodistillation on essential oils yield. Assami et al. [21] showed that only 30 min are required to recover 80% of total essential oil from caraway seeds pre-treated with ultrasound, against 90 min of hydrodistillation for untreated samples. Ultrasound treatment of the air dried aerial parts of *Thymus daenensis* had significant effect on the extraction efficiency of its essential oil by hydrodistillation [14]. Ultrasonic extraction followed by hydrodistillation of *Elettaria cardamomum* seeds facilitated short time extraction, improved extraction efficiency, and produced good quality cardamom essential oil [22]. On the other hand, this technique, did not provide a positive effect on the extraction kinetics of Lavandin essential oil and gave a maximum yield after 60 min of steam distillation preceded by 30 min of ultrasound pre-treatment [23]. Among the new oil extraction techniques, ultrasound assisted extraction, has attracted significant attention due to its positive impacts on extraction time, yield, and solvent consumption [24]. These

positive effects by ultrasound waves are mostly attributed to the acoustic cavitation effect. The cavitation effects cause direct disruption and thinning of biological membranes and cell walls, consequently heating and thus increasing the mass transfer rate of organic substances from the solid matrix to the solvent [14]. Furthermore, ultrasonic pre-treatment could cause the glandular walls to crumble or rupture more rapidly and more efficiently than in conventional hydrodistillation. Among the novel extraction methods, application of ultrasound attracted lots of attentions due to the decrease in extraction time and excellent extraction efficiency. The comparison of the novel methods and their possible effects on the chemical structure of extracted essential oil could provide useful information in terms of possibility of approach for other similar essential oils.

Chemical composition of essential oils

Table 1 shows the GC/MS analysis of both KEO and EEO obtained by US-HD and HD; the best yield was obtained at 10 and 60 min, respectively, of ultrasonic pre-treatment. Forty-nine compounds were identified. 42 and 37 compounds were identified in Kodiac and El-Kahla samples untreated by ultrasound versus 39 and 36 compounds in treated samples, respectively. 90.69% and 89.26% of the total oil were identified in Kodiac US-HD and HD samples, respectively, with the most dominant compounds as fenchone and camphor. In El-Kahla, 89.36% and 76% of the total oil was determined in treated and untreated samples with the predominant constituents as fenchone and 1,8-cineol. These present data are in agreement with those reported by Benabdokader et al. [25] in relation to major EO components from several wild populations of Algerian *Lavandula stoechas*.

Although KEO and EEO of treated and untreated samples contain almost the same principal compounds, their behavior was different. In KEO and EEO obtained with US-HD, the relative amount of fenchone, camphor and bornyl acetate (25.88, 16.73, and 7.52%) and (24.54, 10.08 and 1.98%) was higher than in HD (22.89, 13.52, and 5.62 %) and (13.66, 6.72, and 1.76%), respectively (Fig. 2). Inversed concentrations patterns were obtained in the case of viridiflorol of both KEO and EEO samples. On the other hand, in KEO, 1,8-cineol concentration was higher in untreated samples (14.33%) than in treated ones (10.39%) (Fig. 2). A similar result was observed in myrtenyl acetate of EEO. It should also be noted that some minor compounds, such as *p*-Cymene and isoborneol were detected only in KEO obtained with US-HD (Table 1). Inversely, other minor compounds such as tricyclene and *p*-cymen-7-ol were detected only in KEO obtained with HD. Linalool is the only minority compound found in EOs obtained by HD.

Among the different fractions of the EOs of our plant, it is important to note that the fraction of oxygenated monoter-

penes was the most abundant fraction; it was higher in the extracts obtained by US-HD (Table 1).

We already know that soil composition, climate, age, vegetative cycle, and extraction method can affect essential oil composition [26,27] but recent studies generally showed that US-HD process might enhance EO extraction yield or provide more valuable EO components than conventional HD. Indeed, by working on Turkish *Lavandula stoechas*, Giray et al. [1] found that the yield of the EOs with a content of the major compounds fenchone and camphor was greater in the samples obtained by UAE (ultrasound assisted extraction) than those obtained by HD. Jacotet-Navarro et al. [28] showed that the quantity of ginger phenolic compounds extracted was improved by 29% in UAE compared to conventional maceration (CM). Additionally, the behavior of the main volatile compounds could present different patterns in the same plant species according to the organ material [9]. The effect of ultrasonic treatment on chemical composition of both KEO and EEO could be related to temperature properties and solubility of their various components [29]. It has been found that relative abundances of fenchone and camphor were highest at 150 °C in Turkish *Lavandula stoechas*, whereas solubility of myrtenol and bornyl acetate was highest at 125 °C. On the contrary, fenchyl alcohol reached maximum relative amount at only 100 °C [1].

It is also important to note the influence of extraction time on the extraction kinetics. Chemical analysis by GC/FID of KEO obtained by HD and US-HD at 10, 20, 30, 45, and 60 min is summarized in table 2. The analysis has shown that the content of KEO compounds varies from one US pre-treatment time to another. The abundance of major compounds fenchone and camphor is greater at ultrasound pre-treatment times of 60 and 20, with concentrations of 38.94 and 15.11% in the case of HD extract. This concentration takes a variation ranging from 39.30 and 16.81% up to 48.09 and 18.61% in the cases of US-HD extracts, respectively (Fig. 3). The effect of extraction time on the major components obtained with developed extraction methods, such as ultrasonic extraction [21] and subcritical water (SbCW) extraction, both combined with HD have been studied. Indeed, extraction by SbCW of flower EOs from Turkish *Lavandula stoechas* for the two most abundant components, fenchone and camphor, was mostly completed at 15 and 20 min, respectively. Other major components, 1,8-cineol, myrtenol, and myrtenyl acetate, reached the relative maximum amount at 20 min of the extraction [1]. The total percentage of the compounds identified by GC/FID of the extract obtained by HD is 80.14%; this percentage takes a variation ranging from 79.16% to 85.36% of the extracts obtained by US-HD at different pre-treatment times with the predominance of the fraction of oxygenated monoterpenes (70.39% in the extract obtained by HD, and contents ranging from 70.84% to 78.68% in the extracts obtained by

Table 1 GC/MS analysis of Kodiât and El-Kahla *Lavandula stoechas* L. essential oils obtained by HD and US-HD giving the best yield

