



Extraction, composition et valorisation de l'eau aromatique de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) dans la dermopharmacie

Boukhatem Mohamed Nadjib (1), Hamaidi Mohand Said (1), Saidi Fairouz (1), Hakim Yahia(2), Benomier Karim (3).

(1) *Unité de recherche "Biotechnologies Végétales", Département de Biologie, Université SAAD Dahleb, Route de Soumaa, BP 270 Blida. Algérie.*

(2) *Société "Extral Bio" des huiles essentielles, Route de Chiffa, Blida.*

(3) *Laboratoire de Stérilité, Complexe Antibiotical de SAIDAL, Médéa.*

Résumé

Notre étude s'inscrit dans un cadre de contribution à la valorisation d'une plante médicinale, le géranium rosat (*Pelargonium graveolens*), via l'utilisation de ses eaux aromatiques (hydrolats) dans la dermopharmacie et la fabrication des cosmétiques. L'extraction de la fraction aromatique de plante, accomplie par hydrodistillation, a abouti à l'obtention de deux phases non miscibles (huile essentielle et hydrolat) qui ont été séparées par décantation. Afin de pouvoir déterminer la composition des eaux aromatiques par chromatographie gazeuse-Spectrométrie de masse, il a été nécessaire de les « concentrer » en procédant à une extraction liquide-liquide.

Le profil chromatographique des hydrolats est caractérisé par la prédominance des composés oxygénés et hydrophiles (géraniol, oxyde de linalool, hydroxylinalool) alors que les composés hydrocarbonés sont quasi-absents. Le contrôle de la qualité microbienne de l'hydrolat a été accompli par filtration sur membrane. Cette analyse a confirmé leur qualité microbiologique satisfaisante due à la présence de certaines molécules antimicrobiennes (géraniol, linalool). Sur le plan thérapeutique, les crèmes dermiques, fabriquées à base d'hydrolat de géranium rosat, présentent une excellente activité cicatrisante. Exempte de toute toxicité dermique, elles apparaissent comme une solution naturelle et efficace pour faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique. L'utilisation de l'eau aromatique de géranium comme solvant actif dans les préparations dermopharmaceutiques est pleinement justifiée.

Mots clés : Géranium rosat, Chiffa, eaux aromatiques, hydrolats, hydrolathérapie, filtration sur membrane, crème dermique, cicatrisation.

1. Introduction

L'hydrolathérapie, ou thérapie par les eaux florales, est une branche de l'aromathérapie, elle-même issue de l'ensemble plus vaste de la phytothérapie. Au cours de la distillation d'une plante, deux produits très précieux émergent: d'une part l'huile essentielle (HE) et d'autre part l'hydrolat (HA) à savoir l'eau imprégnée de molécules aromatiques. En l'espace d'une décennie, les HE ont fait un chemin remarquable dans la conscience collective. En revanche, il n'en va pas de même des hydrolats qui restent bien souvent peu exploités. Ces "eaux magiques" ont pourtant, elles aussi, des vertus thérapeutiques hors pair, issues de la plante, mais aussi de la faculté purificatrice de l'eau. (Beaudoux, 2000)

Malgré sa faible concentration en principes actifs (PA), l'HA présente certaines activités pharmacologiques

intéressantes. Certains sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, thérapeutiques et culinaires mais leur intérêt principal, c'est qu'ils sont toujours beaucoup mieux tolérés que les HE. (Bosson et al, 2005)

Notre travail fait apparaître des molécules « aromatiques bioactives » issues de l'eau aromatique du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*), référencées par la médecine traditionnelle et supposant ainsi des activités biologiques. (Baba Aissa, 2000)(Belouad, 2000)(Lis-Balchin, 2002)

Originaires du Cap, cette plante a été introduite en Algérie au 19^{ème} siècle où elle a acquis des proportions gigantesques durant la période coloniale (Charabot, 1913)(Quezel et Santé, 1963). Aujourd'hui, cette culture est menacée d'abandon malgré les immenses atouts qu'elle offre.

