



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار عنابة
UNIVERSITE BADJI-MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THÈSE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : BIOLOGIE VÉGÉTALE

Intitulé

**Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau.
Composition chimique, activité antioxydante et
antimicrobienne des huiles essentielles de
Citrus limon, *Cinnamomum zeylanicum* et *Thymus numidicus*.**

Présenté par : Mr BOUGHENDJIOUA HICHAM

Membres de jury :

TAHAR Ali	(Professeur)	Président	Université d'Annaba
SERIDI Ratiba	(Professeur)	Directrice de thèse	Université d'Annaba
ZELLAGUI Amar	(Professeur)	Examineur	Université de Oum El Bouaghi
HAMADA Haba	(Professeur)	Examineur	Université de Batna
HOUMANI Zahia	(Professeur)	Examineur	Université de Blida
AMOURA Nadia	(M.C)	Examineur	Université d'Annaba

Année Universitaire : 2014/2015

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires : de Botanique Médicale, de Pharmacognosie, de Microbiologie à la faculté des Sciences Médicales (Université de Annaba), le Laboratoire Régional de la Police Scientifique de Constantine. Ainsi que le CRAPC : Centre de Recherche Scientifique et Technique en analyses physico chimiques de (Bab Ezzeouar, Alger).

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer au Professeure **SERIDI RATIBA** ma respectueuse gratitude. J'ai été très sensible à sa grande disponibilité et à la totale confiance qu'elle m'a accordée. Sa grande expérience, ses précieux conseils et ses encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse. J'ai trouvé en elle un directeur ouvert qui m'a guidé dans mon travail tout au long de ces années. Je la remercie de s'être souciée de mon devenir.

Je remercie sincèrement Monsieur **TAHAR ALI** Professeur à l'université d'Annaba pour l'intérêt qu'il a bien voulu apporter à ce travail en acceptant de participer à cette commission d'examen autan que président.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Monsieur **ZELLAGUI AMAR** Professeur à l'université de Oum El Bouaghi, Monsieur **HAMADA HABA** Professeur à l'université de Batna, Madame **HOUMANI ZAHIA** Professeur à l'université de Blida et Madame **AMOURA NADIA** Maître de conférences à l'université d'Annaba, d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel.

Merci à ma famille et à mes amis.

Dédicaces

« On ne cherche que ce que l'on espère trouver » E. Ancelet.

A ma mère, à mon père.

A mes très chers sœurs : Zahra, Hassina, Nacera, Amina, Karima.

A mes enfants : Zakaria, Islam, Amane allah, Meriem.

A ceux, qui me sont chers : Je dédie ce travail.

Hicham Boughendjioua

Résumé:

Les infections microbiennes restent des affections graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison de l'usage extensif des agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages animaux qui conduit à la sélection de souches microbiennes résistantes.

D'un autre côté, les huiles essentielles et leurs constituants ont une longue histoire comme agent antimicrobiens.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de trois huiles essentielles : le citron (*Citrus limon*), la cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) et le thym (*Thymus numidicus*). Cette activité a été évaluée sur 16 bactéries responsables de mycoses humaines. Une très extrême sensibilité a été observée vis-à-vis des souches étudiées pour le thym et la cannelle, qui n'es pas le cas pour le citron.

Nous avons commencé par caractériser la composition chimique et quelques caractères physico chimiques (densité, indice de réfraction, et l'indice de fusion) des huiles essentielles étudiées.

L'identification des constituants a été réalisée en se fondant sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par (FTRI) et sur leur spectre de masse obtenu par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

L'analyse chromatographiques (CG/SM) des essences a permis d'identifier :

- 53 composés pour le citron : qui représentent un total de 99,986,
- 60 composés pour la cannelle : qui représentent un total de 99.938 %,
- 65 composés pour le thym qui représentent un total de 95.70%.

Qui a été confirmé par une analyse par (FTRI).

L'étude du pouvoir antioxydant de ces huiles a été réalisée par la méthode de DPPH. Les résultats obtenus ont montré l'existence d'une activité antioxydante des huiles essentielles mais moins efficace que celle de l'acide ascorbique. Pour une concentration de 1000 µg/ml, l'huile essentielle a révélé un pourcentage d'inhibition de = (28,16±0,091) % pour le citron, (4,3 ± 0,112) % pour la cannelle et (44,93±0,157) % pour le thym tandis que l'acide ascorbique est inhibée avec (94,81±0,286) % de DPPH.

L'ensemble des résultats microbiologiques obtenus au cours de cette étude montre que l'huile essentielle du thym et de la cannelle testés possèdent une activité antibactérienne très importante.

La diversité des espèces végétales ainsi que la variabilité des principes actifs naturels fait que le domaine des plantes médicinales reste toujours à exploiter.

Abstract:

The microbial infections remain serious affections and their frequency increased in a considerable way during last years because of the extensive use of the agent antibacterial and antifungal chemical in human medication and that in the animal breeding which leads to the selection of resistant microbial stocks. Of another with dimensions, essential oils and their components have a long history like agent antimicrobial.

In the present work, the volatile compounds of *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicu* and *Thymus numidicus* Poiret. were detected and identified by GC–MS and FTIR analysis. The essential oil was also subjected to a biological screening for its possible antioxidant activities by means of DPPH radical scavenging test, the sample tested showed slight antioxidant activity in comparison with the positive control (Ascorbic acid). *Citrus limon* *Cinnamomum zeylanicu* and *Thymus numidicus* Poiret essential oil was examined also against a panel of 16 bacterial strains using the agar diffusion method. The obtained results have shown that the essential oil exhibited moderate to strong antimicrobial activity against the tested microorganisms. This results suggested that the *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicu* and *Thymus numidicus* essential oil possesses a good antimicrobial and antioxidant properties, and is a potential source of active ingredients for food and pharmaceutical industry.

ملخص:

سجل مؤخرا عودة و بقوة لإستعمال الأعشاب الطبية في معالجة العديد من الأمراض و خاصة منها الجلدية و التي إستعصت في بعض الأحيان و الحالات على المركبات الصيدلانية في شكلها الكيميائي النهائي. حيث نجد في الواجهة الزيوت الأساسية (الطيارة) و التي تعود ضمن مختلف الجواهر الأساسية لهذه النباتات.

في خضم ما سبق ذكره حاولنا من خلال هذه الأطروحة تسليط الضوء على ثلاثة نباتات طبية ذات إستعمال واسع و كثيف في معالجة هذه الأمراض و يتعلق الأمر بنبته الليمون، القرفة و الزعيترة.

كمرحلة أولى قمنا بإسخلاص الزيوت الأساسية لهذه النباتات بثلاث طرق مختلف، ثم قياس مردودها و بعض خصائصها الكيميائية، تحديد تركيبها الكيميائية عن طريق تقنيتين CG–SM و FTIR، بالإضافة إلى قياس نشاطها الأكسدي و البيولوجي على ستة عشر 16 بكتريا مسببة لأمراض جلدية مختلفة.

كنتيجة خلصنا إلى أن نبتتي القرفة و الزعيترة ذات نشاط بيولوجي و تأثير كبير على البكتريا محل الدراسة بالمقارنة مع نبتة الليمون.

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION	p.14
HISTORIQUE	p.17
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE 1 : LES HUILLES ESSENTIELLES	
1. Métabolismes secondaires.....	p.23
2. Huiles essentielles.....	p.23
2.1. Définition.....	p.23
2.2. Caractérisation d'huiles essentielles.....	p.24
2.3. État naturel et répartition.....	p.24
2.4. Localisation.....	p.24
2.5. Propriétés physiques.....	p.25
2.6. Composition chimique.....	p.25
2.7. Extraction.....	p.25
2.8. Classification des huiles essentielles (En fonction de leur pouvoir antiseptique)	p.26
Groupe I : Les HE germicides majeurs ou essences majeures.....	p.26
Groupe II : Les HE moyennes.....	p.27
Groupe III : Les HE majeures aléatoires.....	p.27
2.9. Emploi des huiles essentielles.....	p.28
2.10. La conservation des huiles essentielles.....	p.29
2.11. Toxicité des huiles essentielles.....	p.29
2.12. Rôle écologique.....	p.30
2.13. Caractéristiques économiques.....	p.30
2.14. Activités biologiques des huiles essentielles.....	p.31
2.15. Activité antioxydante.....	p.33
2.15.a. Toxicité des antioxydants.....	p.33
2.16. Facteurs intervenant dans la qualité des huiles essentielles.....	p.34
2.17. Composition chimique des huiles essentielles.....	p.35
2.17.a. Principales structures chimiques.....	p.35
2.18. Les chémotypes des huiles essentielles.....	p.37

CHAPITRE 2 : MONOGRAPHIE

1. Le citron (<i>Citrus limon</i>).....	p.39
2. Cannelle (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>).....	p.41
3. Thym (<i>Thymus numidicus</i>).....	p.43

CHAPITRE 3 : TECHNIQUES D'EXTRACTIONS DES HUILES ESSENTIELLES

1. Méthodes d'extraction.....	p.45
1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau.....	p.45
1.1.1. Principe de l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles.....	p.45
1.2. Techniques de l'hydrodistillation.....	p.47
1.2.1. Propriétés physico-chimiques de l'hydrodistillation.....	p.48
1.2.2. Rôle de l'hydrodiffusion.....	p.48
1.3. Expression à froid.....	p.50
1.4. Extraction par solvants organiques.....	p.50
1.5. Extraction par fluide à l'état supercritique.....	p.50

CHAPITRE 4 : CARACTÈRES PHYSICOCHIMIQUES

1. Caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles.....	p.53
1.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles.....	p.53
1.2. Caractéristiques physiques.....	p.53
1.2.1. Indice de réfraction.....	p.53
1.2.1.1. Réfractomètre d'Abbe.....	p.54
1.2.1.2. Principe de la mesure.....	p.54
1.2.1.3. Définition de l'indice de réfraction.....	p.55
1.2.2. Indice de fusion ou d'ébullition.....	p.56
1.2.3. Indice de densité.....	p.57
1.2.4. Pouvoir rotatoire.....	p.58
1.2.5. Autres indices caractéristiques.....	p.58

CHAPITRE 5 : METHODES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

1. Identification des constituants dans un mélange complexe.....	p.60
2. Le couplage CPG-SM.....	p.61
3. Spectroscopie infrarouge a transformé de Fourier (IRTF).....	p.62
3.1. Principe.....	p.63

CHAPITRE 6 : ACTIVITÉS ANTOXYDANTE

1. Évaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH	p.69
---	------

1.1. Introduction.....	p.69
1.2. Principe de la méthode.....	p.70
1.3. Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant.....	p.70
1.4. Évaluation du potentiel anti-radicalaire.....	p.71
CHAPITRE 7 : ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNE	
1. Introduction.....	p.74
2. Activité antibactérienne.....	p.74
3. Activité antifongique.....	p.74
4. Activité antivirale.....	p.75
5. Activité liée à la composition chimique.....	p.75
6. Mécanismes d'action antibactérienne.....	p.75
7. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne.....	p.76
7.1. Aromatogramme.....	p.76
7.2. Méthode de diffusion en puits	p.76
7.3. Méthode de dilution.....	p.77
7.4. Méthode de micro-atmosphère.....	p.77
8. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide.....	p.77
9. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne.....	p.78
CHAPITRE 8 : LA PEAU	
1. Structure et fonctions de la peau.....	p.80
2. Épiderme.....	p.81
3. Absorption cutanée.....	p.82
4. Aspects qualitatifs et quantitatifs de l'absorption cutanée.....	p.83
5. Formes galéniques destinées à la voie cutanée.....	p.84
5.1. Préparations semi-solides pour application cutanée.....	p.84
5.1.1. Pâtes.....	p.85
5.2. Autres formes administrées sur la peau.....	p.85
CHAPITRE 9 : MICROORGANISMES ET PATHOLOGIES	
1. Microorganismes et pathologies.....	p.87
2. Définition de microorganismes.....	p.88
3. Infections bactériennes.....	p.88
4. Infections fongiques.....	p.89
5. Dermatophytoses.....	p.90
6. Moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes.....	p.92

6.1. Contre les champignons.....	p.92
6.2. Contre les bactéries.....	p.92
ETUDE PRATIQUE	
1. Choix du matériel végétal.....	p.94
2. Méthodes.....	p.94
2.1. Échantillonnage.....	p.94
2.1.1. Provenance.....	p.94
2.1.2. Parties employées.....	p.95
2.2. Méthodes d'extraction.....	p.95
2.2.1. Expression des épicarpes de citrus.....	p.96
2.2.1.1. Principe.....	p.96
2.2.1.2. Mode opératoire.....	p.96
2.2.2. L'hydrodistillation des écorces de la cannelle et du thym.....	p.96
2.2.2.1. Principe.....	p.96
2.2.3. L'entraînement à la vapeur d'eau du thym.....	p.98
2.2.3.1. Principe.....	p.98
2.2.3. Dosage volumétrique (Calcul du rendement).....	p.98
2.2.4. Caractéristiques des HE.....	p.98
2.2.4.1. Indices physico-chimiques.....	p.99
2.2.4.1.1. Mesure de l'indice de réfraction (Norme NF T 75 – 112).....	p.99
2.2.4.1.2. Détermination du point de fusion (AOCS, 1997).....	p.99
2.2.4.1.2. a. Principe.....	p.99
2.2.4.1.2. b. Mode opératoire.....	p.99
2.2.4.1.3. Mesure de la densité relative à 20°C (Norme NF T 75 – 111).....	p.100
2.2.5. Analyse chromatographique.....	p.100
2.2.5.1. Injecteur.....	p.100
2.2.5.2. Colonne.....	p.100
2.2.5.3. Détecteur de masse.....	p.100
2.2.6. Analyse par FTIR.....	p.101
2.2.7. Activité antioxydante.....	p.101
2.2.7.1. Détermination du pourcentage d'inhibition.....	p.101
2.2.7.2. Détermination du temps d'équilibre TEC50.....	p.102
2.2.7.3. Détermination de l'efficacité antiradicalaire EA.....	p.102
2.2.7.4. Analyses statistiques.....	p.102

2.2.8. Microorganismes utilisés.....	p.102
2.2.8.1. Études de l'activité antibactérienne Test « <i>in vitro</i> ».....	p.103
2.2.8.2. Protocole expérimental.....	p.103
2.2.8.3. Dépôt de disques.....	p.103
2.2.8.4. Lecture.....	p.104
RÉSULTATS ET DISCUSSION	
1. Expression des épicarpes de citrus, L'hydrodistillation des écorces de la cannelle	p.106
2. Dosage volumétrique.....	p.107
3. Densité.....	p.108
4. Indice de réfraction.....	p.108
5. Indice de fusion.....	p.109
6. Composition chimique.....	p.110
6.1. Composition chimique de l'HE du citron.....	p.110
6.2. Composition chimique de l'HE de la cannelle.....	p.114
6.3. Composition chimique de l'HE du thym.....	p.117
7. FTIR.....	p.122
7.1. Le citron.....	p.129
7.2. La cannelle.....	p.130
7.3. Le thym.....	p.130
8. Activité antioxydante.....	p.131
8.1. Cinétique de la réaction.....	p.131
8.2. Détermination d'IC50.....	p.135
8.3. Détermination de TC50.....	p.136
9. Activité antibactérienne « <i>in vitro</i> ».....	p.136
9.1. Aromatogramme.....	p.136
9.1.1. Le citron.....	p.142
9.1.2. La cannelle.....	p.143
9.1.3. Le thym.....	p.144
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	
ANNEXE.....	
	p.177

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau n°01 : Fréquences de vibrations des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques.....	p.66
Tableau n°02 : Influence du degré de pénétration sur l'activité.....	p.83
Tableau n°03 : Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme...	p.90
Tableau n°04 : Partie utilisée et quantité de la prise d'essai pour les trois espèces.....	p.94
Tableau n°05 : Temps nécessaire pour le traitement de la matière végétale.....	p.95
Tableau n°06 : Caractéristiques des trois HE chez les trois espèces.....	p.106
Tableau n°07 : Valeurs des densités des trois HE (moyenne±écart type).....	p.108
Tableau n°08 : Valeurs des indices de réfraction à 20°C (moyenne±écart type) des trois HE.....	p.108
Tableau n°09 : Valeurs des indices de fusion (moyenne±écart type) des trois HE.....	p.109
Tableau n°10 : Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Citrus limon</i>	p.112
Tableau n°11 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	p.115
Tableau n°12 : Composition chimique de l'huile essentielle du <i>Thymus numidicus</i>	p.120
Tableau n°13 : liens présents dans la molécule de limonène.....	p.129
Tableau n°14 : Pourcentage d'inhibition pour l'acide ascorbique, et les huiles essentielles du citron, de la cannelle et du thym.....	p.134
Tableau n°15 : Halos d'inhibition en (mm) provoqués par l'HE.....	p.141
Tableau n°16 : Sensibilité provoqués par l'HE.....	p.142

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 01 : Exemple des composants monoterpéniques.....	p.35
Figure 02 : Exemple des composants sesquiterpéniques.....	p.36
Figure 03 : Exemple des composants diterpéniques.....	p.36
Figure 04 : Exemple des composants triterpéniques.....	p.36
Figure 05 : Évolution des températures de distillation de l'eau et l'huile essentielle, et du mélange eau/huile essentielle en fonction de la pression du milieu.....	p.46
Figure 06 : Répartition de l'eau (E) et de l'huile essentielle (H) entre les phases liquide et vapeur en fonction de la pression lors de l'hydrodistillation.....	p.47
Figure 07 : montage d'hydrodistillation.....	p.47
Figure 08 : Réfractomètre à prisme d'Abbe.....	p.54
Figure 09 : Principe de la mesure de l'indice de réfraction.....	p.55
Figure 10 : Appareil de mesure de point d'ébullition.....	p.57
Figure 11 : Schéma du principe de la Chromatographie en Phase Gazeuse.....	p.62
Figure 12 : FTRI.....	p.63
Figure 13 : Schéma d'un Spectromètre à Transformée de Fourier.....	p.64
Figure 14 : Interférogramme en sortie du détecteur.....	p.65
Figure 15 : Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle).....	p.70
Figure 16 : Structure de la peau.....	p.80
Figure 17 : Différentes classes de microorganismes.....	p.87
Figure 18 : Infection superficielle à dermatophyte.....	p.91
Figure 19 : Dispositif de l'hydrodistillation.....	p.97
Figure 20 : Diffusion sur milieu gélosé.....	p.103
Figure 21 : Profil chromatographique de L'HE de <i>Citrus limon</i> analysée par CG/SM.....	p.113
Figure 22 : Profil chromatographique de L'HE de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> analysée par CG/SM.....	p.116
Figure 23 : Illustration simplifiée de chromatographies en phase gazeuse de 04 chémotypes différents de Thym.....	p.119
Figure 24 : Profil chromatographique de L'HE de <i>Thymus numidicus</i> analysée par CG/SM.....	p.121
Figure 25 : Résultat FTRI de l'huile essentielle du <i>Citrus limon</i>	p.123

Figure 26 : Résultat FTIR de l'huile essentielle du <i>Citrus limon</i> comparée a la bibliothèque.....	p.124
Figure 27 : Résultat FTIR de l'huile essentielle de la <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	p.125
Figure 28 : Résultat FTIR de l'huile essentielle de la <i>Cinnamomum zeylanicum</i> comparée a la bibliothèque.....	p.126
Figure 29 : Résultat FTIR de l'huile essentielle du de <i>Thymus numidicus</i>	p.127
Figure 30 : Résultat FTIR de l'huile essentielle du de <i>Thymus numidicus</i> comparée a la bibliothèque.....	p.128
Figure 31 : Graphiques de la spectroscopie IR.....	p.129
Figure 32 : Cinétique de réduction du DPPH par l'acide ascorbique.....	p.131
Figure 33 : Cinétique de réduction du DPPH par l'huile essentielle du citron.....	p.132
Figure 34 : Cinétique de réduction du DPPH par l'huile essentielle de la cannelle....	p.132
Figure 35 : Cinétique de réduction du DPPH par l'huile essentielle du thym.....	p.133
Figure 36 : Pourcentage d'inhibition pour l'acide ascorbique, et les huiles essentielles du citron, de la cannelle et du thym.....	p.135
Figure 37 : Détermination d'IC50.....	p.135
Figures 38 : Inhibition obtenu pour KPC+.....	p.137
Figures 39 : Inhibition obtenu pour Sa S 178.....	p.137
Figures 40 : Inhibition obtenu pour P miabilis S 120.....	p.137
Figures 41 : Inhibition obtenu pour Shigella S 241.....	p.137
Figures 42 : Inhibition obtenu pour SCN 128.....	p.138
Figures 43 : Inhibition obtenu pour KPC -.....	p.138
Figures 44 : Inhibition obtenu pour Serratia.....	p.138
Figures 45 : Inhibition obtenu pour SFL S 156.....	p.138
Figures 46 : Inhibition obtenu pour K.oxy S113.....	p.139
Figures 47 : Inhibition obtenu pour Sa ATTC 23.....	p.139
Figures 48 : Inhibition obtenu pour Ef S 154.....	p.139
Figures 49 : Inhibition obtenu pour AC S239.....	p.139
Figures 50 : Inhibition obtenu pour CF S 208.....	p.140
Figures 51 : Inhibition obtenu pour Ea S 214.....	p.140
Figures 52 : Inhibition obtenu pour Ef ATTC 29.....	p.140
Figures 53 : Inhibition obtenu pour Salmo S 226.....	p.140

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

°C : Degré CELSIUS.