N°	Compounds ^a	RI _e	RI _L	Composition %			
				KEO		EEO	
				US-HD	HD	US-HD	HD
1	Tricyclene	917	921	–	0.18	–	–
2	α -Pinene	927	932	0.47	0.36	0.15	–
3	Camphene	944	946	2.07	1,95	0.59	0.32
5	ρ -Cymene	1017	1020	0.65	–	–	–
6	1,8-Cineole	1026	1026	10.39	14.33	15.77	10.36
7	Fenchone	1093	1083	25.88	22.89	24.54	13.66
8	Linalool	1101	1095	–	0.01	–	0.32
9	α -Fenchol	1118	1114	–	1.29	1,85	1
10	Camphor	1146	1141	16.73	13.52	10.08	6.72
11	Pinocarvone	1156	1160	–	0.25	0,28	–
12	Borneol	1166	1165	0.22	1.78	–	–
13	Isoborneol	1167	1155	1.88	–	–	–
14	Terpinen-4-ol	1172	1174	0.42	0.38	0.64	0.54
15	<i>p</i> -Methylacetophenol	1176	1179	0.42	0.88	0.39	0.27
16	<i>p</i> -Cymene-8-ol	1181	1179	0.98	0.97	0.87	0.61
17	Myrtenal	1186	1195	0.39	0.33	–	0.66
18	Myrtenol	1190	1194	0.7	0.57	3.67	1.66
19	Verbenone	1198	1204	0.69	1.14	0.96	0.53
20	α -Fenchyl acetate	1208	1218	1.45	1.14	0.69	0.58
21	<i>trans</i> -Carveol	1213	1215	0.32	0.32	0.37	0.36
22	Carvone	1239	1239	0.5	0.44	0.56	0.29
23	Bornyl acetate	1287	1287	7.52	5.62	1.89	1.76
24	<i>p</i> -Cymen-7-ol	1296	1289	–	0.16	–	–
25	Thymol	1306	1289	–	0.11	–	–
26	Myrtenyl acetate	1324	1324	2.65	2.25	4.4	7.36
27	Eugenol	1347	1356	0.11	–	0.31	0.2
28	Cyclosativene	1359	1369	0.63	0.61	0.62	0.51
29	α -Copaene	1365	1374	0.14	0.14	0.26	0.25
30	Sativene	1379	1369	–	0.07	–	–
31	β -Caryophyllene	1403	1408	0.2	0.12	0.25	0.31
32	<i>epi</i> -Bicyclosesquiphellandrene	1 460		0.11	–	–	0.43
33	Butylated hydroxytoluene	1495	1514	0.23	–	0.43	0.47
34	γ -Cadinene	1512	1513	1.45	1.36	1.78	2.92
35	Calamenene	1515	1521	0.62	0.57	0.84	0.73
36	Cadina-1,4-diene	1524	1533	0.24	0.78	0.43	0.38
37	α -Calacorene	1534	1544	0.47	–	0.7	1.04
38	<i>cis</i> - α -Copaene-8-ol	1556		0.35	0.46	0.99	2.27
39	Palustrol	1562	1567	0.34	0.42	0.47	0.53
40	Caryophyllene oxide	1575	1582	0.64	0.74	0.97	1.65
41	Cis- β - Elemenone	1582	1589	–	0.63	0.75	0.82
42	Viridiflorol	1592	1592	4.82	5.85	5.75	7.02
43	Ledol	1601	1602	1.11	1.42	1.39	1.79
44	Guaiol	1606	1600	2.26	2.78	2.52	3.23
45	<i>l-epi</i> -Cubenol	1623	1627	0.81	0.11	1.11	1.59
46	<i>t</i> -Cadinol	1635	1638	0.69	0.65	1.37	2.26

(Suite page suivante)

N°	Compounds ^a	RI _e	RI _L	Composition %			
				KEO		EEO	
				US-HD	HD	US-HD	HD
47	epi- α -Muurolol	1640	1640	–	0.34	–	–
48	α -Cadinol	1649	1652	0.7	0.73	0.72	–
49	Cadalene	1666	1675	0.44	0.61	–	0.6
Total identified (%)				90.69	89.26	89.36	76.00
Monoterpene hydrocarbon				3.19	2.49	0.74	0.32
Oxygen-containing monoterpenes				70.83	67.5	66.88	46.61
Sesquiterpenes hydrocarbon				3.86	3.65	4.88	6.57
Oxygen-containing sesquiterpenes				12.39	14.74	16.47	22.23
Others				0.42	0.88	0.39	0.27
US treatment (min)				60	0	10	0
Extraction time (min)				90	180	90	180
Yield (%)				1.03	0.5	1.6	0.64

RI_e: Experimentally determined retention indices on the mentioned column by co-injection of a homologous series of *n*-alkanes C8–C21; RI_L: Literature retention indices (Adams 2007); KEO: Kodiati essential oil; EEO: El-Kahla essential oil; US-HD: Ultrasound assisted extraction prior hydrodistillation; HD: Hydrodistillation

^a Components listed in order of elution on HP5-MS column

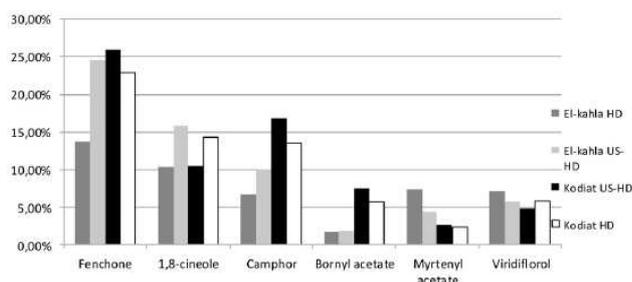


Fig. 2 Main compounds of Kodiati and El-Kahla *Lavandula stoechas* essential oils obtained by hydrodistillation (HD) and by ultrasound assisted extraction prior hydrodistillation (US-HD) giving the best yield (GC/MS analysis)

US-HD). Ultrasound pre-treatment prior hydrodistillation provides more valuable EO than traditional methods. In addition, this green technique offers many advantages over traditional alternatives, namely: shorter extraction times, higher processing throughput with lower consumption of water, solvents, and energy, and increased rate of extraction without loss of quality of the final product. All these advantages make ultrasound pre-treatment a good alternative for the extraction of essential oil from herbs.

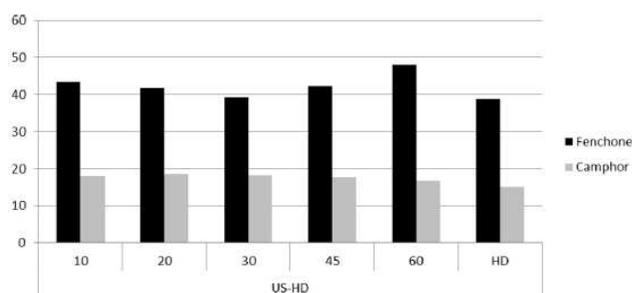
Antioxidant activity

The effects of antioxidants on DPPH radical scavenging was thought to be due to their hydrogen donating ability.

DPPH[•] is a stable free radical that accepts an electron or hydrogen radical to become a stable diamagnetic molecule [30]. Results of DPPH free radical scavenging activity by essential oils of pre-treated samples giving the best yield and untreated samples compared to ascorbic acid as a standard antioxidant are summarized in table 3 and figure 4AB. The reducing power of essential oils of treated and untreated *Lavandula stoechas* was concentration dependent. As the concentrations tested for EOs samples were very powerful in the case of the reference ascorbic acid which is a strong antioxidant, the following concentrations were tested: 2, , 6, 8 and 10 $\mu\text{g/ml}$. The percentages of antioxidant activity of all samples were much lower than that of ascorbic acid. At the concentration of 1 000 mg/ml, KEO and EEO of treated and untreated *Lavandula stoechas* samples have revealed a percent of inhibition of DPPH free radical of $8.97 \pm 1.45\%$ and $21.74 \pm 3.14\%$, $7.15 \pm 2.09\%$ and $26.23 \pm 3.6\%$ respectively. These results clearly show that the antioxidant power of KEO obtained by US-HD was higher than the antioxidant power of KEO obtained by HD. An inverse result was observed in EEO. The EC_{50} values studied graphically, express the effective concentration of the antioxidant extract necessary for trapping and lowering 50% of moles of DPPH dissolved in ethanol. According to these values, which have shown an efficacy very inferior to that of ascorbic acid ($16.16 \pm 1.16 \mu\text{g/ml}$), EC_{50} of untreated samples was always higher than EC_{50} of treated samples of the two harvest sites (Table 2) with a significant difference ($P < 0.05$) between KEO/US-HD and KEO/HD,