L'hydrolat de géranium, d'odeur fraîche et délicate, est considéré comme la meilleure des "eaux florales". C'est un allié dans tous les soins de la peau pour ses propriétés

régénérante, astringente et purifiante. (Demarne, 1985)(Rose, 1999)

Deux ordres de préoccupation se rencontrent dans notre étude et lui donnent sa substance. Le premier a trait à l'extraction, la caractérisation chromatographique et le contrôle de la qualité microbienne des eaux aromatiques du géranium. L'autre objectif assigné à cette étude est l'incorporation des hydrolats dans une crème dermique afin d'évaluer son activité cicatrisante *in vivo* chez un modèle animal.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

La partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) du géranium rosat a été récoltée en pleine floraison (Mai 2008) à partir d'un champ de culture (Figure 1) situé dans la plaine de Mitidja (Chiffa, wilaya de Blida, Algérie). Ces plantes, issues de l'agriculture biologique, appartiennent au domaine privé « Extral-bio ».

Ces géraniums, dont le nombre avoisine les 600 plants, ont été bouturés en octobre 2004 avec des écartements aléatoires et une densité de 2 à 4 plants/m². L'identité et la systématique de la plante ont été confirmées au Jardin d'Essais d'Alger.



Figure 1: Champ de culture de géranium rosat à Chiffa.

2.2. Extraction des eaux aromatiques :

L'hydrodistillation du géranium rosat a été accomplie à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (Clevenger, 1928). C'est aujourd'hui la méthode préconisée par la Pharmacopée Européenne. (Anonyme, 2002).

2.3. Récupération des eaux aromatiques :

La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau aromatique par décantation. Cette dernière contient une quantité non négligeable d'essence aromatique sous forme solubilisée.

La récupération de cette huile (pour l'analyse chromatographique) est réalisée par extraction liquide-liquide avec un solvant organique (éther diéthylique) (Rao, 2002). L'utilisation d'un évaporateur rotatif sous vide permet d'éliminer l'éther et d'obtenir ainsi l'huile essentielle dissoute dans l'hydrolat.

2.4. Analyse chromatographique de l'eau aromatique: (ISO 11024-1:1999) (Afnor, 2000)

Une quantité de 1µl d'huile, extraite par solvant, est diluée dans le dichlorométhane qui sera injecté dans l'appareillage pour déclencher les procédures d'analyse.

L'analyse chromatographique a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse (HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70eV. La colonne utilisée est capillaire HP-5MS (30m x 0,25mm). La température est programmée de 50 à 250°C à raison de 4°C.min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse piloté par un logiciel « HP ChemStation ». L'identification des constituants est faite sur la base de la comparaison de leurs indices de rétention.

2.5. Contrôle de la qualité microbienne de l'hydrolat du géranium rosat :

Ces protocoles s'appliquent à l'analyse des eaux aromatiques ainsi que de l'eau purifiée selon les monographies de la Ph.Eur. (Anonyme, 2002). Ce contrôle a pour but le dénombrement de la flore microbienne mésophile aérobie viable.

- Prélèvements : Des échantillons d'eau aromatique ont pu être collectés de l'appareil (Clevenger) dans des récipients stériles. Le prélèvement a été effectué de façon à ne pas contaminer l'hydrolat.

- Appareillage et méthodes d'analyse : La technique de filtration sur membrane est utilisée chaque fois que la nature du produit le permet (préparations aqueuses) en utilisant des membranes d'une porosité de 0,45 µm.

Après introduction dans l'appareil muni d'une membrane d'une petite quantité d'un diluant stérile approprié (solution neutre (pH 7,1) de peptone de viande ou de caséine à 1g/l) et sa filtration, nous transvasons

dans l'appareil une quantité de 100 ml d'hydrolat à examiner. La filtration s'effectue immédiatement et la membrane entière sera transférée dans le milieu de culture gélose à l'hydrolysate de caséine et de soja (TSA) pour le dénombrement des germes viables totaux. Pour la détection des champignons, nous procédons de la même façon en utilisant cette fois-ci la gélose Sabouraud Chloramphénicol.