A : absorbance.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

A_w : Activité d'eau.

BHT: Butyl-Hydroxy-Toluène.

CG/SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.

DPPH : Diphenylpicrylhydrazine.

DPPH⁺ : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl.

DPPH• : initiale de 50%.

FTRI : Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier.

g : Gramme.

h : Heure.

HE : Huile Essentielle.

I% : Pourcentage d'inhibition.

I'(%) : Taux d'inhibition des moisissures exprimé en pourcentage.

IC₅₀ : Concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %.

IRTF : Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier.

M' : Masse d'huile essentielle en gramme à partir des fleurs sèches.

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

m : Mètre.

ml : Millilitre.

mn : Minute.

nm : Nanomètre.

Ø : halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

R• : Radical libre.

RH : Antioxydant.

RHE : Rendement en Huile Essentielle.

T_{éb} : Température d'ébullition.

TEC₅₀ : Temps d'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC₅₀.

TIA : Toxique-Infection-Alimentaire.

µg : Microgramme.

Introduction :

Tout le monde sait que les animaux, lorsqu'ils sont malades, partent spontanément à la recherche des plantes qui contiennent la drogue propre à les guérir. L'homme primitif n'a sans doute pas manqué de faire la même observation ; il a probablement cherché à imiter les animaux lorsqu'il était frappé par la maladie ; mais ce n'est qu'une hypothèse. Peut-être poussé par la nécessité impérieuse de trouver un remède à ses souffrances, l'Homme a-t-il tourné naturellement son attention justement vers le règne végétal ; déjà celui-ci lui fournissait substances alimentaires, matières premières pour la construction d'habitations et la fabrication d'instruments utiles, bois de chauffage. Pour quoi n'aurait-il pas trouvé dans le monde végétal de quoi soigner ses maladies ? Quoi qu'il en soit, depuis des temps très lointains et chez tous les peuples, on a toujours cherché à identifier les plantes médicinales ; les découvertes archéologiques, faites dans les grottes et les palafittes de l'homme préhistorique, le prouvent abondamment.

En réalité les plantes nous offrent des substances médicamenteuses vraiment efficaces ; il suffit de rappeler, pour rester dans un domaine familier, les vitamines et les antibiotiques. L'industrie chimique et pharmaceutique a isolé les principes actifs des végétaux à un degré élevé de pureté et elle en a produit d'autre synthétiquement. Cependant, les plantes médicinales se révèlent souvent plus efficaces parce qu'elles associent plusieurs substances qui augmentent ou exténuent réciproquement leurs actions pharmacologiques spécifiques ; de plus, ces substances se trouvent dans un état physico-chimique particulier, elles se libèrent progressivement dans l'organisme, de sorte que l'effet thérapeutique se prolonge dans le temps (D'andreta, 1969).

Beaucoup de plantes ou de produits qui en sont retirés sont utilisés dans l'industrie des produits d'hygiène corporelle (peau). Avec la vogue actuelle pour le retour à la nature, l'apport des végétaux à la cosmétologie est important : oléagineux (huiles d'amandes de noisette, d'Avocat, beurre de cacao, etc.), émulsionnants, huiles essentielles, extraits aqueux, hydro-alcooliques, glycerinés, huileux, etc., eaux distillées de fleurs, sucres des fruits de légumes, etc. Ils sont administrés sous formes de crayons, bâtons, crèmes, élixirs, émulsions, gels, lotions, poudres, savons, shampooings, solutés, suspensions.....

La diversification de la production d'huiles essentielles ne peut être envisagée que si la caractérisation de ces substances naturelles est réalisée et celle-ci passe par la connaissance de la composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur commercialisation.

Ainsi, l'accès à des données complètes et fiables constitue un des objectifs prioritaires car les substances végétales se présentent, pratiquement toujours, sous forme de mélanges complexes de molécules volatiles ou non, constitués de plusieurs dizaines de composés en proportions variables et pouvant présenter des structures et des fonctions chimiques très variées. La caractérisation de ces substances naturelles nécessite la mise en œuvre de diverses techniques analytiques qui permettent non seulement d'apprécier sa valeur marchande, mais aussi de réaliser le contrôle de la qualité ou encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité.

Les infections microbiennes restent des affections graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés et d'interventions médicochirurgicales invasives (Hulin *et al.*, 2005). D'un autre côté, l'usage extensif des agents antibactériens et antifongiques chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages animaux conduit à la sélection de souches microbiennes résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers les végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouveaux médicaments. Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet de multiples études pour leur éventuelle utilisation comme alternative dans le traitement des maladies infectieuses. Le traitement des mycoses cutanées bénéficie actuellement de nombreux antifongiques actifs et efficaces. Malgré cela, le problème des résistances de plus en plus nombreuses à un ou plusieurs antifongiques persiste encore. Par ailleurs, le problème des récurrences n'est pas résolu et on sait qu'il n'y a pas d'immunité vis-à-vis des champignons, mais plutôt d'un terrain favorable aux mycoses. Ce problème de mycoses à répétitions a été soulevé et il semblerait s'agir beaucoup plus d'une absence d'éradication du germe que d'une infestation (Ouraïni *et al.*, 2007).

Ces différentes difficultés ont suscité notre intérêt pour la recherche d'autres substances antifongiques et/ou antibactériennes pouvant constituer une solution alternative aux médicaments actuels. Différentes espèces végétales sont connues depuis longtemps pour leurs effets antimicrobiens. Les plantes aromatiques et médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés médicales des plantes médicinales dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques. Ces propriétés, dues souvent à la fraction huile essentielle (HE), peuvent être mises à profit pour traiter les infections mycosiques. L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais

abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables (Ouraini *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, de nombreuses techniques analytiques sont disponibles et la démarche analytique adoptée est différente, suivant qu'il s'agit d'identifier des composés connus et dont les caractéristiques spectrales sont disponibles ou lorsque l'objectif est l'élucidation d'une structure non décrite dans la littérature. D'une manière générale, la fiabilité des résultats constitue le premier critère à prendre en compte et implique souvent la mise en œuvre de plusieurs techniques complémentaires. Globalement, on distingue les deux voies analytiques suivantes. La première voie est basée sur le couplage «en ligne» d'une technique chromatographique, qui permet d'individualiser les différents constituants, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM) et/ou la spectrométrie Infra-Rouge par Transformée de Fourier (IRTF) (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy), permettant l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres. Les données spectrales sont systématiquement associées à l'utilisation des indices de rétention, qui sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane.

Notre étude sera donc répartie en neuf chapitres, initiés par une recherche bibliographique où nous rapportons (du premier au septième chapitre) une généralité sur les huiles essentielles, techniques d'extractions, caractères physicochimiques, méthodes d'analyse et activité antioxydante et antimicrobienne, le huitième chapitre sera consacré à l'étude anatomique de la peau humaine, ainsi nous décrirons les différentes formes médicamenteuses destinées à la voie cutanée. Une généralité sur les microorganismes pathogènes et les principaux moyens de lutte contre eux, sont rapportés dans le neuvième chapitre.

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, le premier l'extraction ; par expression à froid (*Citrus limon*), par hydrodistillation (*Cinnamomum zeylanicum*) et par entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation (*Thymus numidicus*), dosage, et identification des HE. La composition de l'huile essentielle a été identifiée par (CG/SM) et par (FTIR). Et enfin mesure de l'activité antioxydant et tests de sensibilité des bactéries vis-à-vis de nos HE utilisées.

Le second abordera les différents résultats et leurs discussions.

Enfin, une conclusion générale, résume l'ensemble des résultats obtenus.

Historique:

Les premiers êtres vivants ont été des végétaux d'aspect étrange, qui flottaient dans le grand océan primitif, véritable bouillon de culture où se mêlaient des substances d'origine terrestre et atmosphérique. Leur restes, masses de silice plus ou moins ramifiées, ont été découverts dans les roches précambriennes vieilles de 2 à 3 milliards d'années, à la fois en Amérique du Nord et en Afrique du Sud.

Les plantes ne se fossilisent pas facilement. En effet, elles n'ont guère de parties dures, et les intempéries ainsi que la pourriture font disparaître leurs tissus avant qu'ils soient préservés dans roches. Les paléontologistes étudient donc très attentivement les fossiles qu'ils trouvent, et leurs travaux ont permis de reconstituer l'histoire de la végétation. Cette branche de la paléontologie, la paléobotanique, arrive à des reconstitutions de plus en plus complètes de végétaux disparus ; elle permet de rattacher des grandes lignes de l'évolution végétale, d'établir les parentés réelles entre les groupes de plantes, enfin de fournir des précisions sur l'écologie et le climat (Le monde de la nature, 1978).

Il est remarquable que toutes les civilisations, sur tous les continents, aient développé, à côté de la domestication et de la culture des plantes à des fins alimentaires, la recherche de leurs qualités thérapeutiques. Et il est peut être plus remarquable encore que cet ensemble de connaissances ait traversé les millénaires, en s'approfondissant, en se diversifiant, mais sans jamais devenir globalement caduc. L'usage des propriétés de l'opium retiré du pavot, 4000 ans avant qu'on apprenne à en extraire la morphine, est à cet égard significatif de la pérennité de ces connaissances, longtemps restées empiriques, et que depuis quelques siècles, le progrès des sciences modernes a rendues plus rigoureuses.

On peut, si l'on veut prendre une vue d'ensemble du progrès des connaissances humaines concernant les plantes médicinales, distinguer trois grandes périodes. Pendant l'Antiquité égyptienne, grecque et romaine s'accumulent des connaissances empiriques nombreuses qui seront transmises en particulier par l'intermédiaire des Arabes aux héritiers européens de ces civilisations défuntées. A partir de la renaissance, ces savants occidentaux vont mettre à profit le renouveau de l'esprit scientifique et la multiplication des voyages de découverte pour développer considérablement cet acquis et amorcer une mise en ordre rigoureuse de tous les éléments de l'expérience passée. En fin, surtout depuis la fin du XVIII^e siècle, le progrès très rapide des sciences modernes et venu enrichir et diversifier dans proportions extraordinaires le savoir sur les plantes, qui s'appuie aujourd'hui sur des disciplines comme la paléontologie, la géographie, la cytologie, la génétique, l'histologie, la biochimie.

En 1873, l'égyptologue allemand Georg Ebers fit l'acquisition d'un volumineux rouleau de papyrus ; après en avoir déchiffré l'introduction, Ebers fut surpris par cette phrase : « Ici commence le livre relatif à la fabrication des remèdes pour toutes les parties du corps humain ». Cet écrit se révéla être le premier traité médical égyptien connu. Il comportait une partie relative au traitement des maladies internes et une liste impressionnante de médicament.

Ces connaissances médicales nées en Égypte ancienne se répandirent notamment en Mésopotamie. Le docteur Reginald Campbell Thompson, conservateur adjoint du British Muséum, parvint à identifier, en 1942, 250 végétaux, minéraux et substances diverses dont les praticiens babyloniens avaient utilisé les vertus thérapeutiques, en particulier la belladone employée contre les spasmes, la toux et l'asthme ; des tablettes mésopotamiennes mentionnent le chanvre indien, auquel on reconnaît des propriétés analgésiques, et qu'on prescrit contre la bronchite, les rhumatismes, l'insomnie. Mais ce furent surtout les Grecs, puis par leur entremise, les Romains, qui héritèrent des connaissances égyptiennes, et les portèrent à un plus haut niveau. Aristote, esprit universel, s'enquit de l'histoire naturelle et de la botanique ; Hippocrate, souvent appelé «le père de la médecine» consigna avec ses disciples la somme de connaissances médicales de son temps dans l'ensemble de traités connu sous le nom de Corpus Hippocraticum : pour chaque maladies, y est décrit le remède végétal et le traitement correspondant.

Caton l'Ancien, au II^e siècle av J-C mentionna dans son traité *De re rustica* 120 plantes médicinales qu'il cultivait dans son jardin.

Au tout début de l'ère chrétienne, Dioscoride répertoria, dans son traité *De materia medica*, plus de 500 drogues d'origine végétale.

Le Grec Galien, dont l'influence sera aussi durable que celle d'Hippocrate, attachera en particulier son nom à ce qu'on appelle encore la pharmacie galénique: on distingue en effet l'emploi des plantes « en nature », c'est-à-dire en poudres, et les préparations galéniques, où des solvants comme l'alcool, l'eau, le vinaigre servent à concentrer les principes actifs de la drogue.

Le Moyen Age, ne fut pas précisément une époque de progrès scientifique rapide. Les domaines de la science, de la magie et de la sorcellerie tendent souvent à se confondre; des drogues comme la jusquiame noire, la belladone et la mandragore vont être considérées comme des plantes d'origine diabolique.

Au début du XVI^e siècle, le médecin suisse Paracelse essaie de cerner l'«âme», la «quintessence» des végétaux, d'où s'irradient leurs vertus thérapeutiques. Ne disposant évidemment pas des moyens d'analyse que fournira ensuite la technique moderne, il tente de

rapprocher les vertus des plantes de leurs propriétés morphologiques, leur forme, leur couleur : c'est la fameuse «théorie des signatures ». Son contemporain l'Italien Mattiolo comment l'œuvre de Discoride et découvre les propriétés du marron d'Inde et de la salsepareille d'Europe.

Les botanistes : Mathias de Lobel, Guillaume Rondelet, Charles de l'Ecluse, Jean et Gaspard Bauhin font faire de grands progrès à la classification systématique des végétaux, rendu de plus en plus indispensable par la masse immense des connaissances acquises.

En 1792, les missionnaires comme le père Plumier, botanistes comme Tournefort, ramène d'Orient 1336 plantes nouvelles.

Le catalogue des plantes médicinales s'est enrichi, la description de leurs caractéristiques et la détermination de leur emploi se sont précisées, la classification de leurs espèces a fini par s'imposer avec rigueur.

En 1804, le chimiste Derosne, isole la morphine de l'opium extrait du pavot, en 1817 les pharmaciens Pelletier et Caventou, isolent l'émétine des ipécas, en 1818, isolent, la strychnine de la noix vomique et, en 1820, la quinine du quinquina. On sait dorénavant reconnaître les vertus thérapeutiques d'une plante en fonction non des ressemblances que Paracelse avait voulu y voir inscrites, mais des composants chimiques qu'elle contient. Beaucoup de ces composants peuvent être aujourd'hui reproduits artificiellement par synthèse. (Secrets et vertus des plantes médicinales. Publié par sélection du Reader's Digest, 1986).

Pour la chine, la médecine traditionnelle qui se pratique depuis quelques 2500 ans fait grand usage des plantes qui constitue une partie majeure de cet art. Il comprend aussi l'acupuncture. L'occident reconnaît maintenant que la médecine traditionnelle chinoise offre des traitements efficaces pour des maladies diverses, y compris celles d'origine allergique. Les médecins du fameux Great Ormond Street Hospital for Sick Children à Londres furent impressionnés récemment lorsqu'ils constatèrent que des cas graves d'eczéma qu'ils avaient été incapable de guérir avec les médicaments habituels s'améliorait grâce à une formule spéciale regroupant dix plantes chinoises (Ridgway, 1994).

L'héritage des chinois fut recueilli par les Arabes, ainsi l'art de guérir connu un grand essor avec l'avènement de l'Islam. Le premier musulman qui tira largement profit de ces traductions médicales fut El-Razi (865-925). Le plus célèbre médecin arabe fut Avicenne (980-1037) appelé le premier sage, dans son deuxième livre du Canon de la médecine qui le consacre à la pharmacologie et à l'enseignement des remèdes naturels simple. Il y décrit 811 produits végétaux et minéraux en expliquant leurs effets sur l'organisme humain (Volak *et al.*, 1983).

Enfin à l'époque actuelle, nous voyons se poursuivre intensivement la recherche et l'étude scientifique des plantes médicinales dans de nombreux instituts, entreprises pharmaceutiques ou chimiques des pays industrialisés (Bezanger *et al.*, 1980).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

Chapitre 1 : Les huiles essentielles.

1. Métabolismes secondaires :

Les métabolites secondaires constituent un ensemble de molécules qui ne sont pas strictement nécessaires à la survie d'une plante, d'une bactérie ou d'un champignon.

Il s'agit majoritairement de molécules de taille et de masse faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (glucides, lipides et acides aminés). Elles sont majoritairement à la source d'odeurs jouant le rôle à la fois de répulsif envers les prédateurs (concurrents écologiques) et d'attractif, de pigments permettant de capter le rayonnement solaire mais aussi de protéger la plante contre ce rayonnement.