Table 2 GC/FID analysis of Kodiatic *Lavandula stoechas* L. essential oils obtained by HD and US-HD at different times

Compounds	RI	Composition (%)					
		HD	US-HD10	US-HD20	US-HD30	US-HD45	US-HD60
α -Thujene	917	0.12	0.17	0.10	0.07	0.11	0.09
α -Pinene	931	0.24	0.22	0.11	0.16	0.23	0.17
Camphene	945	1.62	1.82	1.34	1.07	1.47	1.30
Sabinene	979	0.10	0.07	0.05	–	0.06	0.06
β -Pinene	975	0.03	0.08	0.07	0.02	0.04	0.11
α -Terpinene	1012	0.10	Trace	0.05	0.05	0.05	0.04
<i>P</i> -Cymene	1031	0.57	0.38	0.38	0.33	0.36	0.33
1.8 Cineole	1037	13.47	12.16	12.15	9.96	13.27	9.98
γ -Terpinene	1067	0.05	0.06	0.04	0.04	0.05	0.05
Fenchone	1087	38.94	43.41	41.81	39.30	42.28	48.05
Linalool	1101	0.07	0.86	0.08	0.07	0.06	0.89
Camphor	1126	15.11	18.07	18.61	18.19	17.62	16.81
Borneol	1140	1.18	1.21	1.31	1.53	1.29	1.28
α -Terpeneol	1155	0.67	0.53	0.58	0.77	0.61	0.60
Nerol	1179	0.87	1.06	0.99	0.90	0.58	0.96
Thymol	1288	0.04	–	0.05	0.04	0.03	0.05
Lavandulyl acetate	1304	1.54	1.55	1.44	1.96	1.57	1.40
Eugenol	1361	0.04	0.07	0.11	0.08	0.08	0.06
Geranyl acetate	1385	0.03	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06
β -Caryophellene	1467	3.26	2.17	2.26	2.84	2.12	1.99
β -Famesene	1445	2.09	1.30	1.39	1.73	1.28	1.08
Total identified (%)		80.14	85.25	82.98	79.16	83.21	85.36
Monoterpene hydrocarbon		2.83	2.80	2.14	1.74	2.37	2.15
Oxygen-containing monoterpenes		70.39	77.37	75.69	70.84	75.82	78.68
Sesquiterpenes hydrocarbon		5.35	3.47	3.65	4.57	3.40	3.07
Oxygen-containing sesquiterpenes		–	–	–	–	–	–
Others		1.57	1.61	1.50	2.01	1.62	1.46

**Fig. 3** Main compounds of Kodiatic *Lavandula stoechas* essential oils obtained by hydrodistillation (HD) and by ultrasound assisted extraction prior hydrodistillation (US-HD) at different times (GC/FID analysis)

and between EEO/US-HD and EEO/HD, which means that samples treated by ultrasound is a more effective antioxidant compared to untreated samples. Our EOs had a lower antioxidant activity compared to EOs of Mohammedi et al.

Table 3 Antioxidant activity of *Lavandula stoechas* essential oils obtained by US-HD and HD

Essential oils	EC ₅₀ ± SD (µg/ml)
Kodiat US-HD	3547.9 ± 42.23
Kodiat HD	3903.73 ± 21.65
E-kahla US-HD	1670.62 ± 39.38
Ei-kahla HD	2361.34 ± 16.76
Ascorbic acid	16.16 ± 1.16

[31] (except EEO obtained by US-HD) who found EC₅₀ of 1852.76 ± 55.74 µg/ml and Barkat et al. [32] who found EC₅₀ of 584 ± 0.58 µg/ml of *Lavandula stoechas* leaves and flowers harvested from Tlemcen and Constantine (Algeria), respectively.

Antioxidant activities of the essential oils from aromatic plants are mainly attributed to the active compounds present

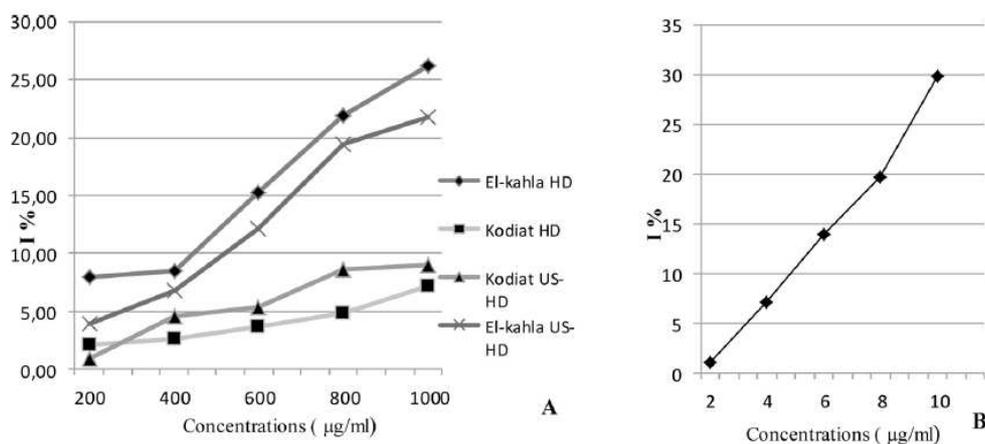


Fig. 4 DPPH radical-scavenging activity (I%) of (A) essential oils of *Lavandula stoechas* and (B) ascorbic acid

in them. This can be due to the high percentage of the main constituents, but also due to the presence of other constituents in small quantities or to a synergy among them [33]. Several compounds that we have detected in *Lavandula stoechas* EOs obtained by HD and US-HD have already been treated as antioxidants in chemical screening tests. These include eugenol, thymol, α -terpinene, γ -terpinene [34], and terpinen-4-ol [35]. GC/MS analyzes show that the content of terpinen-4-ol is greater in the extracts obtained by US-HD compared to those obtained by HD. The same is true for eugenol whose content is totally absent in the sample obtained by HD. As for thymol, it has only been detected in the extract obtained by HD. On the other hand, KEO GC/FID analysis showed that eugenol abundance is higher in all US-HD extracts compared to HD, while α -terpinene content is higher in the extract obtained by HD. As for γ -terpinene and thymol, they have more or less the same content in the essential oils of the two extraction methods with thymol completely absent in US-HD10.

Annegowda et al. [13] showed that sonication treatment significantly enhanced various antioxidants in the methanolic extracts (up to 30 min) of star fruit compared to aqueous extracts. They affirmed that ultrasound treatment was a method for enhancing the extractability of natural antioxidants, and thus could effectively play a significant role in preventing several physiological and degenerative diseases in consumers. Ultrasound assisted extraction not only improved yield but as the method is fast and run at low temperature, the final product usually showed less thermal degradation than traditional or microwave assisted method. This is especially important in case of food and cosmetics because in these two fields, essential oils have to be of high quality and good flavor [7]. Due to the different constituents of different essences, different behaviors are observed in their antioxidant properties but in general, the ultrasound method has improved antioxidant properties compared to the hydro-

distillation method and this finding is consistent with the researcher's statements.