L'incubation se fait à 35°C pendant 5 jours au moins pour l'essai destiné à la recherche des bactéries et à 25 °C pour la recherche des levures et moisissures.

Les résultats sont exprimés en nombre de CFU/ml ("colonie formant unité"). D'après la méthode 2.6.12 de la Ph.Eur (Anonyme, 2002), la valeur limite pour l'eau purifiée est de 100 UFC/ml pour les germes mésophiles aérobies viables.

2.6. Préparation d'une émulsion à usage topique (Crème dermique) :

Choix du type de l'émulsion :

L'objectif assigné est la mise au point d'une formule galénique topique adaptée à l'eau aromatique de géranium rosat. La forme choisie est celle d'une préparation semi Table 1

Composition de la crème à base d'hydrolat de géranium (65%)

Dénomination INCI	Synonymes	%
Phase Huileuse (30%)		
- <i>Paraffinum liquidum</i>	Huile de paraffine	10-15
- <i>Cera albla</i>	Cire blanche	5
- <i>Stearic acid</i>	Acide stéarique	4
- <i>Cetyl alcohol</i>	Alcool cétylique	4
- <i>Ceto stearylic alcohol</i>	Alcool cétostéarylique	1-2
Phase Aqueuse (70%)		
- <i>Geranium hydrosol</i>	Eau aromatique de géranium	65
- <i>Glycerin</i>	Glycérine	4-5
- <i>Trolamine</i>	Triéthanolamine	0,3-2 (qsp pH 7)

2.7. Essais pharmaco toxicologiques :

Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée de l'hydrolat : (Pourrat, 2003)

L'irritation est un élément important en dermopharmacie. Elle correspond ici à l'effet qui peut survenir après une projection unique ou une exposition forte mais de courte durée. L'intensité possible de l'action

solide de type émulsion hydrophile (Lipophile/Hydrophile). Ce choix est orienté par la meilleure disponibilité des PA qu'offre cette forme ainsi que sa facilité d'étalement sur la peau. (Aquino, 2002)(Martini, 2006)

Préparation officinale et conditionnement de la crème dermique :

La formule de base sur laquelle nous avons travaillé est inspirée du formulaire thérapeutique magistrale (Tableau 1) (Fontenaux et al, 2008). Le protocole utilisé est celui d'une émulsion classique avec la préparation des deux phases (huileuse et aqueuse) à 70°C séparément puis leur mélange sous agitation rigoureuse. Enfin, l'adjonction d'un conservateur constitue un gage de stérilité. Nous avons opté pour le Kathon CG® à 0,001 %. Le conditionnement se fait en tube aluminium.

irritante sur la peau est décrite et peut aller de la simple sensation de picotement à une brûlure grave (substances corrosives) avec cicatrice séquellaire.

Dans un premier temps, les flancs de 3 lapins Albinos ont été tondu puis 3 scarifications parallèles de l'épiderme ont été pratiquées au niveau du flanc droit de chaque animal. Une quantité de produit équivalente à 2g d'eau aromatique a été appliquée sur les flancs droits des animaux tandis que les flancs gauches, intacts, serviront de témoins. L'irritation cutanée a été appréciée aux sites d'application (scarifié et non scarifié) à l'aide d'une échelle

d'évaluation numérique après 30mn, 2h, 4h et 24 h. L'indice IPC sera calculé par la formule suivante :

$$\text{IPC} = \frac{\text{Somme valeurs de l'érythème et de l'œdème}}{6} \quad (2 \text{ flancs pour 3 lapins})$$

Selon la gravité et la durée des effets observés, l'HE sera classée en non irritante (IPC <0,5), légèrement irritante (IPC < 3), irritante (3 < IPC < 5) ou sévèrement irritante (5 < IPC < 8).