Parmi les métabolites secondaires, les HE sont les plus étudiées et présentent une grande importance commerciale. Il s'agit de mélanges naturels généralement dominés par des composés mono- ou sesquiterpéniques, plus rarement diterpéniques, et parfois par des phénylpropanoïdes.

Les HE trouvent des emplois dans des secteurs assez divers, principalement en parfumerie, en cosmétique et font aussi l'objet d'une consommation importante de la part de l'industrie agroalimentaire où elles sont appréciées pour leurs propriétés organoleptiques.

Les méthodes d'extraction des HE obéissent à des normes comme celle de l'AFNOR NF T 75-006 qui précise que seul l'entraînement à la vapeur, les procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus* et la distillation à sec peuvent produire une huile essentielle (Sutur, 2010).

2. Huiles essentielles :

2.1. Définition :

Ces produits, appelés communément essence, sont les substances odorantes volatiles contenues dans les végétaux. Leur volatilité les oppose aux huiles fixes qui sont des lipides. Ces huiles essentielles sont mélanges de constituants plus ou moins nombreux, généralement liquides (Paris et Moyse, 1976).

La définition d'une huile essentielle donnée par la pharmacopée française est aussi restrictive puisqu'elle exclut aussi bien les produits obtenus par extraction à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé (Bruneton, 1993).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.).

Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rosier), soit dans les sommités fleuries

(tagète, lavande), soit dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus), ou dans l'écorce (cannelier), ou dans les racines (vétiver), ou dans les fruits (vanillier), ou dans les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante (Anton et Lobstein, 2005).

2.2. Caractérisation d'huiles essentielles :

La caractérisation des huiles essentielles – et d'ailleurs de tout mélange naturel – peut prendre plusieurs aspects en fonction du besoin et de l'objectif assigné.

Ainsi, dans la très grande majorité des huiles essentielles, les 15-25 composés majoritaires représentent 80-95% de la composition globale et sont donc suffisants pour caractériser cette huile essentielle.

Il faut toutefois signaler que la connaissance des composés minoritaires est parfois un paramètre important de la qualité biologique ou organoleptique du produit et qu'en conséquence une analyse fine est nécessaire.

Il faut également signaler qu'une analyse peut être totalement faussée par la mauvaise identification d'un seul constituant (Sutour, 2010).

2.3. Etat naturel et répartition :

Elles se rencontrent dans tout le règne végétal ; Cependant, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Labiées. Tous les organes peuvent en renfermer, surtout les sommités fleuries (Lavandes, Menthes, Mélisse, ect.), mais on en trouve dans les racines ou rhizomes (Vétiver, Curcuma, Gingembre), les écorces (Cannelles), le bois (Camphrier, Sassafras), les fruits (Poivres, Badiane, fruit d'Ombellifères, de Citrus), les graines (noix de muscade).

A noter que, pour une même espèce, la composition des essences peut varier d'un organe à l'autre et suivant les conditions du milieu. En climat chaud, la teneur en huile essentielle est plutôt élevée (Paris et Moyse, 1976).

Quantitativement, les teneurs en l'huile essentielle sont plutôt faible, assez souvent inférieures à 1% (Belaiche, 1991).

2.4. Localisation :

Au point de vue de la localisation dans la plante, les huiles essentielles peuvent se former dans des cellules non différenciées, ou plus grosses (Lauracées).

Le plus souvent, elles sont localisées dans des organes sécréteurs : poils des Labiées et des composées : l'essence formée s'accumule sous la cuticule ; poches sécrétrices schizogènes

des Myrtacées, résultant de division répétée d'une cellule et de l'écartement des cellules filles laissant un méat ou s'accumule l'essence ; poches schizolysigène des Rutacées ou il y a d'abord formation d'un méat, puis lyse d'une partie du tissu sécréteur de bordure ; canaux sécréteurs, dont le produit de sécrétion renferme également des résines (Paris et Moyses, 1976).

2.5. Propriétés physiques :

- Ce sont des liquides à la température ordinaire.
- Volatiles, odorant.
- Généralement incolores ou jaune pâle.
- Leur densité est le plus souvent inférieure à 1.
- Leur indice de réfraction souvent élevé avec un pouvoir rotatoire.
- Peu soluble dans l'eau, solubles dans l'alcool et solvant organique.

(Paris et Hurabielle, 1980).

2.6. Composition chimique :

Les huiles essentielles sont des mélanges de complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatique dérivés du phénylpropane –beaucoup moins fréquents-d'autre part (Buneton, 1995).

Les huiles essentielles peuvent être mises en évidence dans les coupes d'organes végétaux au moyen de colorant spéciaux (Liophiles) : orcanette, Soudan III (Paris et Moyses, 1976).

2.7. Extraction :

1) On les obtient le plus généralement par **distillation** et entraînement par la vapeur d'eau. Les plantes sont placées dans un alambic. On fait passer à travers les végétaux un courant de vapeur d'eau ou bien on fait bouillir directement l'eau dans laquelle ont été mises les plantes entières, contusées ou broyées lorsqu'il s'agit d'organes durs (écorces, racines). Les principes volatils ne se dissolvent que très partiellement dans l'eau et l'essence peut être séparée par décantation du distillat après refroidissement.

On se sert le plus souvent pour recueillir les essences d'un récipient florentin à tubulure latérale : les essences moins denses que l'eau, sont séparées à la partie supérieure, les autres à la partie inférieure.

Au cours de l'opération, l'eau saturée d'essence est «cohobée », c'est-à-dire renvoyée dans l'alambic.

On peut saturer le distillat avec un sel neutre et l'épuiser par un solvant très volatil (éther, pentane), qui ensuite évaporé sous vide.

Cette méthode est très générale ; cependant, elle ne peut être utilisée lorsque les constituants de l'essence sont altérables par la chaleur.

2) Pour certaines essences comme celles des fruits de citrus (Orange, Citron), on a avantage à opérer par **expression** à froid du zeste frais. Celle-ci peut se faire à la main (procédés à la cuillère, à l'écuelle), ou après scarification mécanique.

3) L'extraction directe des plantes par des **solvants** volatils (hydrocarbures, alcools) puis distillation est très utilisée en parfumerie ou l'on prépare des «concrètes » et des essences dites «absolues » (soluble dans l'alcool à froid).

4) Pour les organes fragiles on peut pratiquer l'**enfleurage**, c'est-à-dire le contact avec un corps gras (axonge) qui se sature d'essence. Le corps gras est épuisé par l'alcool absolu et ce solvant est évaporé sous vide.

Les essences extraites d'une même plante par ces différentes méthodes n'ont pas exactement la même composition. Les Pharmacopées n'admettent que les deux premiers procédés.

Les essences ainsi obtenues sont purifiées par distillation fractionnée, ce qui permet de se débarrasser des constituants malodorants (amines, furfural) ou irritants (aldéhydes : essence de Niaouil).

Les hydrocarbures terpéniques sont souvent éliminés (essences déterpénées), car, étant insaturés, ils sont de mauvaise conservation et irritant pour la peau. Ces alcools déterpénées sont plus solubles dans les alcools faibles (Paris et Moyses, 1976).

2.8. Classification des huiles essentielles :

(En fonction de leur pouvoir antiseptique) :

L'étude analytique et comparative du pouvoir antiseptique des huiles essentielles sur les germes pathogènes permet une classification en trois groupes (Belaiche, 1991).

Groupe I : Les HE germicides majeurs ou essences majeures :

Nous avons attribué le terme d'essences majeures à un groupe d'huiles essentielles dont l'action «antiseptique » est forte et constante.

L'indice aromatique des essences de ce groupe se situe sensiblement entre 0,45 et 1 pour Gram (+), les Gram (-) et les levures.

Les huiles essentielles majeures sont au nombre de six et elles permettent de traiter selon les indications et dans les limites de l'aromathérapie plus de 90% des maladies infectieuses chroniques.

Ces huiles essentielles sont :

- 1-Thymus capitatus Hoffm et Link.
- 2-Cinnamomum zeylanicum Ness.
- 3-Thymus vulgaris L.
- 4-Eugenia caryophyllata Thumb.
- 5-Satureia montana L.
- 6-Malaleuca alternifolia Cheel.

Groupe II : Les HE moyennes :

Elles se différencient de l'huile essentielle majeure dont le pouvoir antiseptique est relativement constant (90% des cas). (L'indice aromatique est inférieur à 0,45)

Les essences moyennes présentent un caractère antiseptique plus aléatoire, elles sont à base de nombreuses spécialités pharmaceutiques.

Les principales HE moyennes sont :

- 1-Pinus sylvestris L.
- 2-Melaleuca leucadendron L.
- 3-Eucalyptus globulus Labill.
- 4-Lavandula vera DC.
- 5-Myrtus communis L.
- 6-Pelargonium graveoleus l'Hent.
- 7-Citrus aurantium var amara Link.
- 8-Artemisia dracunculus L.
- 9-Thymus serpyllum L.
- 10-Malaleuca viridiflora Gaerton.

Groupe III : Les HE majeures aléatoires :

La classification des huiles essentielles est le résultat de l'observation d'un très grand nombre d'aromatogrammes. Si les huiles essentielles majeures montrent une action fortement germicide dans près de 90% des cas, l'expérience nous a appris qu'il existait, lors de la lecture de chaque aromatogramme une ou plusieurs huiles essentielles qui montraient pour le germe testé, une action bactéricide très forte inhabituelle.

On appelle ces huiles : les HE de hasard ou les majeurs aléatoires, ou seul le hasard a permis d'obtenir une action bactéricide impossible à prévoir à partir de la composition chimique de l'HE testée ou des caractéristiques du germe microbien contre lequel elle est testée.

N'importe qu'elle HE peut devenir au moins une fois une HE majeure aléatoire ce qui explique la complexité de la composition chimique d'une essence aromatique.

Exemple de ces huiles : gingembre, citron, laurier (Belaiche, 1991).

2.9. Emploi des huiles essentielles :

Les huiles essentielles issues des sécrétions des plantes aromatiques et médicinales montrent des propriétés d'intérêt alimentaire, cosmétique, thérapeutique et pharmacognosique (Iserin *et al.*, 1996).

En parfumerie ; c'est le débouché principal des huiles essentielles de concrètes, des absolues et autres résinoïdes. La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût souvent élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier pour les formulations des grandes diffusions les produits synthétiques.

A la limite de ces secteurs, on notera la présence d'huile essentielle dans les préparations pour bains «calmants » ou «relaxants ».

Dans diverses industries ; surtout chimiques qui utilisent les isolats (isomères des substances pures isolées des huiles essentielles exemple : citronellal, linalol, comme matières premières pour la synthèse des principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes (Bruneton, 1995).

Dans le domaine agroalimentaire, l'huile essentielle du citron sert à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Iserin *et al.*, 1996, Robert et Lobstein, 2005).

C'est en gastronomie que se fait le plus large emploi des plantes à essences sous forme d'épices. Celles-ci sont réparties en épices aromatiques (arômes amers et acres) comme dans le cas du faux poivrier, ou simplement en épice pour les desserts et pâtisseries (Bruneton, 1999). Les huiles essentielles peuvent également être ajoutées dans les produits alimentaires destinés à la conservation (produits de la quatrième gamme). Elles s'ajoutent sur les produits de consommation dans le but d'aromatisation (quelques gouttes déposées sur les morceaux du sucre) (Pingot, 1998).

2.10. La conservation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles (elles s'évaporent très facilement) et, de plus, ne supporte ni la lumière ni la chaleur ; elles doivent donc être conservées dans des petits flacons de couleur sombre hermétiquement bouchés. Elles se gardent en général un ou deux ans. Les huiles extraites de l'écorce des agrumes, qui sont les plus volatiles, ne durent qu'environ six mois. (Peters, 1999).

2.11. Toxicité des huiles essentielles :

L'utilisation des huiles essentielles du citron extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (Robert et Lobstein, 2005).

Les huiles essentielles contenant des phénols, tels que le thym, la cannelle et le clou de girofle, devraient être employées avec prudence. La toxicité du foie peut se produire si les huiles essentielles sont utilisées à de fortes doses pendant un temps prolongé. Les cétones contenues dans l'armoise, la sauge et les huiles d'hysope peuvent ainsi causer ce genre de problème (Bruneton, 1993) et (Couderc, 2001).

De plus, certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques (Meynadier *et al.*, 1997) C'est en particulier le cas des huiles essentielles suivantes: la cannelle de Ceylan, la menthe, la Litsée, la mélisse, le pin, ou la mousse de chêne. Les réactions de la maladie sont variées et peuvent apparaître jusqu'à 3 jours après le contact du produit avec la peau. Ils vont du simple prurit (démangeaison) à l'eczéma allergique en passant par des plaques, un aspect psoriasique, voire des pigmentations ou dépigmentations locales.

La proportion de la population développant des allergies cutanées dues aux parfums est en augmentation car l'utilisation de parfums et de produits parfumés (cosmétiques, désinfectants parfumés, lessives, bâtons d'encens (Hayakawa, 1987) ne cesse d'augmenter. Il a été démontré que les allergènes présents dans l'air jouent un rôle évident dans la formation d'eczéma de contact, soit par inhalation, soit par contact cutané (Schnuch, 2006). Les huiles essentielles qui sont utilisées en parfumerie peuvent irriter les muqueuses respiratoires et favoriser le déclenchement de crises d'asthmes pour les asthmatiques (comme par exemple les sprays désodorisants). Il a été rapporté qu'en présence de parfums, les personnes asthmatiques et développant des allergies de contact montrent des détresses respiratoires plus fréquentes que les personnes saines. Cependant, les mécanismes immunologiques n'ont pas été démontrés (Elberling et Skov, 2007).

Une ingestion accidentelle d'huile essentielle peut, selon la sorte et la quantité, générer une intoxication grave comme le coma et même la mort. Les huiles essentielles très liquides peuvent parvenir dans les voies respiratoires si elles sont malencontreusement avalées ou vomies. Cela peut conduire à une inflammation des poumons (pneumonie).

Certaines huiles essentielles comme le citron, l'orange amère et la bergamote deviennent sensibilisantes et toxiques seulement sous l'influence de la lumière. De plus, les huiles essentielles contenant des phénols sont toxiques pour le foie (clou de girofle, thym, origan). Les cétones et dans une moindre mesure les lactones sont neurotoxiques (romarin, sarriette, cèdre, camphre, thuya, aneth, hysope).

La toxicité des huiles essentielles peut aussi provenir des contaminants (si l'huile essentielle est impure) et/ou des produits de dégradation de celles-ci car elles se modifient à l'air, à la chaleur et à la lumière. En effet la combustion de bâtons d'encens et de bougies parfumées ou seulement l'évaporation à chaud d'huile essentielle peut libérer des substances de combustion, des poussières fines, du formaldéhyde et d'autres substances volatiles qui peuvent solliciter les voies respiratoires (Willem, 2006).

2.12. Rôle écologique :

Parmi les composants majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpénoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs (Langenheim, 1969).

Par ailleurs, les plantes aromatiques productrices d'huiles essentielles, ont fait l'objet de diverses recherches en particulier dans le domaine de la parfumerie.

2.13. Caractéristiques économiques :

Si de nos jours quelques centaines de plantes aromatiques, parmi d'innombrables espèces recensées dans la nature, sont exploitées à l'échelle commerciale, c'est en partie parce que les facteurs agronomiques, climatiques, botaniques et olfactifs sont limitatifs mais d'autres critères sont aussi à prendre en compte.

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits

pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres.

Une relation entre la structure chimique et l'activité biologique est alors tentante, aussi la production de molécules naturelles pourrait entrer dans la composition de médicaments moins agressifs vis-à-vis de l'organisme, ou à des fins industrielles précédemment exposées.

Cette dernière perspective permet d'élargir le champ de valorisation des plantes aromatiques, (autrefois restreint du point de vue économique, à l'extraction de molécules olfactives), par l'exploitation des nombreuses et diverses activités biologiques, substantiellement évoquées par la médecine traditionnelle, que nous allons recenser et corréler à certains types de structures chimiques. Ce dernier travail fait apparaître des molécules « bioactives » dans des espèces référencées par la médecine traditionnelle supposant ainsi des activités biologiques (Bourrel, 1993).

2.14. Activités biologiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires (Pellecuer *et al.*, 1980) ou au niveau de la microflore vaginale (Viollon et Chaumont, 1994) et d'origine fongique contre les dermatophytes (Chaumont et Leger, 1989).

Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques (Sivropoulou *et al.*, 1996) qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique. La dose de thymol applicable sur la peau et les muqueuses est de 0,5%. Ingéré à la dose de 2 g ou à plus fortes doses, il est responsable de gastralgies avec nausées (Zambonelli *et al.*, 2004).

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (Zambonelli *et al.*, 2004) et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Mangena et Muyima, 1999).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des Labiatae : thym, organ, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... L'essence de thym est souvent rapportée comme étant

parmi les huiles les plus actives (Agnihotri *et al.*, 2003). Son composé majoritaire, le carvacrol (No. CAS 499-75-2), possède également une forte activité antimicrobienne (Caccionni *et al.*, 1998). D'après les travaux de Sivropoulou *et col.* (Zambonelli *et al.*, 2004), et Hudaib (Hudaib *et al.*, 2002), les huiles de menthe et d'origan présentent des activités antibactériennes remarquables contre les souches à Gram+ et à Gram -.

Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques. Chaumont et Leger (Chaumont et Leger, 1989) ont testé 12 composés aromatiques vis-à-vis de huit souches pathogènes pour l'homme *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* et 5 *Trichophyton spp.*

Ils concluent que les phénols (eugénol (No. CAS 97-53-0), chavicol (No. CAS 501-92-8), 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol (No. CAS 6627-88-9)) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique (No. CAS 104-55-2) et hydrocinnamique (No. CAS 104-53-0)) présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative.

Kurita (Kurita *et al.*, 1979 et Kurita *et al.*, 1981), ont classé les composés purs selon leur activité antifongique vis-à-vis de sept champignons.

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonctions chimiques :

Phénols >Alcools> Aldéhydes> Cétones> Ethers> Hydrocarbures

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol>thymol>isoeugénol>eugénol).

L'addition de groupements alkyl au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale.

L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Les travaux de (Zakarya *et al.*, 1993) ont montré l'importance de la spécification du genre et

de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait. Ils donnent un exemple de variations qualitatives et quantitatives de 21 espèces.

2.15. Activité antioxydante :

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (Richard, 1992).

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (Multon, 1982). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc (Madhavi *et al.*, 1996).

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (Resala) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation (Caillet et Lacroix, 2007).

2.15.1. Toxicité des antioxydants :

Les premières indications des effets possibles des antioxydants sur la santé datent des années 1970, alors que des chercheurs ont constaté que l'incidence réduite de certains cancers et de maladies coronariennes allait pair avec une diète riche en fruits, légumes et herbes. Or, il s'avère que ces végétaux regorgent d'antioxydants (Berger, 2006). L'intégration de molécules d'antioxydants à des denrées alimentaires constitue tous de même un défi. On reconnaît la fragilité à la chaleur de la vitamine C, qui est par ailleurs l'un des plus puissants antioxydants (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

L'ajout de vitamine E peut également poser des problèmes si on n'a pas prévu un emballage qui prévient l'oxydation par la lumière. De plus la surconsommation d'antioxydants peut entraîner une déficience des systèmes naturels de protection de l'organisme (système immunitaire) et cela peut nuire la santé en altérant de nombreuses fonctions vitales. Certains antioxydants sont responsables aussi à des réactions allergiques, des hypersensibilités, des troubles digestifs, etc. (Roberfroid, 2002).