Conclusion

In the present study, sonication pre-treatment before HD extraction significantly enhanced yield of wild Algerian *Lavandula stoechas* EOs compared to conventional hydrodistillation. US-HD extraction took shorter time compared to conventional hydrodistillation method. Total extraction time of 100 min and 150 min (consisting of 10 min and 60 min, respectively, of ultrasonic pre-treatment plus 90 min of hydrodistillation) was used during US-HD; whereas 3 h was required in HD extraction. Ultrasound pre-treatment of 10 min can provide more than double yield when compared with HD. A qualitative and quantitative difference of the essential oils of the two populations of *Lavandula stoechas* obtained by US-HD and by HD was also observed using GC/MS analysis. Ultrasonic pre-treatment increases the content of the major compounds and even that of other compounds. In KEO and EEO, the abundance of fenchone and camphor varies from 22.89 and 13.52% and 13.66 and 6.72% in the case of HD up to 25.88 and 16.73% and 24.54 and 10.08% in the case of US-HD/10 min and US-HD/60 min, respectively. GC/FID analysis has shown us that the content of KEO compounds varies according to the different ultrasonic pre-treatment times. 60 and 20 min of pre-treatment were more effective than HD and the other pre-treatment times for the major compounds fenchone and camphor. The antioxidant activity of EOs has shown a greater antioxidant power of extracts obtained by US-HD. Overall, sonication pre-treatments are an effective green alternative and have a high potential in terms of EO's quantity and quality by reducing the consumption of water, solvents, and energy. The use of this method needs to be

explored for other aromatic and medicinal plants for pharmaceutical, food, and cosmetic applications.

Acknowledgments We thank Pr. El Hachemi M, the Dean of the Faculty of Engineering of the University of Boumerdes for his help

Conflicts of interests: the authors have no conflicts of interests to declare.

Références

- Giray ES, Kirici S, Kaya DA, et al (2008) Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta* 74:930–5
- Tajidin NE, Ahmad SH, Azimah AB, et al (2012) Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. *Int J Biotech* 11:2685–93
- Dhobi M, Mandal V, Hemalatha S (2009) Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan-silybinin. *J Chem Metrol* 3:13–23
- Sibel K, Sedef N, Nural K, et al (2012) Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from rosemary. *J Food Sci Tech* 51:1056–65
- Wang H, Liu Y, Wei S, et al (2010) Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. *Ind Crops Prod* 36:229–37
- Mohammad HE, Fereshteh G, Soosan R (2007) Subcritical water extraction of essential oil from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *J Food Eng* 80:735–40
- Da porto C, Decorti D, Kikic I (2009) Flavour compounds of *Lavandula augustifolia* L., to use in food manufacturing: comparison of three different extraction methods. *Food Chem* 112:1072–8
- Kimbaris AC, Siatis NG, Daferera DJ, et al (2006) Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem* 13:54–60
- Ait-kaci Aourahoun K, Fazouane F, Benayache S, et al (2016) Glandular hairs and essential oils of stem and leave from the promising medicinal legume *Cytisus triflorus* L'Hérit. Using ultrasounds: comparison with conventional hydrodistillation. *Ind J Nat Sci* 35:10911–22
- Van den Doel H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr A* 11:463–71
- Adams RP (2007) Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Co. Illinois, USA, 804
- Thakral J, Borar S, Kalia RAN (2010) Antioxidant potential fractionation from methanol extract of aerial parts of *Convolvulus arvensis* Linn. (Convolvulaceae). *Int J Pharm Sci Drug Res* 2:219–23
- Annegowda HV, Bhat R, Min-Tze L, et al (2012) Influence of sonication treatments and extraction solvents on the phenolics and antioxidants in star fruits. *J Food Sci Tech* 49:510–4
- Tavakolpour Y, Moosavi-Nasab M, Niakousari M, et al (2016) Comparison of four extraction methods for essential oil from *Thymus daenensis* Subsp. *Lancifolius* and chemical analysis of extracted essential oil. *J Food Process Pres* 41:1–7
- Arnold N, Bellomaria B (1993) Observations morpho-anatomiques et histo-chimiques dans les *Salvia willeana* (Holmboe) Hedge et *Salvia fruticosa* Mill. de Chypre. *Flora Mediterranea* 3:283–97
- Sulborska A (2013) Structure and distribution of glandular and non-glandular trichomes on above-ground organs in *Inula helenium* L. (Asteraceae). *Acta Agrobot* 66:25–34
- Bosabalidis AM, Sawidis T (2014) Glandular and non-glandular hairs in the seasonally dimorphic *Origanum dictamnus* L. (Lamiaceae) as a means of adaptation to cold stress. *Acta Agrobot* 67:15–20
- Bajalan I, Rouzbahani R, Ghasemi Pirbalouti A, et al (2016) Variation in chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of wild populations of *Phlomis olivieri*. *Chem Biodivers* 14:1–8
- Petigny L, Perino S, Wajsman J, et al (2013) Batch and continuous ultrasound assisted extraction of boldo leaves (*Peumus boldus* Mol.). *Int J Mol Sci* 14:5750–64
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, et al (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products: Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrason Sonochem* 34:540–60
- Assami K, Pingret D, Chemat S, et al (2012) Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds. *Chem Eng Process* 62:99–105
- Nashwa FSM (2015) A short extraction time of high quality hydro-distilled cardamom (*Elettaria cardamomum* L. Maton) essential oil using ultrasound as a pretreatment. *Ind Crops Prod* 65:287–92
- Périno-Issartier S, Ginies C, Cravotto G, et al (2013) A comparison of essential oils obtained from lavandin via different extraction processes: ultrasound, microwave, turbo-hydrodistillation, steam and hydrodistillation. *J Chromatogr A* 1305:41–7
- Barrera Vázquez MF, Comini LR, Martini RE, et al (2014) Comparisons between conventional, ultrasound-assisted and microwave-assisted methods for extraction of anthraquinones from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae). *Ultrason Sonochem* 21:478–84
- Benabdelkader T, Zitouni A, Guitton Y, et al (2011) Essential oils from wild populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: composition, chemical variability and in vitro biological properties. *Chem Biodivers* 8:937–53
- Hashemi MB, Niakousari M, Saharkhiz MJ, et al (2011) Influence of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on oxidative stability of sunflower oil. *Eur J Lipid Sci Technol* 113:1520–6
- Hashemi MB, Niakousari M, Saharkhiz MJ (2011) Antioxidant activity of *Satureja bachtiarica* Bunge essential oil in rapeseed oil irradiated with UV rays. *Eur J Lipid Sci Technol* 113:1132–7
- Jacotet-Navarro M, Rombaut N, Deslis S, et al (2016) Towards a “dry” bio-refinery without solvents or added water using microwaves and ultrasound for total valorization of fruit and vegetable by-products. *Green Chem* 18:3106–15
- Mullakaev MS, Volkova GI, Gradov OM (2015) Effect of ultrasound on the viscosity-temperature properties of crude oils of various compositions. *Theor Found Chem Eng* 49:287–96
- Soares JR, Dins TCP, Cunha AP, et al (1997) Antioxidant activity of some extracts of thymus zygis. *Free Radical Res* 26:469–78
- Mohammedi Z, Atik F (2012) Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. *Nat Tech* 6:34–9
- Barkat M, Laib I (2012) Antioxidant activity of the essential oil from the flowers of *Lavandula stoechas*. *J Pharmacognosy Phytother* 4:96–101
- Joshi RK (2010) In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Craniotome furcata*. *J Pharmacogn Phytother* 2:57–62
- Ruberto G, Baratta MT (2000) Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem* 69:167–74
- Lertsatitthanakorn P, Taweechaisupapong S, Aromdee C, et al (2006) In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. *Int J Aromather* 16:43–9