Évaluation de l'activité cicatrisante *in vivo* de la crème dermique :

Cette évaluation a été réalisée *in vivo* chez des lapins Albino. Elle a pour but l'appréciation de la potentialité accélératrice de la néoformation des tissus dermiques après l'application d'une crème à base d'hydrolat de géranium rosat (65%) sur des cicatrices superficielles. La comparaison a été faite avec un groupe d'animaux recevant une crème de référence (Madécassol®) et un groupe traité par Placebo. Le protocole suivi est celui décrit par Pourrat (2003). La fréquence d'application de ces crèmes sur les plaies est fixée de 1 à 2 applications par jour pendant 2 semaines. L'observation macroscopique est réalisée avant chaque nouvelle application. Une échelle de cotation (graduée de 4) a été établie pour suivre l'évolution du processus de cicatrisation.

3. Résultats et discussion :

3.1. Extraction de l'eau aromatique :

Par hydrodistillation de la plante fraîche, nous avons obtenu un rendement légèrement élevé (0,2%) en huile essentielle comparé à celui rapporté dans les normes AFNOR (0,15%). (Afnor, 2000)

Pour l'HA, d'aspect transparent, il a une odeur moins prononcée et fleurie. A partir de ce produit, nous avons pu extraire une quantité appréciable d'essence aromatique avoisinant 2 ml pour 1 litre. Par conséquent, l'hydrolat peut être plus ou moins saturé en constituants polaires (hydrophiles).

Pour la majorité des auteurs (Bosson et al, 2005)(Bruneton, 1999), l'eau aromatique d'une plante contient une certaine quantité d'essence. Celle-ci peut être plus ou moins saturée en constituants polaires ayant plusieurs origines combinées:

- une partie de l'HE est dissoute dans l'eau (1-5 % de la fraction décantée) ;

- une autre fraction est émulsionnée le plus souvent dans 10% d'eau ;
- enfin une quantité est fortement mélangée avec de l'eau et des molécules organiques tierces.

3.2. Composition chimique de l'eau aromatique :

Nous colligeons dans le tableau 2 les résultats de la composition chimique de l'eau aromatique du géranium par chromatographie gazeuse - spectrométrie de masse (CG-SM).

Au total, 12 composés ont été identifiés sur 18 ce qui représente un taux de 94%. Le composé majoritaire, le géranol (28%) est suivi du 2,6-diméthyl decane (21%) et du linalool (8,7%). La majorité des composés appartiennent à la famille des alcools. Aucun mono ou sesquiterpène n'a été détecté.

Le profil chromatographique de l'hydrolat présente de ce fait des composés spécifiques. Il contient en petite quantité des composés volatils semblables à ceux dans l'HE ainsi que des composés hydrosolubles non retrouvés dans l'huile.

Tableau 2:

Composition chimique de l'eau aromatique par CG-SM.

Composés	%
Géranol	28,169
2,6 diméthyle decane	20,974
Linalool	8,798
Alcool undécylque	7,767
Isopropyle naphthalène	6,147
Acétate de citronellyle	4,503
Trans Oxyde de linalool	4,255
Limonène 1,2 diol	3,783
Transhydroxylinalool	3,714
Oxyde de piperitone	2,835
Cis oxyde de linalool	1,722
Dihydroxyterpineol	1,271
Total identifié	93,938

La composition des hydrolats s'éloigne donc de celle des huiles ; les molécules oxygénées hydrophiles s'y trouvent en grandes quantités (géranol, oxyde de linalool) alors que les composés lipophiles terpéniques sont la plupart du temps quasi absents (Rao, 2002)(Rose, 1999). Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par plusieurs études où leurs auteurs (Rao, 2002)(Piochon, 2008) révèlent la richesse de l'HA en composés oxygénés et hydrophiles.