Selon Alais (Alais *et al.*, 2003), les produits de synthèse ont été beaucoup étudiés sur le plan de la toxicologie chez l'animal. Des résultats variant avec les espèces ont été donnés : effet sur les poumons, le foie, la thyroïde, la coagulation sanguine ou l'action cancérigène. On ne peut les extrapoler à l'homme, mais on est porté à réduire leur emploi dans l'alimentation humaine.

2.16. Facteurs intervenant dans la qualité des huiles essentielles :

Les facteurs prédominants dans la qualité des huiles essentielles peuvent avoir deux types d'origines :

- _ Technologique.
- _ Naturel.

De profondes modifications de l'huile essentielle peuvent intervenir lors de l'exploitation des végétaux depuis leur collecte jusqu'à leur transformation industrielle.

Le mode de récolte, les conditions de transport (Yayi *et al.*, 2004), séchage et de stockage peuvent générer des dégradations enzymatiques (Bruneton, 1993). Les changements les plus importants interviennent pendant l'hydrodistillation sous l'influence des conditions opératoires, notamment du milieu (l'acidité, température) et de la durée d'extraction (Chemat *et al.*, 2007) (Lagunez rivera, 2006). D'autres facteurs tels que les traitements auxquels on peut procéder avant ou pendant l'hydrodistillation (broyage, dilacération, dégradation chimique ou enzymatique, pression, agitation) contribuent à la variation du rendement et de la qualité de l'huile essentielle (Lagunez rivera, 2006).

Au cours de l'hydrodistillation, le milieu aqueux résultant de l'immersion du matériel végétal atteint des pH compris entre 4 et 7 et occasionnellement, des valeurs inférieures à 4 pour certains (Lagunez rivera, 2006). Les constituants de l'essence native sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur, et peuvent subir des modifications chimiques. L'huile essentielle récupérée est un produit qui diffère sensiblement de l'essence originelle, d'autant plus que l'ébullition est longue, et le pH est faible (Morin et Richard, 1985).

La matière végétale est l'objet de réactions chimiques diverses : hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisations (Morin et Richard, 1985), pouvant être catalysées par des métaux présents à l'état de trace dans la plante ou provenant des équipements de récolte et d'extraction provoquant des transformations chimiques des constituants. L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit (Bruneton, 1993). Elle conduit à la formation d'acides organiques qui, à leur tour, catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation (Lagunez rivera, 2006).

2.17. Composition chimique des huiles essentielles :

La composition chimique des huiles essentielles dépend largement de l'influence des conditions d'hydrodistillation sur l'essence contenue dans la plante.

2.17.1. Principales structures chimiques (Ganou, 1993) :

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvé en tant que composé majoritaire dans quelques unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc... Divers autres constituants minoritaires leurs sont associés. De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques.

Les **composés terpéniques** sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonés (C₅)_n ramifiées, dérivées du 2- méthylbutadiène (isoprène) nous pouvons réaliser la classification suivante:

✓ les monoterpènes. Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures en **C₁₀**. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde.

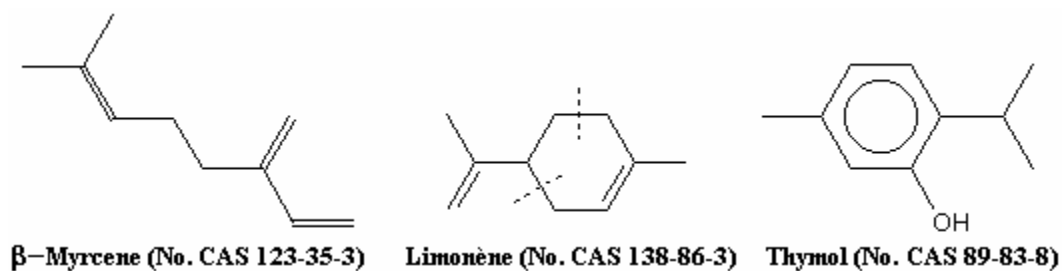


Figure n° 01 : Composés monoterpéniques (Ganou, 1993).

✓ les sesquiterpènes. Ce sont des hydrocarbures de formule **C₁₅**, soit une fois et demie (sesqui-) la molécule des terpènes (en C₁₀H₁₆). Un groupe particulier de sesquiterpènes est représenté par les azulènes, composés instables dont le nom vient de leur coloration bleue et qui sont importants en pharmacognosie en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta et hepta carbonés. Nous retrouvons dans ce groupe le chamazulène (des essences de camomille et de matricaire).

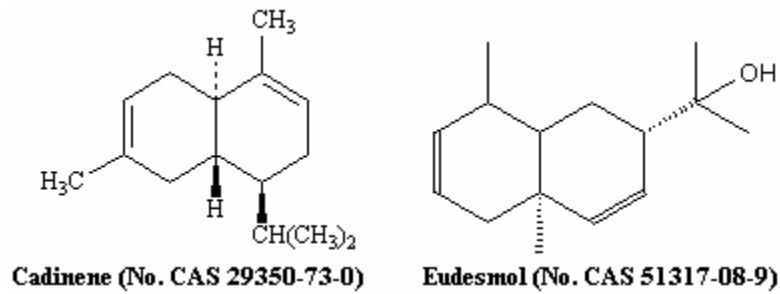


Figure n° 02 : Composés sesquiterpéniques (Ganou, 1993).

✓ les diterpènes qui sont des dérivés d'hydrocarbures en **C20**. Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines.

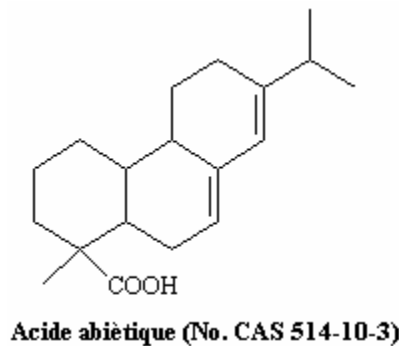


Figure n° 03 : Composés diterpéniques (Ganou, 1993).

✓ les sesterpènes. Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en **C25**.
 ✓ les triterpènes. Ces composés en **C30** sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés, ou sous forme hétérosidique.

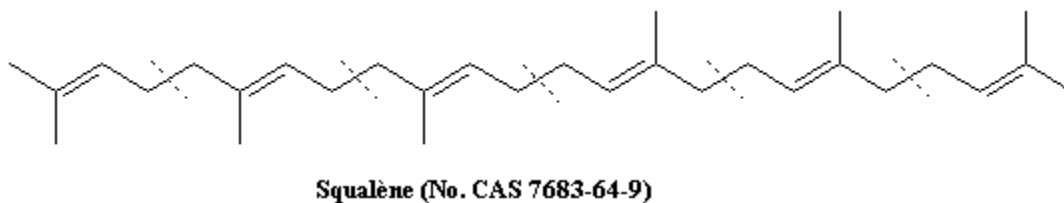


Figure n° 04 : Composés triterpéniques (Ganou, 1993).

✓ les polyterpènes le caoutchouc naturel est l'exemple plus nomme. Le caoutchouc naturel est un polymère de l'isoprène. Il est produit par la coagulation par la chaleur de la sève de l'hévéa.

Dans une huile essentielle, nous retrouvons presque exclusivement des mono- et sesquiterpènes. Les **dérivés du phénylpropane** sont moins abondants que les terpénoïdes, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique lui-même intermédiaire de la synthèse de la lignine à partir du phénylpropane.

Les composés sont néanmoins importants sur le plan qualitatif et quantitatif chez certaines espèces. Par exemple, le trans-anéthole qui est la molécule responsable en grande partie de l'arôme d'anis, constitue environ 80% de l'huile essentielle de fenouil (1-3% d'essence), et d'anis vrai (3% d'essence). Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle (Cu, 1990).

2.18. Les chémotypes des huiles essentielles :

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'huile essentielle. C'est l'élément qui permet de distinguer une huile essentielle extraite d'une même variété botanique mais d'une composition biochimique différente.

Cette classification capitale permet de sélectionner les huiles essentielles, pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Nous connaissons par exemple sous la même appellation botanique, deux grandes familles de thyms, subdivisées elles-mêmes grâce à la définition de leurs chémotypes respectifs.

De nombreuses huiles comprennent plus d'un chémotype. La sauge sclarée (*Salvia sclarea*) par exemple, contient 250 molécules différentes, dont 75 % issues de la famille des esters et 15 %, de celle des monoterpénols. Les molécules travaillent en synergie, ce qui explique la polyvalence des huiles essentielles et leur vaste spectre d'action.

Une fois que l'on connaît les propriétés des chémotypes ainsi que leur concentration dans une huile essentielle, on peut déterminer quels seront les effets de celle-ci, bienfaisants ou dangereux.

Enfin, il faut savoir qu'une même plante peut inclure diverses espèces, dont chacune possédera des chémotypes différents. La lavande (*Lavandula*), par exemple, compte plusieurs espèces dont les *officinalis*, les *stoechas* et les *latifolia* : c'est donc le nom latin complet qui nous permet de savoir de quelle plante exacte il s'agit. Le lieu de culture (climat, altitude, composition du sol) peut aussi influencer la composition chimique d'une plante (Site n° 01).

Chapitre 2 : Monographie.

1. Le citron (*Citrus limon*) :

C'est un petit arbre de la famille des rutacées, dont le fruit est appelé citron. Les citronniers sont cultivés dans les régions tropicales et subtropicales du globe, particulièrement dans la péninsule Ibérique, en Italie et en Californie. Au Moyen âge, les citronniers ont été introduits en Espagne et en Afrique du Nord à partir du Proche-Orient. Le citronnier cultivé est probablement un hybride de deux espèces proches, le citronnier vert et le cédratier.

Les citronniers atteignent à l'âge adulte de 3 à 6 m de haut et sont recouverts d'un feuillage clairsemé. La fleur possède cinq sépales, cinq pétales, de nombreuses étamines et un pistil isolé. La face supérieure de chaque pétale est blanche, tandis que la face inférieure est rosâtre. Les fleurs du citronnier ont une odeur comparable à celle des fleurs d'oranger, mais moins marquée.

Le citron est une baie jaune pâle, elliptique, qui possède habituellement une petite protubérance semblable à un mamelon au niveau de l'apex. L'exocarpe forme une écorce tannée contenant une huile essentielle aromatique, employée en parfumerie et dans l'industrie alimentaire. La couche blanche et spongieuse située juste sous l'écorce est le mésocarpe. La pulpe, qui comprend l'endocarpe, se compose de huit à dix segments contenant de petites graines pointues blanc jaunâtre.

La plupart des variétés cultivées de citron sont des hybrides. La multiplication des arbres dans les vergers de citronniers s'effectue habituellement par greffe de bourgeons de citronniers sur des espèces apparentées. Les arbres sont plantés dans un sol fertile auquel de l'engrais est rajouté continuellement. Les rangées sont espacées de 5 à 8 mètres, suivant la variété, le climat et la topographie de la région. Hormis lorsque des températures exceptionnelles retardent la floraison, les fruits sont produits toute l'année. Les fruits verts, presque mûrs, sont récoltés sur chaque arbre six à dix fois par an et portés à maturité par augmentation de la température. Les citronniers peuvent produire de 1 000 à 2 000 fruits par an à l'âge adulte. (Encyclopédie Microsoft ® Encarta ® 99. © 1993 - 1998 Microsoft Corporation).

Dans le domaine des Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales (PPAM), les huiles essentielles d'agrumes, destinées à des secteurs d'activité aussi divers que l'agroalimentaire, la cosmétologie, l'industrie pharmaceutique ou encore l'aromathérapie, occupent une place importante dans la production mondiale. Les trois quarts de la production d'huiles essentielles (HE) d'agrumes proviennent de l'aire méditerranéenne et des USA tandis que le

Brésil et l'Argentine assurent le dernier quart. Il s'agit de produits à haute valeur ajoutée permettent de valoriser une matière abondante et périssable (Dugo et Di Giacomo, 2002).

En aromathérapie avec les essences du *Citrus*, il est recommandé pour traiter : insomnies, anxiété, calme les palpitations, antirides, vasodilatatrice.

L'H.E de Citron est employée comme désaltérant, possédant des propriétés antimicrobiennes, tonique, stimulante, stomachique, carminative, diurétique, entretien de la peau et soins, obésités, antispasmodique, fébrifuge, coliques, états fiévreux, spasmes (Bardeau, 2009).

Classification:

Le citronnier appartient à la famille des Rutacées ; il a pour nom botanique *Citrus limon*.
(Encyclopédie Microsoft® Encarta® 99. © 1993 - 1998 Microsoft Corporation).

2. La cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) :

Beaucoup de sorte de Cannelles existent à la surface du globe mais deux d'entre elles sont plus connues et plus usitées :

- La cannelle de Ceylan – *Cinnamomum zeylanicum*
- La cannelle de Chine – *Cinnamomum cassia*

Arbre originaire de Sri Lanka et de l'Inde du Sud dont l'écorce fournit une épice, la cannelle. L'arbre, qui atteint habituellement 12 m de haut, est taillé de manière à ne laisser que quatre ou cinq tiges. Quand l'écorce commence à brunir, les tiges, qui peuvent atteindre 2,5 m de haut et 5 cm de diamètre à la base, sont récoltées et d'autres les remplacent. On effeuille alors l'arbre, on écorce les branches et l'écorce est mise à sécher pour obtenir la cannelle que l'on utilise en cuisine.

La cannelle est brun jaunâtre, aromatique et son goût est douceâtre et âcre. Depuis le Moyen âge, elle est utilisée comme épice et pour la fabrication de certains médicaments. Ses qualités aromatiques proviennent d'une huile volatile, l'essence de cannelle, extraite de l'écorce par distillation. La couleur de cette essence varie du jaune au rouge cerise; l'essence jaune sert à parfumer les savons et à aromatiser les desserts. La cannelle la plus prisée est la cannelle de Sri Lanka. Il existe une autre espèce d'arbre originaire de Birmanie, qui donne la cannelle de Chine, mais celle-ci est de moins bonne qualité.

Du fait du grand nombre de ses propriétés, la Cannelle est indiquée dans un grand nombre de pathologies ou de désordres organiques et fonctionnels.

En usage interne, elle est indiquée dans l'asthénie, les courbatures fébriles, la grippe, les affections dues au refroidissement et les syncopes. Elle est aussi employée dans les désordres intestinaux de toute sorte comme : les infections intestinales (choléra), l'atonie gastrique, les digestions lentes, les parasites intestinaux, les spasmes digestifs, les colites spasmodiques et les diarrhées. Elle peut être indiquée aussi dans les métrorragies, les pertes blanches, les hémoptysies et l'impuissance.

Elle était autrefois, très recommandée en saisons froides aux mélancoliques, aux insuffisants digestifs, aux vieillards (Encyclopédie Microsoft ® Encarta ® 99. © 1993 - 1998 Microsoft Corporation).

En usage externe, la Cannelle est utilisée pour combattre la pédiculose, la gale et soigner les piqûres de guêpe et les morsures de serpent (Site n° 02).

Classification :

Les canneliers appartiennent au genre *Cinnamomum* (350 espèces) de la famille des Lauracées. L'espèce sri-lankaise porte le nom botanique de *Cinnamomum zeylanicum*, l'espèce chinoise celui de *C. cassia* (Encyclopédie Microsoft ® Encarta ® 99. © 1993 - 1998 Microsoft Corporation).

3. Le thym (*Thymus numidicus*):

Le genre *Thymus* englobe de nombreuses espèces et variétés, et la composition chimique des HE de certaines d'entre elles a été étudiée depuis longtemps (Baser *et al.*, 1992), (Baser *et al.*, 1998), (Guillen et Manzanos, 1998), (Loziene *et al.*, 1998), (Papageorgio, 1980), (Saez, 1998), (Tumen *et al.*, 1998), (Vila *et al.* 1995) Aussi, les huiles de plusieurs espèces du thym sont investiguées pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (Agnihotri et Vaidy, 1996), (Amarti *et al.*, 2010), (Benjilali *et al.*, 1987a), (Benjilali *et al.*, 1987b), (Pellecuer *et al.*, 1980) et également pour leur activité antioxydante (Bouhdid *et al.*, 2006), (Brantner *et al.*, 2005), (Hazzit *et al.*, 2009), (Miguel *et al.*, 2004), (Miura et Nakatami, 1989), (Safaei-Ghomi *et al.*, 2009), (Sokmen *et al.*, 2004), (Vardar-Ünlü *et al.*, 2003). *Thymus numidicus* est une espèce endémique de l'Algérie et de la péninsule Ibérique. C'est une plante vivace, caractérisée par une inflorescence courte ou allongée à verticillas-tres interrompus et distants, les bractées et les bractéoles sont réduites, la corolle peut dépasser ou non le calice. La période de floraison s'étend du printemps à l'été. Par ailleurs, les substances naturelles douées d'activité antimicrobienne et antioxydante présentent un intérêt socio-économique très important dans le domaine de la recherche biopharmacologique. Plusieurs laboratoires à travers le monde se sont orientés vers la recherche des substances bioactives et leur valorisation.

Classification :

De la famille des Lamiacées. Ce genre comporte plus de 300 espèces. Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet portant de petites fleurs rose pâle ou blanches. Ces plantes sont riches en huiles essentielles et à ce titre font partie des plantes aromatiques. La principale huile essentielle de *Thymus vulgaris* est un terpénoïde qui lui doit son nom, le thymol, une substance bactéricide. Dans le sud de la France, le thym est aussi fréquemment appelé *farigoule* (de son nom occitan : *farigola*) (Encyclopédie Microsoft ® Encarta ® 99. © 1993 - 1998 Microsoft Corporation).

Chapitre 3 : Techniques d'extractions des huiles essentielles.

1. Méthodes d'extraction :

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (Garnero, 1977). Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic (Richard et Peyron, 1992).

1.1.1. Principe de l'entraînement à la vapeur d'eau des huiles essentielles :

Le procédé, correspondant à une distillation hétérogène, met en jeu l'application de deux lois physiques (Pavida *et al.*, 1976 et Biocchio, 1985):

- La loi de Dalton: dans laquelle la pression du mélange de vapeurs est égale à la somme des tensions de vapeur de divers constituants.

$$\mathbf{PT = TH + TE}$$

- La loi de Raoult: le rapport des quantités des entités distillées simultanément est fonction de la tension et des densités des vapeurs (donc des masses moléculaires) à la température de distillation choisie.

$$\frac{\mathbf{Mole\ H}}{\mathbf{Mole\ E}} = \frac{\mathbf{T_H}}{\mathbf{T_E}}$$

La relation de ces deux lois donne respectivement la pression totale et la composition des vapeurs en fonction des pressions partielles, d'où le calcul du taux de corps entraîné appelé également rapport d'entraînement :

$$\mathbf{R = TH/TE * M^{\circ}H/M^{\circ}E = PH/PE}$$

H et E désignent respectivement l'huile essentielle et l'eau

PT= Pression totale

T= Tension de vapeur

M°=masse molaire

P= poids

R= rapport d'entraînement

La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeurs 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 eau/huile essentielle distillée possède une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique (généralement proche de 100°C en raison de la faible tension des constituants odorants) alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. La **figure 05** montre l'évolution de la température de co-distillation d'un mélange hétérogène d'eau et d'huile essentielle.