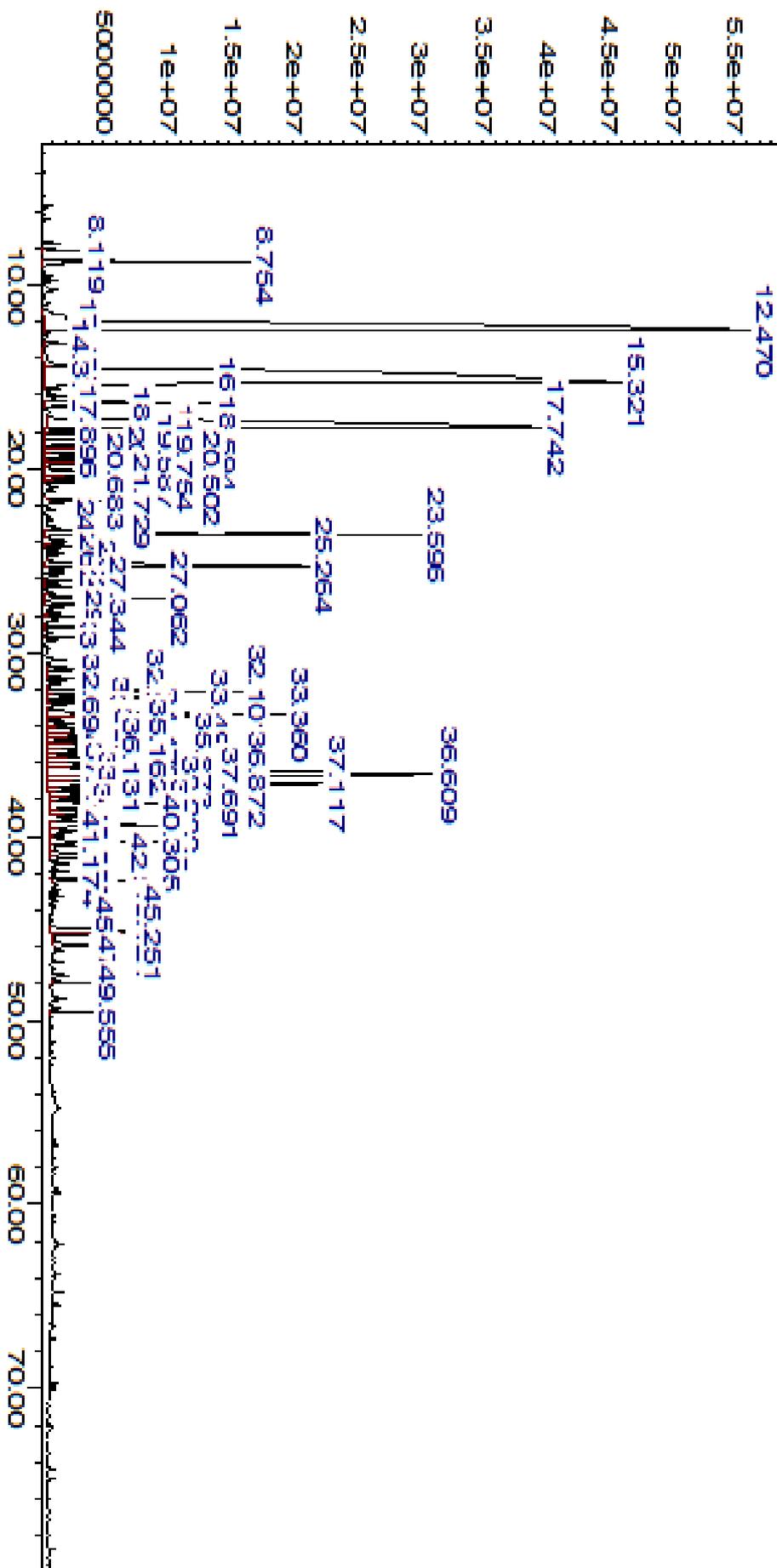
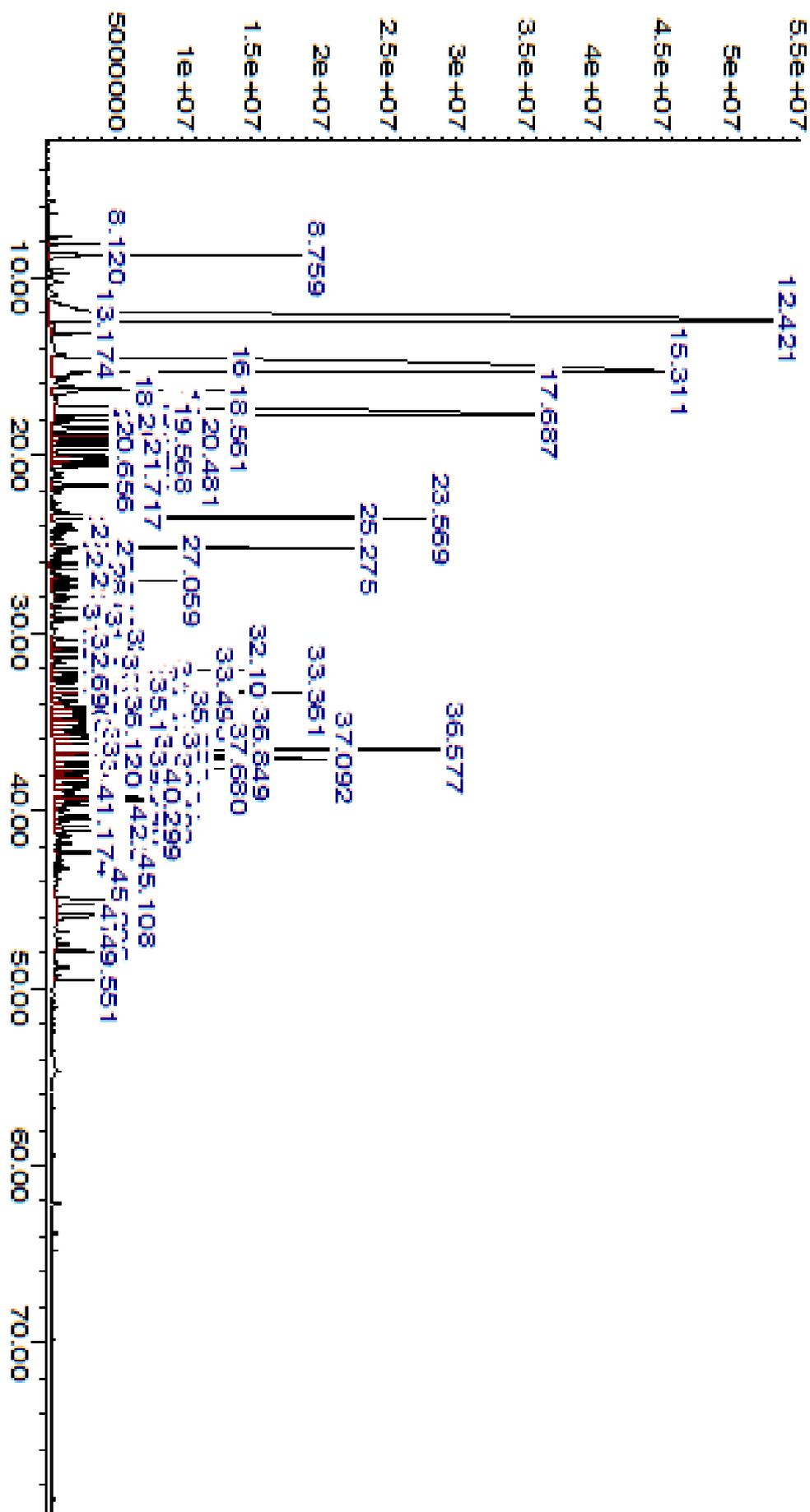