3.3. Contrôle de la qualité microbienne de l'hydrolat du géranium :

Sur les cinq échantillons analysés, quatre répondaient aux exigences de la Ph. Eur. Un seul échantillon d'hydrolat accusait une charge de germes trop élevée, avec des valeurs dépassant 100 UFC par ml. En effet, une contamination microbienne et fongique a été décelée au niveau de cet échantillon. La répétition de l'essai sur d'autres prélèvements ne confirme pas ce résultat. Ce résultat supérieur à la norme pour un seul échantillon nous fait suspecter un problème de contamination externe liée probablement à un défaut d'asepsie lors des manipulations.

Selon Beutler et al., (2003), il est donc important non seulement de s'assurer que les prélèvements sont conformes, mais aussi, de suivre au cours du temps les valeurs de contamination. Les résultats de la surveillance de la qualité microbienne des hydrolats montrent l'absence de toutes contaminations bactérienne ou fongique. La préparation en officine des compositions semi solides à usage topique, où sera incorporée l'eau aromatique, ne pose guère de problèmes. L'eau aromatique de géranium présente une qualité microbiologique satisfaisante grâce à la présence de certaines molécules douées d'activité antimicrobienne (géraniol, linalool, alcool undécylrique).

D'après Martini et al., (2006), l'eau aromatique pourra être utilisé pour la préparation de médicaments et de produits cosmétiques autres que ceux qui doivent être stériles.

3.4. Essais pharmaco toxicologiques :

Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée de l'eau aromatique :

Cliniquement il n'y a pas de vésicules ou de fissures sauf pour un seul flanc où une légère rougeur transitoire a été observée. Dans ces conditions, l'hydrolat a présenté un IPC de 0,04 et sera considéré comme non irritant pour la peau.

Une étude française (Goossens et al, 2003), évaluant l'action irritante de la fraction aromatique d'une dizaine de plantes médicinales en suspension à 2% dans l'huile de vaseline chez des patients présentant un eczéma aux parfums par des tests épicutanés (patch test), a révélé que celle du géranium n'est pas irritante à la dose utilisée mais présente un certain pouvoir allergénique. Elle contient des molécules qui font partie de la liste des 26 allergènes répertoriés dans la réglementation.

Évaluation de l'activité cicatrisante in vivo de la crème dermique :

Les résultats obtenus après application journalière des crèmes dermiques sont résumés dans la figure 2 qui fait apparaître l'évolution de la cicatrisation avec le temps.

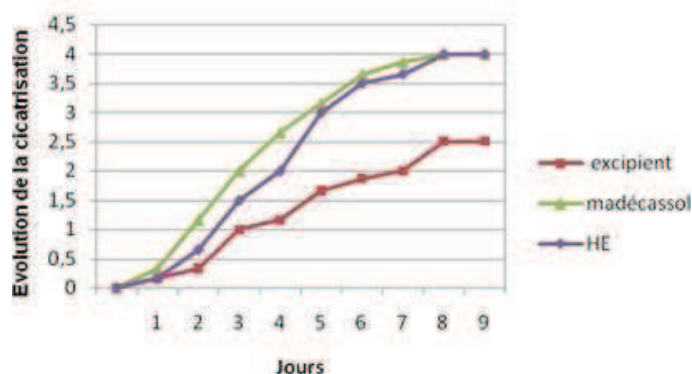


Figure 2 : Évolution de la cicatrisation des plaies avec 3 crèmes.

Une réduction totale de la surface des plaies chez le 1^{er} et le 2^{ème} lot a été constatée alors qu'avec le Placebo, la cicatrisation n'est que partielle. L'activité cicatrisante de notre crème dermique est confirmée. Des études cliniques (Lis-Balchin, 2005) (Voinchet et al, 2007), ont permis de mettre en lumière une activité cicatrisante indéniable du derme, commune à certains hydrolats dont celui du géranium.

4. Conclusion :

Bien que cette biomasse végétale soit une source très prometteuse pour l'avenir, très peu d'études ont porté sur l'analyse chimique détaillée et sur le potentiel dermatopharmaceutique des espèces végétales aromatiques.