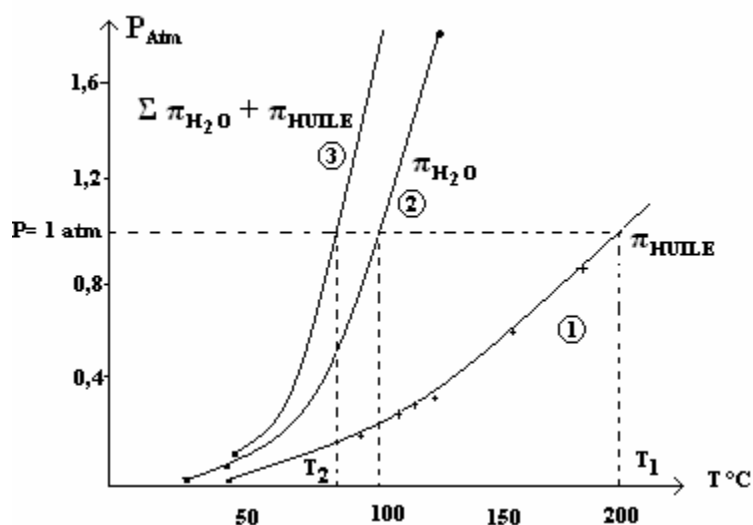


Figure n° 05 : Évolution des températures de distillation de l'eau et l'huile essentielle, et du mélange eau/huile essentielle en fonction de la pression du milieu (Martinez-Sosa, 1981).

Pendant l'entraînement à la vapeur, les liquides non miscibles semblent distiller simultanément comme s'il s'agissait de deux compartiments séparés (**figure 5.6**), bien qu'en pratique, ils soient mêlés. Or leurs vapeurs constituent un gaz homogène. On parle alors de co-distillation (Pavida *et al*, 1976). Dans les deux cas, représentés dans la figure I.2, si la pression partielle de l'eau est égale à celle de l'huile ($P^{\circ}E = P^{\circ}H$), nous avons respectivement :

I

Phase liquide : mole d'eau = mole d'huile

Phase vapeur : mole d'eau = mole d'huile

La pression totale (PT) est indépendante des quantités d'eau et d'huile :

II

mole d'eau > mole d'huile

mole d'eau = mole d'huile

$$PT = P^{\circ}E + P^{\circ}H$$

Où P° désigne la pression partielle.

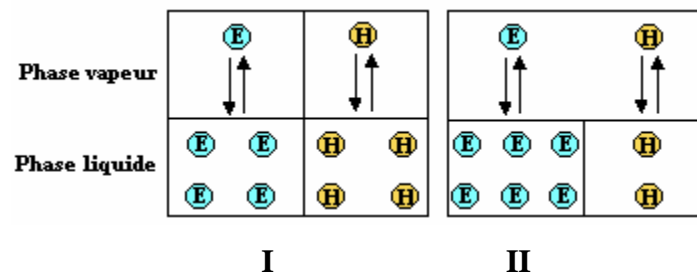


Figure n° 06 : Répartition de l'eau (E) et de l'huile essentielle (H) entre les phases liquide et vapeur en fonction de la pression lors de l'hydrodistillation (Pavida *et al.*, 1976).

Deux méthodes de distillation sont principalement utilisées : l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au procédé d'hydrodistillation puisque c'est un équipement que nous possédons au sein de notre laboratoire, qui est le plus adapté aux travaux que nous avons envisagés concernant les propriétés comme co-solvant de l'ester dans un mélange binaire eau/ester.

1.2. Techniques de l'hydrodistillation :

L'hydrodistillation constitue le procédé d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques le plus anciens, apportés par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic (Bruneton, 1993).

L'hydrodistillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante dans le domaine de la recherche. Le phénomène physique est identique à celui décrit précédemment. Cependant une verrerie adaptée a été mis en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle. Ces phénomènes ont été rendus possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clévenger.

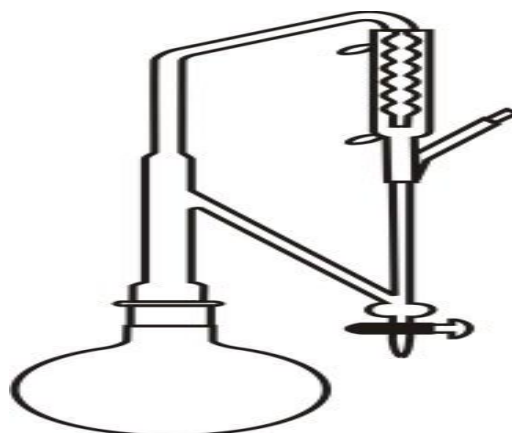


Figure n° 07 : montage d'hydrodistillation (Clévenger, 1928).

1.2.1. Propriétés physico-chimiques de l'hydrodistillation :

Lors de la distillation des huiles essentielles, des phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production.

Les expérimentations (Koedam, 1987 et Denny, 1988) conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées.

Cette différence est fortement liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des essences qui peuvent être superficielles ou internes. De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'hydrodistillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée.

Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule qui constituent les seules barrières à la libération de l'huile essentielle, est vite rompue à ébullition, les composés volatils sont aussitôt évaporés. Lorsque les essences sont sous cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur. Elles sont alors évaporées comme dans le cas des sécrétions superficielles (Koedam, 1982).

En ce qui concerne la localisation des sites producteurs d'essence, les molécules odorantes sont rencontrées dans tous types d'organes : racine, tige, bois, écorce, feuille, fleur, fruit, etc... Elles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables (Paupardin *et al.*, 1990). Nous distinguons :

- les poils glandulaires épidermiques rencontrés souvent chez les *Labiaceae*, *Géraniaceae* et *Rutaceae*. Ils produisent les essences dites superficielles.
- Les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les *Myrtaceae*, *Aurantiaceae*, ainsi que des canaux sécréteurs chez les *Ombelliferaeae*.

1.2.1. Rôle de l'hydrodiffusion :

L'huile essentielle étant un mélange complexe de molécules, il apparaît évident que la durée de distillation est dépendante de la vitesse d'entraînement des différents constituants.

A ce respect, Von Rechenberg (Von Rechemberg, 1910) considère que la température d'ébullition des constituants ne permet pas d'expliquer l'ordre de distillation par rapport à la polarité, mais que celle-ci correspond à une inversion de la volatilité.

Par ailleurs il spécifie que ce processus n'a lieu qu'avec les organes de plantes intactes, c'est-à-dire qui n'ont pas subi de dommage (broyage, etc...) sinon l'ordre de la distillation des composés aurait été effectué selon leur volatilité jusqu'à ce que la fraction d'essence directement exposée à la vapeur soit épuisée.

Ainsi durant la distillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'essence des glandes sécrétrices. La solution aqueuse chargée de composés terpéniques, diffuserait ensuite à travers une épaisseur de tissu, plus ou moins dense, selon l'organe, vers la surface extérieure où l'huile essentielle serait vaporisée et entraînée sous forme d'azéotrope.

Cependant, il attribue le terme d'hydrodiffusion à ce type de transport contrôlé par la polarité des constituants. Elle serait responsable de la vitesse relative de la distillation des différents composés aromatiques, dépendant davantage de leurs solubilités dans l'eau que de leurs points d'ébullition.

Mais si l'hydrodiffusion constituait l'étape limitante de l'hydrodistillation, alors l'ordre de sortie des composés serait dicté par leur polarité et non par leur volatilité. Dans le cas de composés de volatilité et de polarité intermédiaires tels que les esters mono terpéniques, ni la vitesse d'hydrodiffusion ni la vitesse de vaporisation ne seraient négligeables.

Bien que l'hydrodiffusion et la vaporisation ne constituent pas les seuls mécanismes mis en jeu lors de l'hydrodistillation, il faut leur associer la décantation qui fait intervenir une vitesse de transfert de matière entre deux phases liquides. L'isolement de composés volatils après leur distillation est déterminé dans une large mesure par leur degré de solubilité dans l'eau.

Par conséquent, l'eau résiduelle peut être plus ou moins saturée en constituants polaires selon la difficulté de séparation des phases. Celle-ci peut avoir trois origines éventuellement combinées :

- une partie de l'huile essentielle est dissoute dans l'eau, soit 1% environ de la fraction décantée, rarement plus de 2% et exceptionnellement supérieure à 5% dans le cas de certains composés polaires phénoliques.
- 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.

A l'interface huile/eau, elle peut être supérieure à 10%.

Dans ces conditions, les pertes dues à une mauvaise décantation peuvent atteindre 25% et plus, de l'essence recueillie.

Lors de nos travaux nous accorderons un intérêt particulier à la décantation. La séparation de l'huile essentielle après condensation est en fait l'étape déterminante pour recueillir les

composés préalablement libérés. Dans ce contexte, l'utilisation des esters éthyliques des acides gras comme co-solvant d'extraction pourrait être une alternative pour réduire la perte en composés.

1.3. Expression à froid :

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. (Roux, 2008) L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices (Basil *et al.*, 1998). Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008).

1.4. Extraction par solvants organiques :

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (Legrand, 1993 ; Dapkevicius *et al.*, 1998 ; Kim et Lee, 2002).

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient (AFNOR, 2000) :

- Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau
- Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué
- Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- De résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement (Lagunez Rivera, 2006).

1.5. Extraction par fluide à l'état supercritique :

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone (Aghel *et al.*, 2004).

D'autres travaux de recherche de Luque de Castro et Jiménez (1998) ; Gámiz-Gracia et Luque de Castro (2000); Ozel *et al.*,(2003) ; Deng *et al.*, (2005) montrent l'utilisation de l'eau dans son état supercritique. Dans ce système, le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par

simple détente. L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus, les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité de CO₂ (Lagunez Rivera, 2006).

Le frein du développement de cette technologie est le coût élevé des appareillages lié à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars (Lagunez Rivera, 2006).

Chapitre 4 : Caractères physicochimiques.

1. Caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles :

1.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques (caractéristiques d'une substance qui sont perceptibles par les organes des sens : saveur, odeur, aspect et consistance de l'objet) communes comme le fait d'être liquides à température ambiante, d'être volatiles et entraînaibles à la vapeur d'eau.

Elles sont aussi très odorantes et incolore ou jaune pâle sauf pour les huiles essentielles de cannelle, girofle, camomille matricaire, vétiver et bouleau où la couleur est relativement foncée. En parfumerie, l'examen olfactif qui précède ou suit toute analyse d'huile essentielle est du plus grand intérêt car, si l'odeur de l'huile essentielle n'est pas satisfaisante, il importe peu que les constantes physicochimiques soient correctes : le produit doit être rejeté. Cet essai olfactif est conduit par comparaison avec un échantillon type de l'huile essentielle aussi frais que possible et conservé dans les meilleures conditions.

Elles sont, enfin, sensibles à l'oxydation et change de couleur, conservation limitée, à la lumière et à la chaleur. Il convient de la conserver à l'abri de la lumière et de l'air (Site n° 01).

1.2. Caractéristiques physiques :

Les huiles essentielles ont aussi des propriétés physiques communes. Elles ne sont pas solubles dans l'eau mais en revanche elles le sont dans les solvants organiques et huiles végétales.

Par contre elles ont des caractéristiques différentes : (Site n° 01).

1.2.1. Indice de réfraction :

La réfractométrie est une technique qui vise à déterminer l'indice de réfraction d'un matériau, le plus souvent liquide, mais également solide ou gazeux. L'instrument de laboratoire ou de terrain utilisé est le réfractomètre. L'indice de réfraction est calculé à partir de la loi de Snell-Decartes et peut aussi être estimé à partir de la composition de la matière à l'aide de la loi de Gladstone. Un tel instrument permet d'identifier d'une espèce chimique (le plus souvent liquide), mais également, après étalonnage, il permet de déterminer la concentration d'un soluté dans un solvant connu. L'instrument ci-contre est donné pour mesurer l'indice de réfraction de liquide entre les valeurs 1,300 et 1,700 avec une précision de deux unités du quatrième chiffre exprimé. (Site n° 03).

1.2.1.1. Réfractomètre d'Abbe :

Le réfractomètre d'Abbe permet d'avoir une mesure de l'indice de réfraction d'un liquide en le déposant sur une surface en verre, en l'enfermant dans un dispositif optique, et en réglant un bouton pour amener une plage éclairée au centre d'un réticule.



Figure n° 08 : Réfractomètre à prisme d'Abbe.

1.2.1.2. Principe de la mesure :

Ce réfractomètre a été décrit, en 1874, par son inventeur, Ernst Abbe. Un ancien modèle est représenté ci-contre. Dans son étude sur les réfractomètres de 1901, Culmman décrit cet instrument comme constitué de deux prismes en verre flint enfermant une mince couche de 1/20e de millimètre d'épaisseur du liquide à examiner (Culmann, 1901). Le prisme inférieur sert surtout à maintenir le liquide et à permettre l'éclairage du prisme supérieur. L'article plus récent de Véret indique que dans les réfractomètres modernes (Véret, 2000), le prisme supérieur sert à l'éclairage et que la prise inférieure est celui qui permet la mesure. La description ci-dessous se place dans ce cas.

L'idée est d'éclairer le liquide à analyser en lumière rasante et de déterminer l'angle limite noté e qui dépend de l'indice n cherché et de l'indice N du matériau sur lequel repose le liquide et dans lequel le rayon rasant rentre.

$$n = N \sin e$$

Ce rayon poursuit son chemin et attaque la face de sortie du prisme avec l'angle

$$r = \alpha - e$$

où α est l'angle du prisme.

Le rayon sort donc du prisme avec l'angle i tel que

$$N \sin r = \sin i$$

L'angle i est en relation avec l'indice recherché n . Un viseur pointe l'angle et est gradué directement en indice de réfraction. La valeur est précise à deux unités de la quatrième décimale de la valeur de l'indice n .

Comme il n'est pas possible d'avoir un unique rayon rasant qui rentre au bon endroit dans le support matériel sous-jacent, le dispositif met en jeu un faisceau de lumière dont la limite est, par construction, le rayon rasant. Ce faisceau constitue la plage de lumière dont la limite sera ajustée au réticule et sera la base de la mesure.

La figure ci-dessous représente ce dispositif. Le prisme supérieur est éclairé et contient le rayon rasant. La lumière entre dans le prisme inférieur en une plage de lumière dont le rayon supérieur correspond au prolongement du rayon rasant. À la sortie du prisme, cette plage de lumière est réfléchiée par un miroir et est observée par une lunette colimatrice. L'utilisateur peut observer, dans cette lunette, la plage de lumière et sa limite qui porte l'information sur l'angle limite, donc sur l'indice de réfraction du liquide étudié.

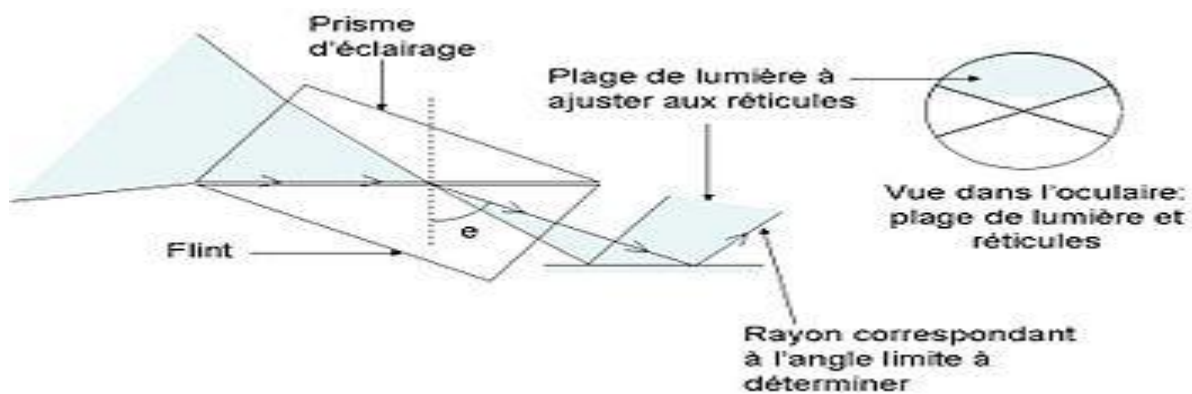


Figure n° 09 : Principe de la mesure de l'indice de réfraction (Site n° 03).

1.2.1.3. Définition de l'indice de réfraction :

La définition la plus répandue pour l'indice de réfraction est qu'il est la quantité résultant du rapport entre la vitesse de la lumière c dans le vide, et la vitesse de phase v de la lumière dans ce milieu (Taillet, 2006) :

$$n = \frac{c}{v}$$

Cette définition, simple, permet d'observer que l'indice de réfraction est très dépendant du milieu et de ses caractéristiques - isotrope, homogène, ou pas - et de la longueur d'onde de la lumière que l'on considère. La dépendance de l'indice de réfraction à la longueur d'onde

implique l'effet de dispersion qui est à l'origine de plusieurs phénomènes d'optique comme les arcs-en-ciel, la dispersion des prismes ou encore les aberrations chromatiques.

Cette définition possède plusieurs défauts. D'une part, du fait que la vitesse de la lumière dans le vide est une limite supérieure à la vitesse de la lumière, on pourrait en déduire que l'indice de réfraction ne peut pas être inférieur à 1, ce qui est faux. La vitesse considérée ici est une vitesse de phase, qui elle n'est pas limitée par la vitesse de la lumière, elle caractérise en effet la phase de l'onde et non l'onde elle-même - qui, elle, est limitée par la vitesse de la lumière dans le vide. D'autre part, du fait qu'il est un rapport de vitesse, on pourrait croire que l'indice de réfraction ne peut prendre que des valeurs réelles, ce qui est aussi faux (Optical Society of America, Handbook of optics, 2009).

Une autre définition de l'indice de réfraction le lie à une autre caractéristique du milieu, la permittivité diélectrique ϵ :

$$\frac{\epsilon}{\epsilon_0} = n^2 \quad \text{où } \epsilon_0 \text{ est la permittivité diélectrique du vide (Taillet, 2006).}$$

Cette définition, valable pour les milieux non magnétiques (Born et Wolf, 1993), fait intervenir une caractéristique intrinsèque du milieu, qui permet de déterminer comment une onde lumineuse incidente va polariser le milieu considéré. La permittivité diélectrique est une grandeur réelle ou complexe et de ce fait, l'indice de réfraction peut avoir des valeurs complexes aussi. La partie complexe de l'indice de réfraction est liée à l'absorption du milieu et il existe ainsi un lien particulier entre la polarisation d'une onde lumineuse dans un milieu et l'atténuation de celui-ci (Taillet, 2006).