Figure 3: Chromatogramme de l'analyse par GC/MS des huiles essentielles de Keddara obtenues par prétraitement aux ultrasons à 45 min (US-HD45)



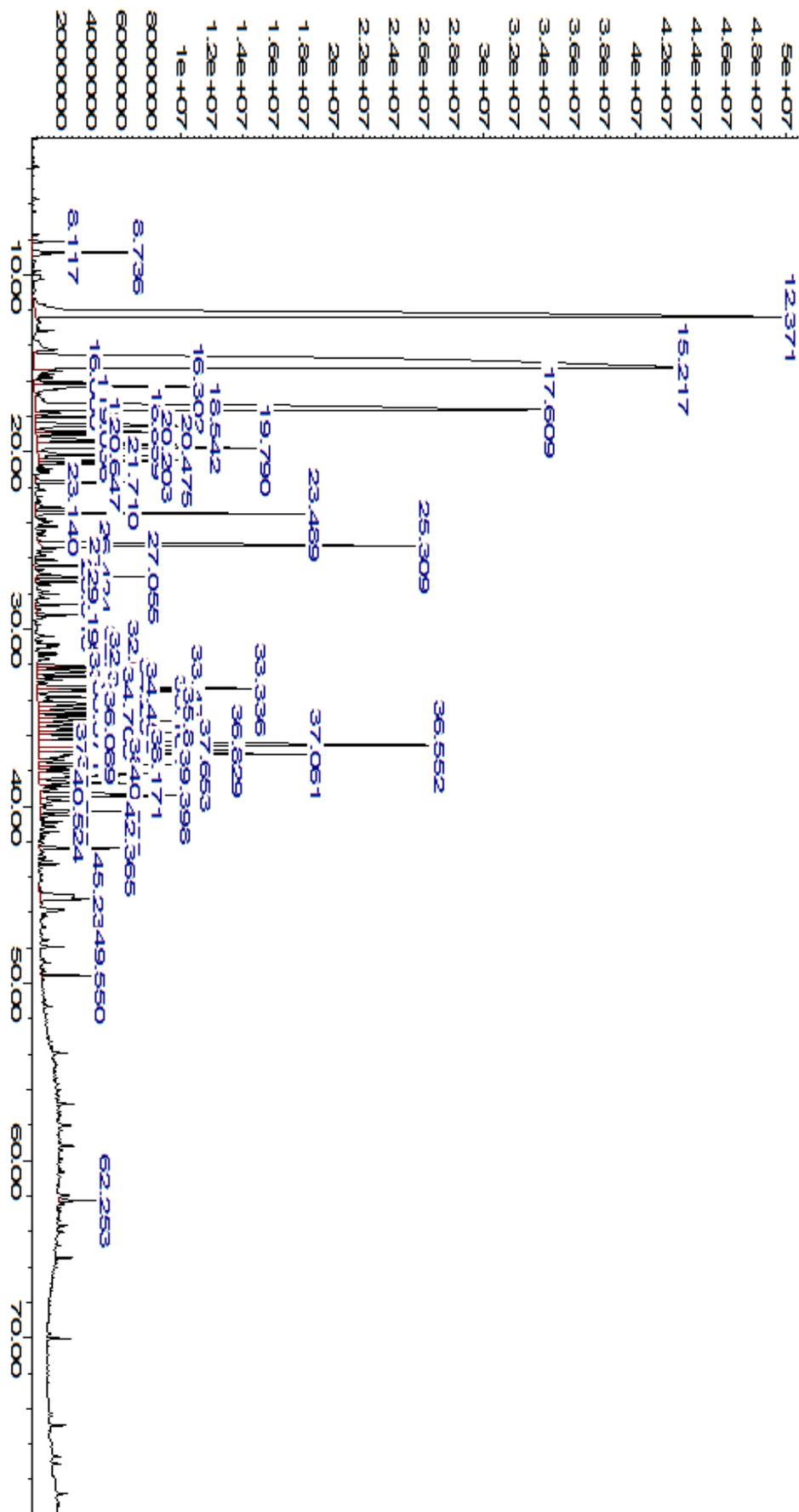
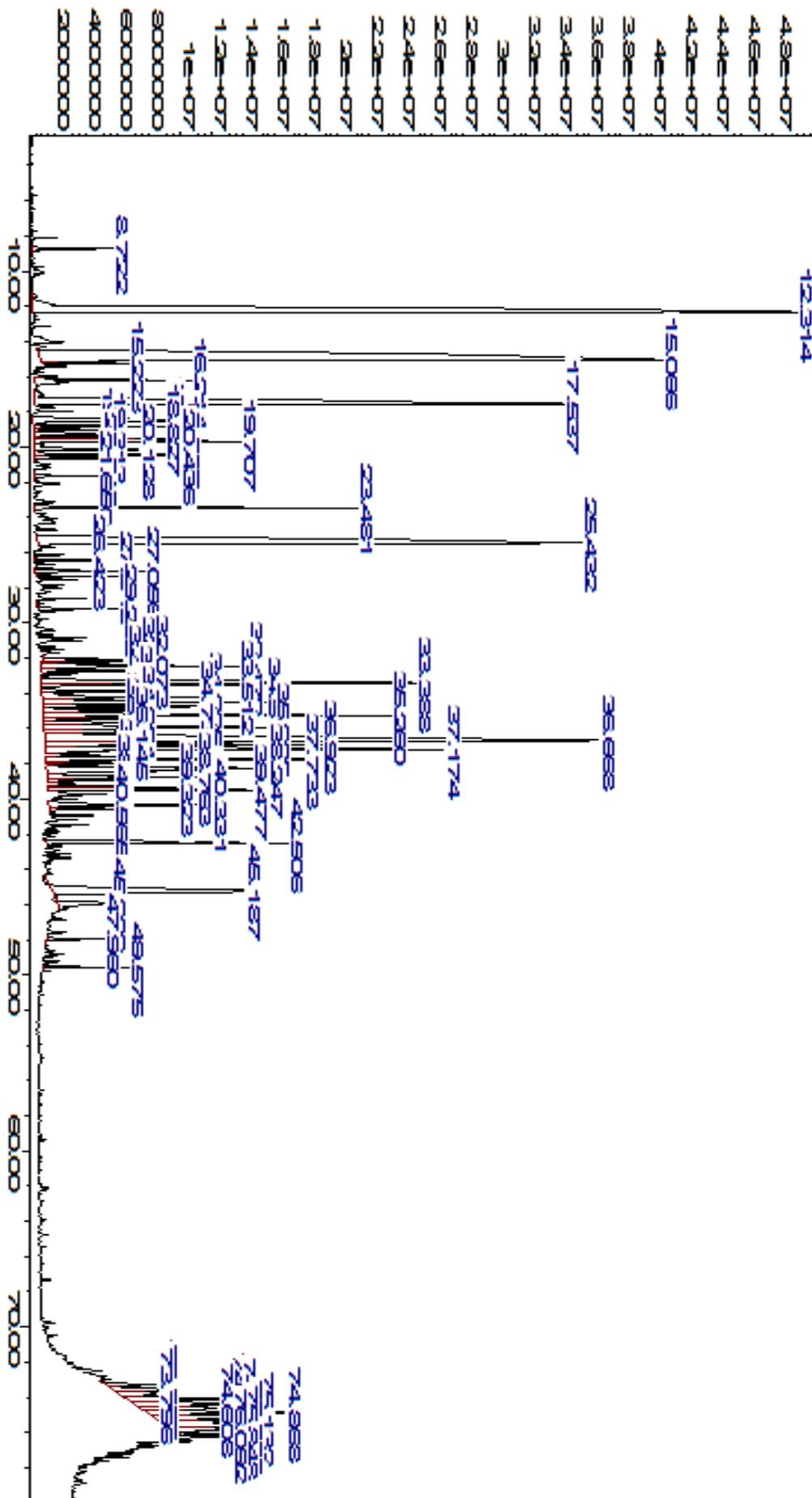