Notre intérêt pour la valorisation de l'eau aromatique du géranium rosat est motivé par son potentiel thérapeutique à même de servir encore de tremplin à la recherche scientifique pour l'élaboration de nouvelles préparations galéniques à visée thérapeutique et à grande valeur ajoutée ou encore de substances ayant de belles perspectives sur le créneau du bien-être.

Traité au départ comme un sous-produit de la distillation de la plante, l'eau aromatique de géranium, de part sa composition chimique qui lui confère une qualité microbienne satisfaisante, trouve moult utilisations dans les produits cosmétiques et ouvre la voie à d'autres recherches qui seront peut être fécondes.

5. Références bibliographiques

- [1] Afnor. (2000). Recueil de normes : les huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris, 2:661-663.

- [2] Anonyme. (2002). Pharmacopée européenne. 4^{ème} édition, Strasbourg.
- [3] R. Aquino. (2002). Arômes méditerranéens pour la réalisation des lignes cosmétiques méditerranéenne. *Journal of Cosmetic Sciences*, 53:321-335.
- [4] F. Baba Aissa. (2000). p 45. Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident) », Edition EDAS-Librairie, Rouiba, Algérie.
- [5] D. Baudoux. (2000). p. 6-29, 221. L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles. Douce Alternative, Biarritz, France.
- [6] A. Belouad. (2001). p. 5-10. Plantes médicinales d'Algérie. Office des Publications Universitaires, Alger.
- [7] M. Beutler, A. KROPF, et S. Steiner. (2003). Production et stockage d'eau purifiée a l'officine : Recommandations de la Commission des médicaments des pharmaciens suisses AKA. *Journal suisse de pharmacie*, 14:506.
- [8] L. Bosson, et G. Dietz. (2005). p. 3-20. L'hydrolathérapie : Thérapie des eaux florales. Coll. Douce Alternative - Ed Amyris, Bruxelles.
- [9] J. Bruneton. (1999). p. 483-560. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Editions Tec & Doc, Paris.
- [10] F. Charabot. (1913). La Culture du Géranium Rosat. *Journal d'Agriculture Tropicale*, Paris, 13:289.
- [11] J. Clevenger. (1928). Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type. *American Perfumer & Essential Oil Review*, 1928, 467-503.
- [12] F.E. Demarne. (1985). Le géranium rosat. *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, n°62.
- [13] A. Goossens, et J.P. Lepoittevin. (2003). Allergie de contact aux cosmétiques et aux composants de parfums: aspects cliniques, chimiques et diagnostiques nouveaux. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, Vol 43, 5:294-300.
- [14] J.M. Fontenaux, et P. Klusiewicz. (2008). p. 29-66. Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments. Groupe Liaisons, Bruxelles.
- [15] M. Lis-Balchin. (2002). p. 116-131, 147-165, 184-217. Geranium and pelargonium: the genera *Geranium* and *Pelargonium*. CRC Press, Taylor & Francis, London.
- [16] M. Lis-Balchin. (2005). p. 195-201. Aromatherapy science: A guide for healthcare professionals. Pharmaceutical Press, London.
- [17] M.C. Martini. (2006). p. 33-55. Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. Éditions Tec & Doc, Paris.
- [18] M. Piochon. (2008). Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire de maitrise, option ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi, 13-51.
- [19] A. Pourrat. (2003). Étude de la cicatrisation des plaies chez le lapin et le rat. *J. Pharm. Belg.*
- [20] R. Quezel R, et S. Santa. (1963). p. 977. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques Méridionales, Tome II. Edition Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- [21] B.R. Rajeswara Rao, P.N Kaul. K.V. Syamasundar, et S. Ramesh. (2002). Water soluble fractions of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) essential oil. *Bioresource Technology*, 84:243-246.
- [22] J. Rose. (1999). p. 83-85. 375 essential oils and hydrosols. Frog edition, New York.
- [23] V. Voinchet, et A.M. Giraud-Robert. (2007). Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique. *Phytothérapie*, 2: 67-72.