Le coefficient d'absorption se déduit en effet de la partie imaginaire de l'indice de réfraction par la formule suivante (Optical Society of America, Handbook of optics, 2009):

$$\alpha = \frac{4\pi k}{\lambda}$$

1.2.2. Indice de fusion ou d'ébullition :

Le point de fusion ou la température de fusion d'un corps représente la température à une pression donnée, à laquelle un élément pur ou un composé chimique passe de l'état solide à l'état liquide. Le point de congélation (ou point de solidification selon les matériaux) est la température de la transition inverse. Elle est habituellement mesurée sous pression atmosphérique normale (1 atmosphère) et il y a coexistence entre état solide et état liquide

entre ces deux points. Pour une substance pure, les points de fusion et de congélation sont théoriquement égaux et constants à pression fixe. Le point de fusion/congélation le plus connu est probablement celui de l'eau (0 °C), celui-ci ayant été pris comme zéro de l'échelle centigrade, souvent confondue avec l'échelle Celsius. (Feistel et Wagner, 2006).

Il est possible de déterminer la nature d'une substance (identification) par la mesure de sa température de fusion. C'est pourquoi la température de fusion est une propriété caractéristique de la matière. Toutefois, cette information n'est pas suffisante pour permettre une identification formelle, plusieurs molécules pouvant avoir une température de fusion très proche. Elle permet par contre d'éliminer du champ du possible des molécules ayant une température de fusion différente de celle mesurée.

Contrairement à la température de vaporisation (point d'ébullition), la température de fusion est assez insensible aux changements de pression, car les volumes molaires de la phase solide et de la phase liquide sont assez proches.

Il existe différents appareils de mesure de point de fusion reposant tous sur la restitution d'un gradient de température. Ils peuvent être constitués soit d'une plaque métallique chauffante telle le Banc Kofler ou le bloc Maquenne, soit d'un bain d'huile tel le tube de Thiele.



Figure n° 10 : appareil de mesure de point d'ébullition.

1.2.3. Indice de densité :

Leurs densités sont inférieures à « 1 » sauf exceptions (huiles essentielles de cannelle, girofle en particulier). Un litre d'huile essentielle n'est pas égal à 1 kg d'huile essentielle. La densité des huiles essentielles est différente de celle de l'eau (dont 1 litre pèse, par convention, 1 kg). Ainsi, compte tenu d'un indice de densité de 1,1 environ (variable selon des huiles

essentielles), 1 kg d'huile essentielle fera 1,1 litre. Inversement, 1 litre d'huile essentielle pèsera environ 900 grammes. On peut mesurer la densité relative à 20°C avec un pycnomètre (flacon dont on se sert pour déterminer la densité des liquides ou des solubles). Cette masse est mesurée par un pycnomètre.

La densité relative à 20°C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile essentielle à 20°C à la masse égale du volume d'eau distillée à 20°C.

m0 : masse du pycnomètre

m1 : masse du pycnomètre et de l'eau

m2 : masse du pycnomètre et de l'huile essentielle ((Site n° 01).

1.2.4. Pouvoir rotatoire :

Le pouvoir rotatoire d'une huile essentielle est l'angle exprimé en milli radians et /ou degrés d'angle dont tourne le plan de polarisation d'une radiation lumineuse de longueur d'onde $\lambda = (589,3 * 0,3)$ nm, correspondant aux raies D du sodium, lorsque celles-ci traversent une épaisseur de 100 mm d'HE dans des conditions déterminées de température. On peut mesurer le pouvoir rotatoire avec un polarimètre appareil de mesure de la polarisation (Propriété des ondes électromagnétiques) d'un corps (Site n° 01).

1.2.5. Autres indices caractéristiques :

Les indices d'acides (nombre en milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres dans un gramme d'huile essentielle,) d'ester (nombre en milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle) sont aussi des éléments physiques différenciant des huiles essentielles (Site n° 01).

Chapitre 5 : Méthodes d'analyses des huiles essentielles.

1. Identification des constituants dans un mélange complexe :

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire aux industriels pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques (Coleman et Lawrence, 1997 ; Joulain, 1994).

Le double objectif identification/quantification consiste à déterminer la composition chimique de chaque huile essentielle et extraits par différentes méthodes analytiques spectroscopique et/ou chromatographiques. De manière conventionnelle, l'étude de la composition chimique d'un mélange naturel complexe peut être réalisée selon différentes voies :

la première séquence consiste à analyser les huiles essentielles, tout d'abord, par Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) ; cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (I_r), puis à les analyser par le couplage « en ligne d'une technique chromatographique, généralement la CPG, avec une technique d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) ou, quelques fois, la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention I_r et des données spectrales (spectres de masse ou infrarouge) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres.

Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles. Une deuxième séquence est mise en œuvre lorsque l'huile essentielle est complexe ou qu'elle contient des composés pouvant coéluer ou encore lorsque l'analyse est réalisée dans une optique de recherche. Un fractionnement de l'huile essentielle est alors effectué, le plus souvent par chromatographie liquide sur colonne ouverte de silice ou d'alumine. Les fractions obtenues sont ensuite analysées de la façon décrite dans la première séquence. Cette étape est à privilégier lorsque l'on veut étudier les différentes familles de composés (esters, alcools, cétones...).

Enfin, une troisième séquence peut être mise en œuvre lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont inconnus des bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits

dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatives telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ou encore la Chromatographie en Phase Gazeuse Préparative (CGP). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN- ^1H) et du carbone-13 (RMN- ^{13}C), SM, IRTF, etc. (Paolini, 2005).

2. Le couplage CPG-SM:

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec un spectromètre de masse (SM). En effet, le couplage CPG-SM en mode impact électronique (IE), dit CPG-SM(IE), est la technique utilisée en routine pour l'analyse dans le domaine des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement constituent le spectre de masse de la molécule. Cette technique permet d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (Sandra et Bicchi, 1987 ; Mc Lafferty et Stauffer, 1994 ; Adams, 1989 et 2001 ; Jennings et Shibamoto, 1980 ; Masada, 1976 ; Joulain et König, 1998).

Cependant, il faut utiliser les bibliothèques commerciales avec précaution, car bien que très utiles, elles ne sont pas les plus performantes. En effet, compte tenu de la diversité et du nombre très important de composés qu'elles contiennent, il est très rare qu'une interrogation n'obtienne pas de réponse ; même si cette proposition d'identification est attachée à une note de concordance très moyenne. C'est pourquoi, les bibliothèques élaborées avec des spectres de masse enregistrés avec des conditions expérimentales rigoureusement identiques, demeurent les plus performantes et permettent des identifications plus fiables. Ceci est particulièrement vrai pour l'analyse des huiles essentielles comprenant un grand nombre de sesquiterpènes, qui, construits à partir d'un même synthon isoprénique, présentent des spectres de masse souvent identiques ou insuffisamment différenciés.

En fait, dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles (Liang *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2004; Chericoni *et al.*, 2004; Bilia *et al.*, 2002;

Senatore *et al.*, 2004; Adio *et al.*, 2004). Ainsi, Vernin *et al.*, (1988), d'une part Cavaleiro (2001) d'autre part ont développé un logiciel leur permettant de combiner les résultats de la spectrométrie de masse avec les valeurs des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire.

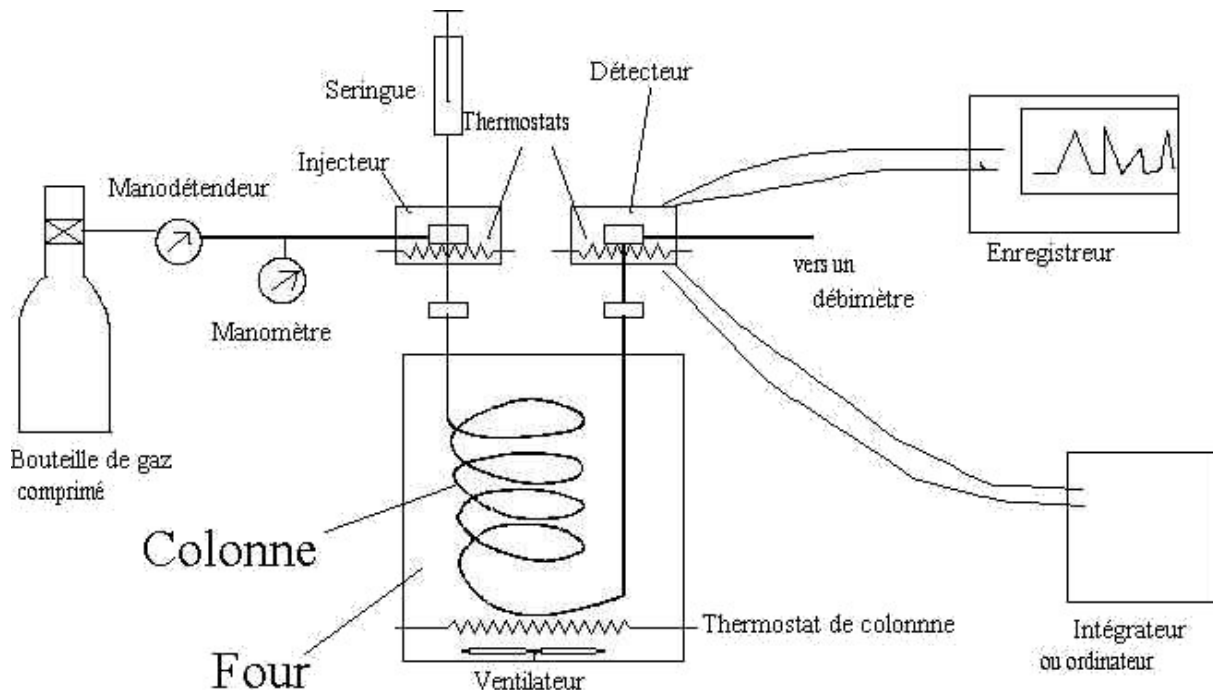


Figure n° 11 : Schéma du principe de la chromatographie en phase gazeuse (Besombes, 2008).

3. Spectroscopie infrarouge a transformée de fourier (IRTF) :

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau (Site n° 04).



Figure n° 12 : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.

3.1. Principe :

Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (2.5 – 25 μm) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules.

Toutes les vibrations ne donnent pas lieu à une absorption, cela va dépendre aussi de la géométrie de la molécule et en particulier de sa symétrie. Pour une géométrie donnée on peut déterminer les modes de vibration actifs en infrarouge grâce à la Théorie des Groupes. La

position de ces bandes d'absorption va dépendre en particulier de la différence d'électronégativité des atomes et de leur masse.

Par conséquent à un matériau de composition chimique et de structure donnée va correspondre un ensemble de bandes d'absorption caractéristiques permettant d'identifier le matériau.

L'analyse s'effectue à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier qui envoie sur l'échantillon un rayonnement infrarouge et mesure les longueurs d'onde auxquelles le matériau absorbe et les intensités de l'absorption. La figure 1 décrit le schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier.

Le faisceau infrarouge provenant de la source A est dirigé vers l'interféromètre de Michelson qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Dans l'interféromètre le faisceau lumineux arrive sur la Séparatrice. La moitié du faisceau est alors dirigée sur le miroir fixe, le reste passe à travers la séparatrice et est dirigé sur le miroir mobile. Quand les deux faisceaux se recombinent, des interférences destructives ou constructives apparaissent en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau modulé est alors réfléchi des deux miroirs vers l'échantillon, où des absorptions interviennent. Le faisceau arrive ensuite sur le détecteur pour être transformé en signal électrique.

Le signal du détecteur apparaît comme un interférogramme (**Figure n° 13**), c'est à dire une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir. L'interférogramme est la somme de toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est ensuite converti en un spectre infrarouge par une opération mathématique appelée transformée de Fourier (Site n° 04).

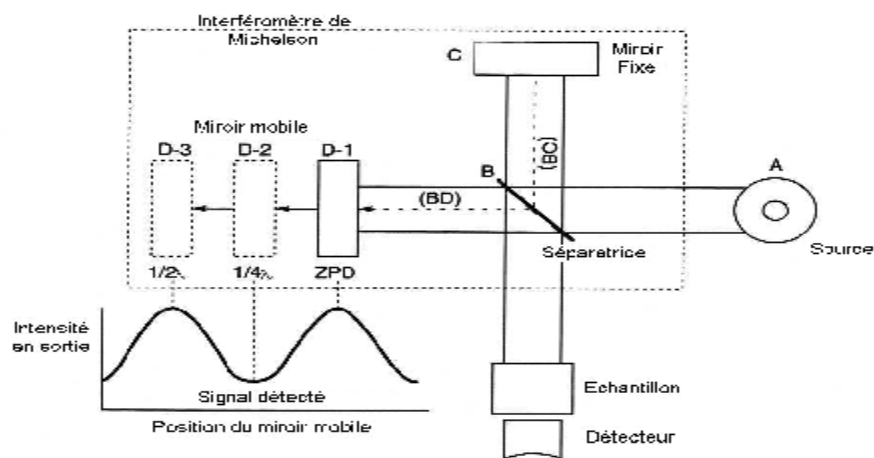


Figure n° 13 : Schéma d'un spectromètre à transformée de Fourier (Site n° 04).

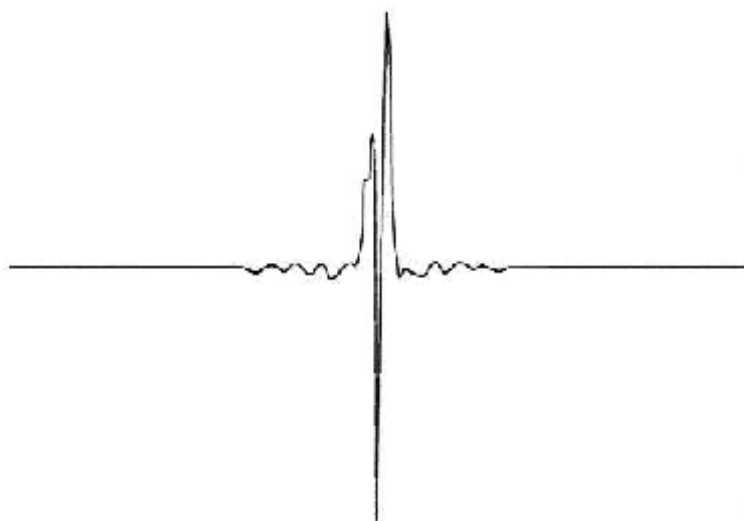


Figure n° 14 : Interférogramme en sortie du détecteur (Site n° 04).

Les informations tirées des spectres sont de deux sortes :

- **Informations qualitatives :** Les longueurs d'onde auxquelles l'échantillon absorbe, sont caractéristiques des groupes chimiques présents dans le matériau analysé. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents. Le tableau 1 présente les bandes de vibrations caractéristiques des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques (Site n° 04).

Tableau n° 01 : Fréquences de vibrations des principales fonctions rencontrées dans les composés organiques.

Composé	Vibrations caractéristiques	Fréquence de vibration (cm-1)
Alcane	CH _x <i>stretching</i>	2950-2850
	CH _x <i>déformation</i>	1500-1400
Insaturé	CH _x <i>stretching</i>	3050-3000
	C=C <i>stretching</i>	1600-1500
	Aromatique substitué (CH)	1900-1700
	Aromatique <i>bending</i>	800-750
Alcool	OH <i>stretching</i>	1050-1250
	C-O <i>stretching</i> OH <i>déformation</i>	(1aire<2aire<3aire<Phénol)
Cétone	C=O <i>stretching</i>	1690-1680
Aldéhyde	H-C=O	2800-2650
	C=O <i>stretching</i>	1710-1700
Acide	OH (avec liaison hydrogène)	3200-2500 (large)
	C=O <i>stretching</i>	1725-1700
	C-O	1440-1395, 1320-1210
	OH <i>déformation</i>	950-900
Sel de l'acide	COO- <i>stretching</i> <i>antisymétrique</i>	1615-1650
	COO- <i>stretching</i> <i>symétrique</i>	1400-1300
Ester	C=O	1775-1720
	Aromatique	1250-1100
Amine	NH <i>stretching</i>	3400-3300 (1aire>2aire)
	NH <i>déformation</i>	1650-1550 (1aire>2aire>Arom.)
	C-N <i>stretching</i>	1350-1250 (1aire<2aire<Arom.)
Amide	NH <i>stretching</i>	3350-3070 (1aire>2aire)
	C=O	1680-1630
	NH <i>déformation</i>	1650-1515 (1aire>2aire)
	C-N <i>stretching</i>	1180-1040 (1aire<2aire)
Nitrile	C ₃ N	2250
Isocyanate	N=C=O	2275
Sulfone	S=O	1100-1000
	C-S <i>stretching</i>	740-690
	SO ₂	1380-1300
Halogénure	C-F	1400-1000
	C-Cl	1175-650
	C-Br	590-510
	C-I	525-485

- **Informations quantitatives :** L'intensité de l'absorption à la longueur d'onde caractéristique est reliée à la concentration du groupe chimique responsable de l'absorption. En mesurant l'aire du signal caractéristique on peut, si on connaît l'épaisseur de la couche, comparer la proportion d'un groupement chimique donné dans plusieurs échantillons ou si on a une composition constante avoir une idée de

l'épaisseur des films les uns par rapport aux autres. Pour avoir une mesure absolue il convient d'étalonner auparavant les couches par une autre technique pour pouvoir établir une relation expérimentale entre intensité du signal et proportion ou épaisseur.

Cette méthode d'analyse est simple à mettre en oeuvre et non destructrice. Elle permet d'analyser aussi bien les matériaux organiques que les matériaux inorganiques. La grande diversité des montages expérimentaux permet la caractérisation de pratiquement tout type d'échantillon, quel que soit leur état physique ou de surface :

- Couches déposées sur un substrat transparent en infrarouge : montage en transmission.
- Couches déposées sur un substrat non-transparent en infrarouge : montage de Réflexion Totale Atténuée (ATR).
- Films polymères : montage en transmission (si épaisseur faible $<10\mu\text{m}$), montage de Réflexion Totale Atténuée (ATR).
- Poudres (dispersée dans une pastille de KBr) : montage en transmission Cependant, dans le cas de couches inférieures à 500 \AA d'épaisseur, la spectroscopie IRTF conventionnelle atteint ses limites de sensibilité et de détection (Site n° 04).

Chapitre 6 : Évaluation de l'activité antioxydante.

1. Évaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH :

1.1. Introduction :

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires. (Sanchez-Moreno, 2002), (Marc *et al.*, 2004), (Huang *et al.*, 2005).

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation (Rice-Evans *et al.*, 1995), (Burda et Oleszek, 2001).

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot$).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes $\text{ROO}\cdot$ par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter); ou les radicaux $\text{ABTS}\cdot$ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre $\text{DPPH}\cdot$ (diphényl-picrylhydrazyle). (Sharma Om et Bhat, 2009).

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise.

Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Tabart *et al.*, 2009), (de Gaulejac *et al.*, 1999), (Hua *et al.*, 2008).