Figure 5: Chromatogramme de l'analyse par GC/MS des huiles essentielles d'El-kahla obtenues par prétraitement aux ultrasons à 60 min (US-HD60)



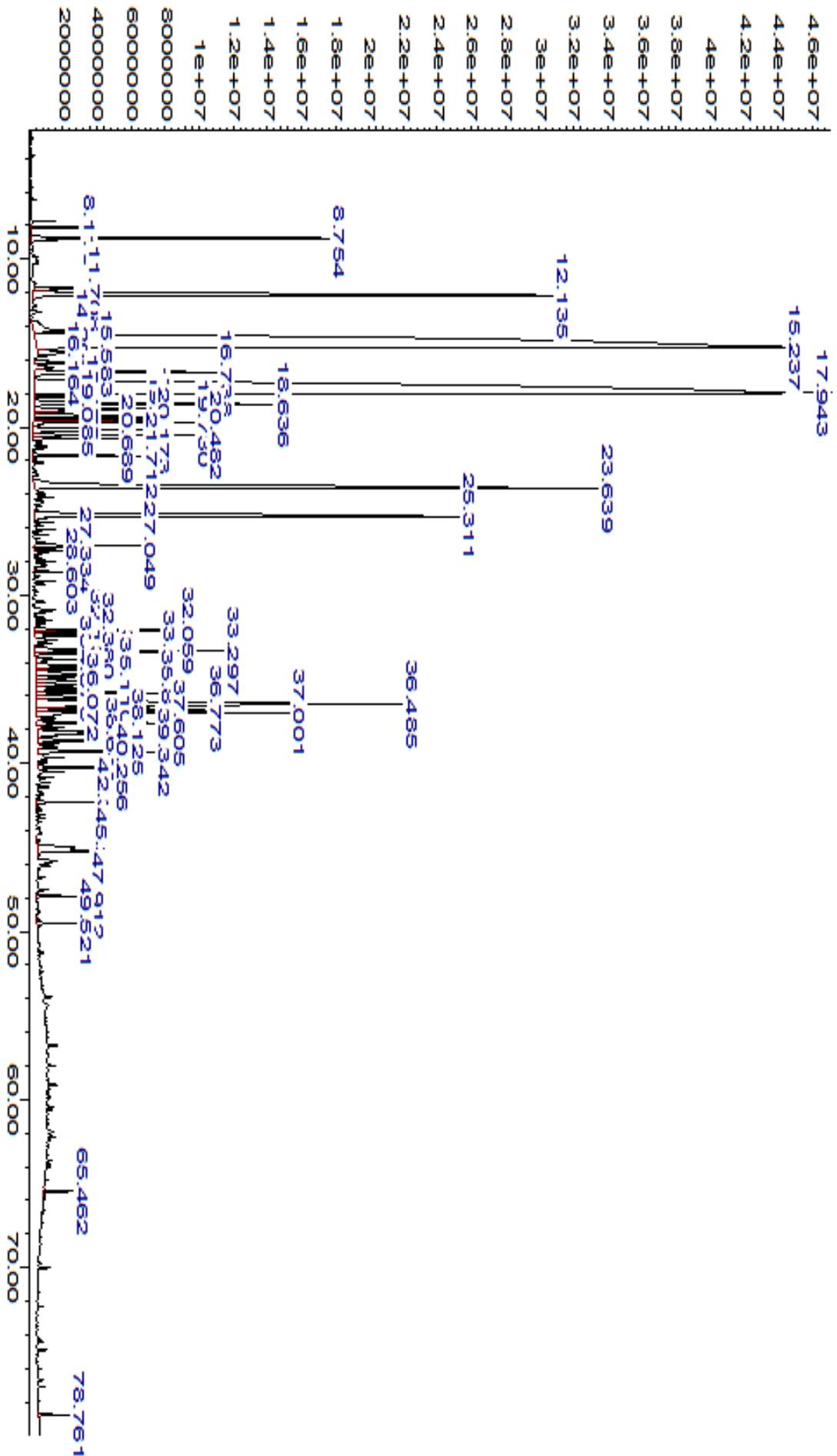


Figure 7: Chromatogramme de l'analyse par GC/MS des huiles essentielles d'Adekar obtenues par prétraitement aux ultrasons à 10 min (US-HD10)