De point de vue méthodologique, le test au radical libre $\text{DPPH}\cdot$ est recommandé pour des composés contenant SH-, NH- et OH- groups (Salah *et al.*, 1995). Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules

thermolabiles. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles en provenance de thé vert, des jus de fruits et de raisins, pépins et pulpes, très riches en composés phénoliques (Yi-Zhong *et al.*, 2006), (Hatzidimitriou *et al.*, 2007).

L'objectif de l'étude est de proposer une technique rapide et reproductible permettant de comparer les extraits vis-à-vis de leur action sur les phénomènes du piégeage des radicaux libres. Cette classification permettra de choisir les conditions les plus adéquates lors des différentes étapes de la valorisation de la matière première : extraction, purification et concentration en fonction d'un critère de qualité optimal : d'une part la teneur en composés phénoliques et parallèlement, leur activité antiradicalaire.

1.2. Principe de la method :

1.3. Réaction entre le radical libre DPPH• et l'antioxydant :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques (Blois, 1958), (Brand-Williams et Cuvelier, 1995) Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (**Figure n° 15**).

Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, i.e. DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•.

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

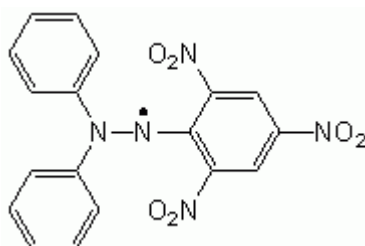
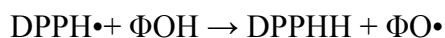


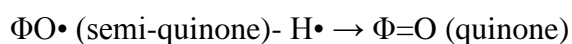
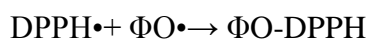
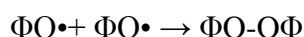
Figure n° 15 : Structure chimique du radical libre DPPH•
(2,2 DiPhenyle-1-Picryl-Hydrazyle) (Molyneux, 2004).

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes: (i) la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques) ; (ii) la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycosylées et des anthocyanes) (Huang *et al.*, 2005), (Nanjo *et al.*, 1996).

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH (Molyneux, 2004), (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998):



Plusieurs voies réactionnelles sont alors possibles qui forment des structures plus au moins stables :



La capacité anti-radicalaire (capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité. Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH•, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier (Molyneux, 2004).

1.4. Évaluation du potentiel anti-radicalaire :

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, deux approches sont appliquées : d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH• à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998), (Scherer et Godoy, 2009).

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage %RSA (Radical Scavenger Activity), où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin ou contrôle) à un temps t:

$$[\% \text{RSA} = (\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abst}) / \text{Abs}_{\text{contrôle}} \times 100\%].$$

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Molyneux, 2004).

L'indice relative %RSA montre seulement la capacité de l'échantillon, à une concentration fixée, de réduire ou non les radicaux et dans beaucoup de cas, l'augmentation de la concentration de l'antioxydant amène l'augmentation de ces indices relatives.

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective CE50 (ou l'inverse $1/CE50$) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH• dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que sa CE50 est petite. L'indice CE50 montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH• avec 50% (exprimée en mol Antioxydant/mol DPPH• ou mg Antioxydant/g DPPH•), mais ne prennent pas en considération l'influence de la concentration sur le temps de la réaction (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998).

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, dans la deuxième approche des paramètres cinétiques sont introduits, tels que le temps TEC50 nécessaire pour atteindre l'équilibre à CE50, la constante de vitesse de la réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique.

L'estimation de TCE50 permet d'introduire la classification suivante : TCE50 < 5 min (réaction rapide), 5÷30 min (réaction intermédiaire) et TCE50 > 30 min (réaction lente) (Brand-Williams, 1995) (Scherer et Godoy, 2009).

L'indice de l'efficacité anti-radicalaire [$EAR = 1/(CE50.TCE50)$] relie la concentration du DPPH• et le temps TEC50 dans l'essai avec la concentration effective CE50 de l'échantillon, et résulte dans un paramètre constant pour chaque solution ou extrait.

Chapitre 7 : Évaluation de l'activité antimicrobienne.

1. Introduction :

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (Dorantes *et al.*, 2000 ; Djenane *et al.*, 2002 et 2006 ; Kuda *et al.*, 2004, Bousbia, 2004). Les constituants des HE sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons.

2. Activité antibactérienne :

Les HE les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont d'autant de plantes aromatiques à HE riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques et, alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori* (Pauli, 2001). (Belletti *et al.*, 2004) et (Fisher *et al.*, 2007), ont démontré que les HE de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que : *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli O157 :H7*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Thyphimurium*, et *Acrobacter butzleri*.

3. Activité antifongique :

Le pouvoir antifongique des HE des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (De Billerbeck *et al.*, 2002 ; Koba *et al.*, 2004 ; Oussou *et al.*, 2004 ; Ouraini *et al.*, 2005) et contre les dermatophytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure), *Cryptococcus neoformans* et *aspergillus fumigatus* (Teixeiraduarte, 2005). Des travaux similaires ont été réalisés par (Mohammedi, 2006) sur l'HE de *Cistus ladaniferus* contre sept moisissures : *Rhizopus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Aspergillus* ; Omidbeygi *et al.*, (2007) ont démontré que les HE de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre *Aspergillus flavus*. Les HE d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camalduiensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* (Jaset-Dongmo *et al.*, 2008). Piacentini a noté pour la première fois les propriétés antimicrobiennes des HE de *Citrus* en 1949 in (Fisher & Phillips, 2008) que

les essences de *Citrus* en solution étaient plus puissantes que les phénols comme désinfectants. Selon les travaux de Prudent *et al.*, (1995) ; Sharma-Tripathi, (2006) ; et Viuda-Martos *et al.*, (2008), les HE de *Citrus* : d'orange douce, de citron, de mandarine et, pamplemousse montrent une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum*. Il a été établi d'après Cox *et al.*, (2000) que généralement les champignons sont plus sensibles que les bactéries.

4. Activité antivirale :

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des HE telles que les monoterpénols et les monoterpénals. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des HE ont montrées des améliorations importantes. L'effet antiviral de l'HE de *Mentha piperita* a été étudié « *in vitro* » contre les virus de Herpes Simplex (HSV-1 et HSV-2), une inhibition de 50% est obtenue avec des concentrations entre 0,002% et 0,008% (Schuhmacher et Reichling, 2003).

5. Activité liée à la composition chimique :

L'efficacité d'une HE dépend de sa richesse en composés phytochimiques, plus l'HE est riche en substances actives, plus son activité est importante. L'activité biologique d'une HE est liée à sa composition chimique, aux groupements fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, les composés terpéniques et cétoniques). Les composés minoritaires jouent aussi un rôle important dans l'activité des HE et semblent agir en synergie avec les composés principaux (Zhiri, 2006).

Les composés chimiques qui ont plus d'efficacité et, à large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools (α - terpinéol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et rarement les terpènes (Dorman et Deans, 2000).

6. Mécanismes d'action antibactérienne :

Les mécanismes par lesquels les HE exercent leur activité antibactérienne sont mal connus. Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des HE. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Dorman et Deans, 2000). Burt (2004a) a avancé que la caractéristique importante des HE est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité

et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules (Oussalah *et al.*, 2006), suggère que, l'action des HE sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie.

Le mode d'action des HE dépend du type de microorganismes. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipopolysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer (Cristiani *et al.*, 2007).

7. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HE. Le choix de la méthode est conditionné par l'insolubilité des HE dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

7.1. Aromatogramme:

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'HE sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (Guerin et Carret, 1999).

7.2. Méthode de diffusion en puits :

Méthode proposée par Cooper & Woodman en 1946 et, reprise par Shroeder et Messing en 1949. Elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'HE de concentration connue. L'HE diffuse

radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003).

7.3. Méthode de dilution :

Les H.E à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Robert-Demuet, 1995).

7.4. Méthode de micro-atmosphère :

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boites de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'HE qui est déposé au centre du couvercle de la boite de Pétri, renversée après fixation de l'HE sur le disque. Celui ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boite, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (Pibiri, 2005).

8. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide :

La détermination de l'effet bactéricide ou bactériostatique d'une H.E est réalisée en procédant à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture.

- S'il y a croissance bactérienne, l'HE a un effet bactériostatique sur la souche testée.
- S'il au contraire il y a absence de croissance bactérienne, l'HE présente un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche. La CMI est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur (Mann et Markham, 1998).

La CMB est la petite concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. cette valeur caractérise l'effet bactéricide de l'HE (Haddouchi *et al.*, 2009).

9. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne :

Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des HE ou leurs composants actifs tels que : la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type des microorganismes ciblés (Malecky, 2007).

Plusieurs études ont noté l'effet des matrices alimentaires sur la résistance microbienne aux HE, mais aucune ne semble avoir expliqué le mécanisme, bien que les suggestions aient été proposées quant aux causes possibles. La disponibilité de substances nutritives dans les produits alimentaires permet aux bactéries de réparer les cellules endommagées plus rapidement. Les propriétés intrinsèques de l'aliment (lipide/protéine/eau, le pH, le sel, la présence d'antioxydants, de conservateurs, d'autres additifs) ainsi que, les propriétés extrinsèques (la température, l'emballage sous vide/gaz/air, les caractéristiques des microorganismes) peuvent influencer la sensibilité bactérienne (Tassou *et al.*, 1995). Généralement, la sensibilité des bactéries à l'action des HE semble augmenter avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage et de la concentration en oxygène dans le milieu. A pH bas l'hydrophobicité d'une HE augmente, lui permettant de se dissoudre plus facilement dans les lipides membranaires de bactéries cibles (Mejlholm et Dalgaard, 2002). Par ailleurs, la présence de graisse et/ou les protéines dans les aliments réduit la disponibilité des molécules actives. L'HE se dissout dans la phase lipidique de l'aliment, il y aura relativement moins d'HE disponible pour agir sur les bactéries. Par contre, les glucides dans les produits alimentaires ne semblent pas protéger les bactéries de l'action des HE autant que les lipides et les protéines (Burt, 2004b).

Chapitre 08 : La peau.

1. Structure et fonctions de la peau :

La peau, ou membrane cutanée, recouvre la surface externe du corps. Elle constitue l'organe le plus lourd (masse) et le plus étendu (superficie) du corps humain.

Chez l'adulte, elle couvre plus ou moins 2 m² et pèse de 4,5 à 5 kg, soit environ 16 % de la masse corporelle totale. Son épaisseur varie de 0,5 mm sur les paupières à 4 mm sur les talons ; elle est de 0.5 à 2 mm sur la majeure partie du corps. Sur le plan structural, la peau comprend deux couches principales (**Figure n° 16**). La partie superficielle, la plus mince, se compose de tissu épithélial et est appelée épiderme (epi : sur). La partie la plus profonde, et la plus épaisse, se compose de tissu conjonctif et est nommée derme (Laplante, 2002) (Degim, 2005). En dessous du derme se trouve la couche sous-cutanée, qui n'appartient pas à la peau proprement dite ; elle est appelée fascia superficiel ou encore hypoderme, et se compose de tissu aréolaire et de tissu adipeux. La complexité anatomique et physiologique de la peau humaine lui confère des propriétés complexes (Tran *et al.*, 2005) .

Les recherches effectuées durant les 20 dernières années dans les domaines de la dermatologie et de la biologie cutanée ont profondément enrichi les connaissances sur ses mécanismes physiologiques et modifié la perception de cet organe. La peau est la première ligne de défense vis-à-vis du monde extérieur mais permet en même temps d'entretenir des relations avec celui-ci. Son intégrité est nécessaire à la vie tant pour son incidence sur la santé de l'individu que pour son bien-être. Outre sa fonction barrière, la peau est aussi le siège du toucher et possède un rôle de synthèse (vitamine D₂), d'élimination (principalement fer et cholestérol par la sueur, le sébum, les poils et les cellules desquamantes) et d'échanges thermiques et gazeux (Laplante, 2002).

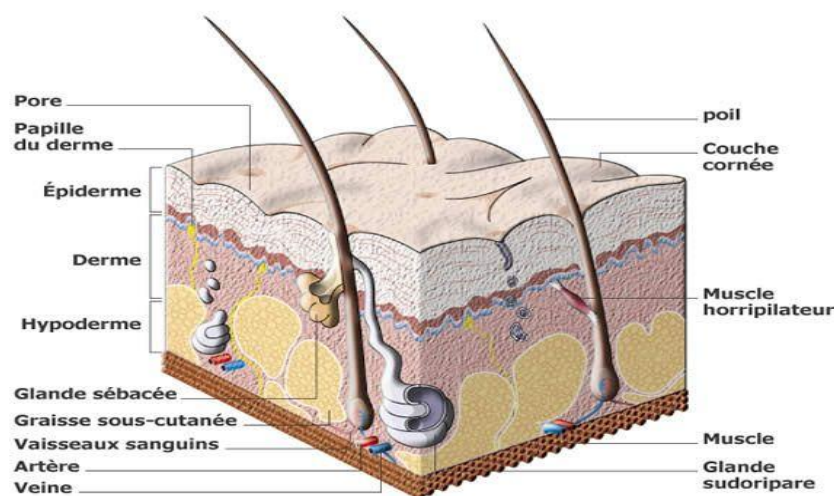


Figure n° 16 : Structure de la peau (Tran *et al.*, 2005).

2. Épiderme :

La partie la plus superficielle de la peau est représentée par l'épiderme. Ce tissu est dérivé embryologiquement de l'ectoblaste. C'est une couche continue d'un épithélium malpighien kératinisé, dont plusieurs types de cellules entrant dans la composition de l'épiderme. Les kératinocytes en grande majorité (90 - 95%), les mélanocytes, les cellules de Langerhans et cellules de Merkel (Laplante, 2002) (Cuminet, 1999). Son épaisseur varie largement en fonction du site anatomique ; la moyenne est de 40-50 µm mais elle augmente jusqu'à 80µm sur le poignet et le dos de la main et jusqu'à 400µm au bout des doigts (Weisse, 2002) (Cuminet, 1999). Sa fonction essentielle est représentée par la formation de la couche cornée, stade ultime de la différenciation cellulaire, permettant la réalisation d'une barrière efficace entre l'organisme et le milieu extérieur (Descargues *et al.*, 2005). D'après (Cuminet, 1999), de la profondeur à la surface, on observe :

Le **stratum germinativum**, ou couche des cellules basales. Elle est composée de cellules germinatives formant une couche mono-cellulaire à disposition palissadique. Il s'agit d'une zone d'échange avec le derme sous-jacent, et d'ancrage par le biais de la jonction dermoépidermique.

Cette jonction est élaborée conjointement par les fibroblastes dermiques et les kératinocytes.

Le **stratum spinosum**, ou corps muqueux de Malpighi, est composé de 3 ou 4 couches d'éléments polyédriques tendant à s'allonger horizontalement vers les couches superficielles. Dès ce niveau, les cellules sont capables de synthétiser de la kératine. Leur noyau est arrondi et de volume supérieur à celui de la couche basale. Ces cellules sont pourvues de prolongements spiculés porteurs de desmosomes. Ces desmosomes sont les moyens de fixation intercellulaires, auxquels s'attachent les tonofilaments intracytoplasmiques.

Le **stratum granulosum**, qui correspond à 3 couches de cellules granuleuses aplaties et fusiformes, situées immédiatement sous la couche cornée. Ces cellules contiennent de la kératohyaline, précurseur de la kératine.

Le **stratum corneum**, ou couche cornée. Elle est composée de cellules mortes, superposées, hexagonales et allongées, régulièrement ordonnées, anuclées et complètement kératinisées. Le nombre de couches cellulaires est très variable : de 15 à 20 au niveau de l'abdomen et du dos, plus de 100 au niveau palmaire. Ces cellules sont éliminées de façon ordonnée, selon le processus de desquamation.

3. Absorption cutanée :

La voie cutanée est très largement utilisée pour l'administration de médicaments. En effet, elle offre la possibilité de pouvoir cibler les différentes couches de la peau (administration percutanée) ou bien la voie sanguine pour une administration systémique du principe actif (voie transcutanée). Le devenir du principe actif dans la peau dépend des propriétés de celle-ci (intégrité, âge...) mais aussi des caractéristiques physico-chimiques du principe actif (taille, forme, structure et propriétés chimiques de la molécule), de la forme galénique choisie et des excipients. (Degim, 2005) (Weisse, 2002) (Thiers et Tasseaul, 2005).

D'un point de vue cinétique, la pénétration dans la cornée se découpe en deux phases. Une première phase de latence qui peut être considérée comme une phase de „charge en produit“ dont la durée dépend des propriétés physico-chimiques des actifs. Une seconde phase, d'équilibre, durant laquelle l'actif est capté par un flux dermique continu. La substance continue ainsi à diffuser dans l'épiderme et le derme en trois temps : tout d'abord, un transport de (s) l'actif(s) jusqu'à la zone d'absorption (dépendant de la viscosité de ces derniers et de leur véhicule) ; puis, la libération de ces actifs (fonction de l'affinité de la préparation pour la peau) ; enfin, les étapes d'absorption et de résorption (dépendantes uniquement de(s) actif(s) étudié(s) et dont les cinétiques seront données par la Loi de Fick). Ainsi, ils ont noté que le ciment lipidique de la couche cornée accélère le passage des molécules amphiphiles, et freine la diffusion des substances hydrophiles (Thiers et Tasseaul, 2005). La maîtrise du degré de pénétration du (ou des) principe(s) actif(s) contenu(s) dans la forme pharmaceutique pour application locale sera l'objectif prioritaire du développement galénique. Elle passe par la définition préalable du niveau d'activité et de l'effet attendu de la forme envisagée ; le **tableau 02** précise le degré de pénétration à conférer en fonction du type d'efficacité recherché (Seiller, 1996).

Tableau n° 02 : Influence du degré de pénétration sur l'activité.

Niveau d'action	Effet attendu	Degré de pénétration
Activité de surface		
Surface	-Protection -Antiseptique -Antisolaire, etc.	Nulle
Couche cornée	-Émollient -Exfoliant, etc.	Faible
Activité épidermique		
Épiderme	-Antibiotique ; -Antiseptique -Antifongique - Anti-inflammatoire - Antiphlogistique - Anesthésique - Antipruritique - Antihistaminique, etc.	Moyenne
Activité dermique ou Systémique		
Derme	-Hormonal -Cardiovasculaire, etc.	Elevée

4. Aspects qualitatifs et quantitatifs de l'absorption cutanée :

La couche cornée, faite de cornéocytes non-vivants fermement liés et de voies de transport non perceptibles telles les glandes sébacées et sudoripares, peut être envisagée comme une membrane passive. La plupart des substances la traverseront proportionnellement au gradient de concentration entre le côté supérieur et inférieur de la membrane. Ainsi on peut appliquer la loi de Fick, du moins tant que la concentration en surface est grande et la concentration dans l'épiderme faible.