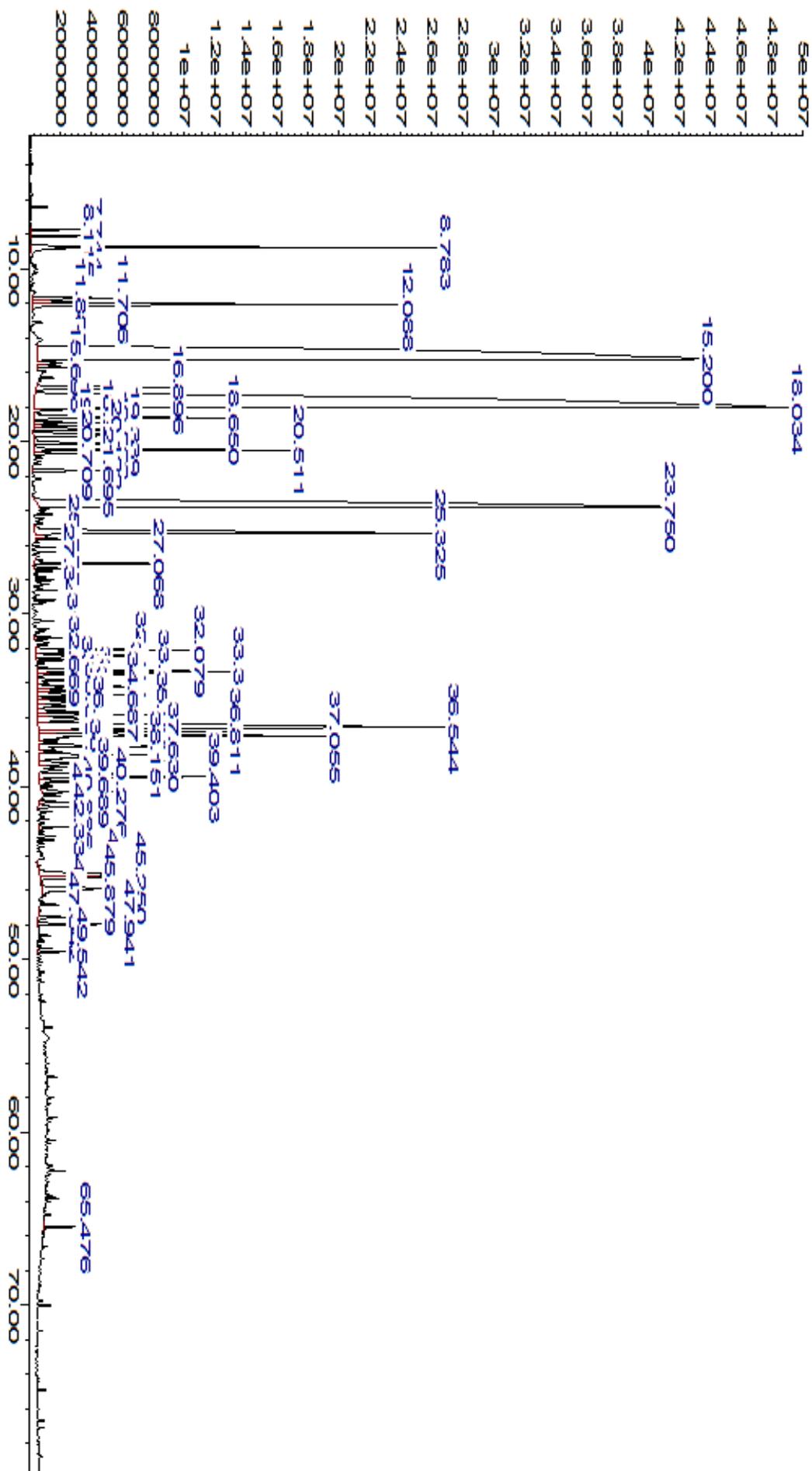


Figure 8: Chromatogramme de l'analyse par GC/MS des huiles essentielles d'Adekar obtenues par hydrodistillation (HD).

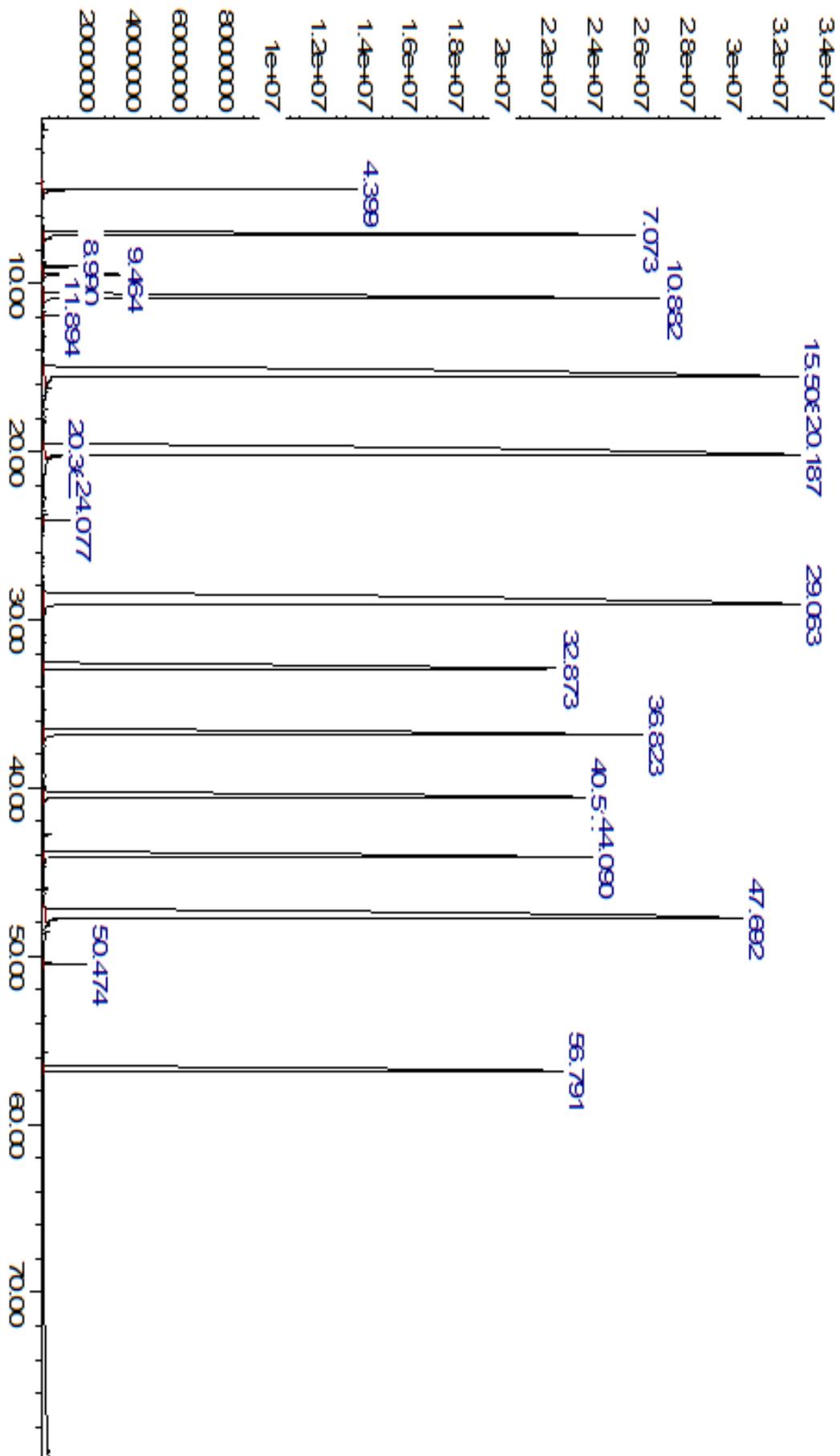


Figure 9: Chromatogramme de l'analyse par GC/MS de la série d'alcane.