Pour parvenir à l'épiderme vivant, c'est à dire traverser le stratum corneum, une molécule a trois possibilités. Elle peut diffuser entre les cellules, à travers les cellules ou à travers les follicules pilo-sébacés ou les glandes sudoripares (Degim, 2005) (Weisse, 2002).

L'importance relative de chacune des voies paraît être influencée par les caractéristiques du produit appliqué et celles de la surface cutanée.

- Diffusion intracellulaire : autrefois considérée comme la voie majeure, désormais controversée ;
- Diffusion intercellulaire (espaces lipidiques): voie préférentielle pour de nombreuses molécules, même polaires comme l'eau. Les modalités de pénétration restent encore obscures ;
- Diffusion à travers les annexes cutanées : bien que la surface couverte par les annexes cutanées soit inférieure à 1% de la surface cutanée, l'absence de barrière cornée au niveau de ces annexes favorise l'absorption des molécules. Cette voie interviendrait au cours des premières minutes de diffusion des molécules plus ou moins polaires. En fait, elle bénéficie surtout aux molécules de grande taille et de faible polarité pour lesquelles elle est la seule issue possible.

En effet, selon les mêmes auteurs, la plupart des molécules traversent la couche cornée en empruntant la voie intercellulaire (Degim, 2005) (Weisse, 2002).

5. Formes galéniques destinées à la voie cutanée :

Les préparations destinées à être appliquées sur la peau, représentent certainement une des plus anciennes formes pharmaceutiques, puisqu'elles ont été appliquées soit pour soigner les blessures, soit pour embellir la peau avec les fards, les onguents et les poudres de beauté, ancêtres des produits cosmétiques modernes.

En effet, la formulation des préparations destinées à la voie cutanée doit tenir compte des caractères propres de la peau (épiderme, derme, hypoderme) et de ses annexes (glandes sébacées et sudoripares, follicules pileux) ainsi que des caractères physicochimiques du principe actif qui lui permettront ou non de franchir la barrière cutanée afin d'exercer une action générale.

5.1. Préparations semi-solides pour application cutanée :

Les préparations semi- solides pour application cutanée sont destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou transdermique de principes actifs. Elles sont également utilisées pour leur action émolliente ou protectrice. Elles présentent un aspect homogène (Aiache *et al.*, 2001).

Plusieurs catégories de préparations semi-solides pour application cutanée peuvent être distinguées : (Aiache *et al.*, 2001).

- Les pommades (hydrophobes, absorbant l'eau, ou hydrophiles) ;
- Les crèmes hydrophobes ou hydrophiles ;

- Les gels hydrophobes ou hydrophiles ;
- Les pâtes ;
- Les cataplasmes.

5.1.1. Pâtes :

Les pâtes sont des préparations pour application cutanée contenant de fortes proportions de poudres finement dispersées dans l'excipient. On distingue : (Aiache *et al.*, 2001).

- pâtes à corps gras où les excipients sont des corps gras ou des mélanges de corps gras;
- pâtes à l'eau sont des préparations dont l'excipient est à base d'eau et de glycérine.

5.2. Autres formes administrées sur la peau :

A côté des pommades, crèmes, pâtes et gels, d'autres préparations plus liquides sont aussi destinées à être appliquées sur la peau : ce sont les liniments, les lotions et surtout des solutés divers. Pour l'application sur la peau on peut encore citer les poudres dermatologiques, les cataplasmes et les sinapismes (Le Hir, 1981).

Chapitre 09 : Microorganismes et pathologies.

1. Microorganismes et pathologies :

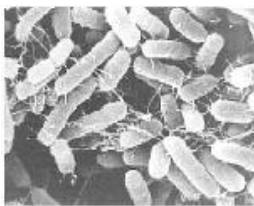
L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes (bactéries, virus, parasites, champignons), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave (Rhayour, 2002).

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes à l'économie.

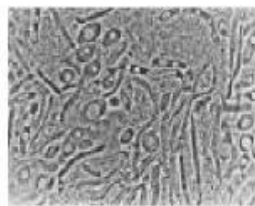
Aux États Unis seuls, ces pertes sont d'environ 20 milliards de dollars par an. De nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique. Ainsi 27 antibiotiques et 12 antifongiques étaient en développement en 1998 contre les infections bactériennes et fongiques. Ceci illustre l'effort sérieux exercé pour la lutte contre les maladies infectieuses (Rhayour, 2002).

2. Définition de microorganismes :

Les microorganismes sont définis historiquement comme des organismes vivants trop petits pour être distingués à l'œil nu et généralement formés d'une seule cellule. Ce terme est donc utilisé pour désigner des organismes unicellulaires ou constitués d'un nombre limité de cellules (**Figure 17**).



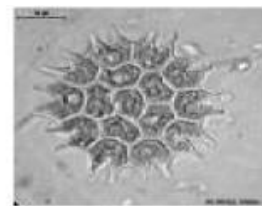
Bactérie
Salmonella
Enteritidis



Champignon
Candida
albicans



Protozoaire
Trypanosoma
brucei



Protophyte
Pediastrum
albicans

Figure n° 17 : Différentes classes de microorganismes (Hart et Shears, 1997).

Comparativement à l'homme, les microorganismes sont nettement plus nombreux et ont une capacité extraordinaire à s'adapter à son environnement. Or, plus la population humaine

augmente, plus elle permet aux organismes pathogènes de se développer, et de transmettre les maladies.

Il est donc important de posséder des moyens efficaces pour lutter contre ces microorganismes néfastes à l'homme (Hart et Shears, 1997).

3. Infections bactériennes :

Les bactéries sont des cellules procaryotes, leur ADN n'étant pas localisé dans un noyau. Beaucoup contiennent des structures circulaires d'ADN extra-chromosomique appelées plasmides. Il n'y a pas d'autre organite dans le cytoplasme que les ribosomes, qui sont de plus petite taille que ceux des cellules eucaryotes. À l'exception des mycoplasmes, les bactéries sont entourées par une paroi complexe, différente selon que la bactérie est à Gram positif ou négatif. De nombreuses bactéries possèdent des flagelles, des pilis, ou une capsule à l'extérieur de la paroi (**ANNEXE 1**).

Aussi bien pour les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif la membrane cytoplasmique est formée d'une bicouche lipidique associée à des protéines. Dans les deux cas, le composant principal de structure de la paroi est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel de chaînes polysaccharidiques (composées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique) et d'acides aminés. Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est constituée presque exclusivement de la couche de peptidoglycane, à laquelle sont associés des polymères d'acide teichoïque. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus complexe. La couche de peptidoglycane est plus fine que celle des Gram positif, et elle est entourée par une membrane externe composée de lipopolysaccharides et de lipoprotéines. La partie lipopolysaccharidique de la paroi des Gram négatif comprend les molécules d'endotoxine (lipide A) qui contribuent au pouvoir pathogène bactérien (**ANNEXE 1**).

Les infections bactériennes sont responsables de maladies allant de l'angine bénigne aux épidémies de choléra et de peste. Les bactéries sont des micro-organismes remarquablement adaptables, à l'origine de maladies graves ou de simple colonisation de la peau. Elles sont capables de survivre et se multiplier dans l'environnement et certaines forment des spores qui survivent pendant des décennies. Un grand nombre d'entre elles parasite les animaux, et n'infecte l'homme que par hasard. D'autres ne peuvent survivre qu'au contact intime de leur hôte humain. Alors que la plupart des bactéries se répliquent en quelques heures ou jours, d'autres ont une croissance beaucoup plus lente, entraînant des infections chroniques difficiles à traiter.

En plus d'une grande diversité d'habitat, les bactéries ont un important potentiel d'adaptation génétique. Elles contiennent souvent de l'ADN plasmidique, capable de transférer du matériel génétique au sein de l'espèce ou vers des espèces différentes. Cette adaptabilité génétique peut accroître à la fois leur pouvoir pathogène et leur résistance aux antibiotiques (Hart et Shears, 1997).

4. Infections fongiques :

Les Champignons ou Mycètes constituent aujourd'hui le cinquième règne du monde vivant appelé Fungi ou règne fongique. Actuellement, le règne fongique comprend plus d'un million d'espèces recensées à la surface de la planète (Nikoh *et al.*, 1994).

Le règne des Fungi ou règne des mycètes est constitué d'organismes eucaryotes, principalement multinuclés dont les noyaux sont dispersés dans un mycélium avec paroi. Ce sont principalement des organismes terrestres dont les cellules sont organisées en un appareil végétatif primitif, le thalle. Chez la majorité des espèces fongiques, le thalle est formé d'un enchevêtrement de filaments ; les mycéliums, pouvant donner naissance à des spores sexuées ou asexuées.

La plupart des mycètes sont saprophytes, excepté les champignons parasites responsables de certaines maladies et qui peuvent infecter les plantes et les animaux. Toutefois les agents des teignes, les dermatophytes, sont pour leur grande majorité des champignons strictement parasites. Le développement d'une pathologie fongique chez l'humain et l'animal dépend souvent de facteurs prédisposants comme l'existence de pathologies concomitantes (SIDA), d'événements associés (chirurgie, traitement antibiotique,...) ou de facteurs environnementaux (conditions d'élevages favorisant les contacts rapprochés,...) (Hamoir *et al.*, 2001).

Les infections à levures ont vu leur incidence augmenter et leur localisation se diversifier. Parmi le genre *Candida*, le *Candida albicans* reste l'espèce la plus fréquemment rencontrée. En pathologie, *Candida albicans* est la cause, de 70 à 80 % des cas de candidoses humaines. C'est l'agent des mycoses cutanées (impétigo) et unguéales (intertrigos), des mycoses digestives (muguet et buccal), intestinales, biliaires et génitales, des mycoses broncho-pulmonaires, viscérales (abcès cérébraux) (Ouraini *et al.*, 2007).

Les mycoses, situées au premier rang des infections cutanées, représentent une pathologie fréquemment évoquée en pratique dermatologique (Examen mycologique en dermatologie, 2005).

Dans la pathologie fongique ou mycosique, trois types de mycoses humaines sont fréquentes et universelles : les dermatophytoses, le Pityriasis versicolor et les candidoses cutanéomuqueuses. D'autres sont plus rares mais profondes et sévères (Ouraini *et al*, 2007). (Tableau n° 03).

Tableau n° 03: Principaux types d'infections fongiques rencontrées chez l'homme (d'après Alcamo, 1997).

Type d'infection	Agent responsable	Site d'infection
Cryptococcoses	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Poumon, cerveau (méninges et liquide céphalorachidien)
Candidoses	<i>C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. krusei</i>	Peau et muqueuses, tractus gastro-intestinal et sang
Dermatophytoses	<i>Trichophyton, Microsporium, et Epidermophyton</i>	Cuir chevelu, peau, ongles
Blastomycoses	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	Visage, mains et pieds
Sporotrichoses	<i>Sporothrix schenkii</i>	Peau

Les infections fongiques restent les plus graves et leur fréquence a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés et d'interventions médicochirurgicales invasives (Hulin, 2005).

5. Dermatophytoses :

Les dermatophytoses sont des mycoses cutanées provoquées par des champignons filamenteux kératinophiles, les dermatophytes. Ces affections cosmopolites sont fréquemment rencontrées tant chez l'homme que chez l'animal. Contrairement à la plupart des autres champignons pathogènes, les dermatophytes sont des parasites obligatoires infectant des individus en bonne santé, et les infections dont ils sont responsables sont contagieuses (Wang *et al.*, 2006) (Feuilhade *et al.*, 2002) (Brouta *et al.*, 2001). L'infection superficielle à dermatophyte est l'une des maladies dermatologiques les plus communes (Feuilhade *et al.*, 2002) (Brouta *et al.*, 2001) (**Figure 18**).

Les dermatophytes [(du Grec derma = peau et phyton = plantes) sont des champignons filamenteux kératinophiles et kératinolytiques ; ils utilisent comme substrats naturels des structures kératinisées. Les espèces saprophytes se nourrissent de débris kératinisés éliminés dans l'environnement, tandis que les espèces parasites envahissent le *stratum corneum* de l'épiderme ainsi que les phanères (poils ou cheveux, griffes ou ongles). Les dermatophytes pathogènes restent généralement confinés à ces tissus, et n'atteignent que rarement les couches les plus profondes de la peau et très exceptionnellement les organes internes.

On distingue trois groupes de dermatophytes selon leur habitat naturel, les dermatophytes anthropophiles, zoophiles, et géophiles (Ouraini *et al.*, 2007) (Wang *et al.*, 2006). Les espèces anthropophiles sont des parasites obligatoires de l'homme ; ils se transmettent essentiellement par contagion, interhumaine mais peuvent occasionnellement infecter l'animal. Les dermatophytes zoophiles ont pour réservoir une ou plusieurs espèces animales. Cependant, ils sont souvent isolés lors de dermatophytoses humaines, et certaines espèces comme *M. canis* et *Trichophyton verrucosum* infectent l'homme très facilement (Brouta *et al.*, 2001). Les dermatophytes géophiles ou telluriques sont quant à eux des saprophytes vivant dans le sol. Toutefois, ils peuvent accidentellement être à l'origine d'une infection humaine ou animale, par exemple suite au contact entre une peau lésée et un sol contaminé (Feuilhade *et al.*, 2002).



Fig. 2. Dermatophytose à *T. rubrum* de la main.



Fig. 3. Dermatophytose à *T. rubrum* de la plante.



Figure n° 18 : Infection superficielle à dermatophyte (Feuilhade *et al.*, 2002).

6. Moyens de lutte contre les microorganismes pathogènes :

Les caractéristiques physiologiques et structurales des champignons diffèrent assez fortement de celles des bactéries, ce qui explique que la majorité des antibiotiques actifs contre les bactéries n'ont aucun effet sur la première catégorie d'organismes vivants (champignons) (Hamoir *et al.*, 2001). Il existe de nombreuses molécules utiles pour lutter contre les microorganismes pathogènes. Dans cette partie nous avons choisi de présenter quelques exemples de composés efficaces pour combattre les protozoaires, les champignons et les bactéries.

6.1. Contre les champignons :

La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultra structure de la cellule fongique qui présente trois barrières (la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote) et d'autre part aux molécules antifongiques elles-mêmes qui sont soit fongistatiques, toxiques, ou qui peuvent engendrer des résistances (Prasad et Kapoor, 2004). Il existe plusieurs classes d'agents antifongiques : les polyènes, les dérivés azolés, les analogues nucléosidiques, les allylamines, les pneumocandines, et les sordarines (Hamoir *et al.*, 2001).

6.2. Contre les bactéries :

Pour soigner les maladies infectieuses, les antibiotiques sont les outils efficaces les plus fréquemment utilisés. Ces composés qui altèrent le fonctionnement normal des bactéries peuvent inhiber leur croissance (antibiotique bactériostatique) ou la détruire (antibiotique bactéricide). La plupart des antibiotiques inhibent des voies métaboliques de la bactérie. Chaque famille d'antibiotique possède son propre site d'action (Djabou, 2006) (**voir ANNEXE 1**). Le traitement des mycoses cutanées bénéficie actuellement de nombreux antifongiques actifs et efficaces. Malgré cela, le problème des résistances de plus en plus nombreuses à un ou plusieurs antifongiques persiste encore (Ouraini *et al.*, 2007), (Prabuseeninivasan *et al.*, 2006), (De Billerbeck, 2007), (Inouye et Abe, 2007).

L'accroissement des infections fongiques et le développement de souches résistantes aux médicaments utilisés. Pan-Havard *et al.*, (1991) soulignent la nécessité de la découverte de nouveaux agents antifongiques. Pour cela les sécrétions végétales telles que les huiles essentielles sont intéressantes du point de vue leur pouvoir fongitoxique (Glordani et Kaloustian, 2006).

PARTIE PRATIQUE.

1. Choix du matériel végétal :

Notre travail a été réalisé aux laboratoires : de Botanique médicale, de Pharmacognosie et de Microbiologie à la Faculté des Sciences Médicales (Université d'Annaba). La détermination de la composition chimique des HE a été effectuée au Laboratoire Régional de la Police Scientifique de Constantine et le CRAPC : Centre de Recherche Scientifique et Technique en analyses Physico Chimiques de (Bab Ezzouar, Alger) sur trois espèces très :

-*Citrus limon* (Citron).

-*Cinnamomum zeylanicum* (Cannelle).

-*Thymus numidicus* (Thym).

2. Méthodes :

2.1. Échantillonnage :

2.1.1. Provenance :

Nos échantillons proviennent :

- Le citron : provient d'une exploitation agricole privée, située dans la région de Collo à la wilaya de Skikda. La récolte a été réalisée durant la période allant du mois de novembre 2012 jusqu'au mois de mars 2013.
- La cannelle provient de chez les herboristes.
- Le thym provient de la région d'Azzaba wilaya Skikda, la récolte elle a été réalisée au moi de juin 2013.

L'identification du Thym (*Thymus numidicus*) a été faite par :

Dr Djeddi Samah, Dr Hamel Tarek, laboratoire de physiologie végétal département de biologie université d'Annaba et par Dr Laradj Hacem, laboratoire de botanique médicale Département de pharmacie faculté de médecine d'Annaba), selon les flores suivantes : (Dobignard et Chatelain, 2010-2013), (Le Floch *et al.*, 2010), (Quézel et Santa, 1963). Notre choix pour cet espèce est justifié par le fait que celle-ci est endémique et riche en huiles essentielles et composés phénoliques notamment les flavonoïdes connus pour leurs activités biologiques diverses.

Le matériel végétal ainsi récolté a subi certains traitements étant donné les localisations diverses des sites sécréteurs de l'huile essentielle dans le végétal.

Tableau n° 04 : Partie utilisée et quantité de la prise d'essai pour les trois espèces.

N° éch	Échantillon	Partie utilisée	Prise d'essai (g)
01	Citron	Épicarpe	400
02	Cannelle	Écorce	200
03	Thym	Sommité fleuries, tige, feuilles	200

2.1.2. Parties employées :

-Échantillon 01 : (Citron) La partie supérieure du péricarpe ou zeste (L'exocarpe) est récolté sur les fruits frais, elle se présente en ruban mince et étroit, d'aspect rugueux, de couleur verte ou jaune à l'extérieur, blanc et spongieuse à l'intérieur (mésocarpe). Ce choix est justifié par : la richesse du zeste en HE par rapport aux autres parties du fruit (Robert et Lobstein, 2005).

-Échantillon 02 : (Cannelle) Pour la IX^{ème} édition de la pharmacopée française, la drogue est constituée par les écorces sèches brun jaunâtre, aromatique et dont le goût est douceâtre et âcre.

-Échantillon 03 : (Thym) Nous avons utilisé les Sommité fleuries, les tiges et les feuilles.

2.2. Méthodes d'extraction :

La connaissance de la méthode d'extraction est indispensable pour permettre à partir d'une plante médicinale d'obtenir des préparations galéniques codifiées. Ces préparations définies par les physiologistes et les pharmaciens sont les HE plus ou moins purifiées ou des produits purs utilisés en thérapeutique.

Outre les molécules d'intérêt thérapeutique, les méthodes d'extraction permettent l'isolement de nombreuses molécules pures dont la connaissance est très utile pour le contrôle chimique de la plante, l'étude de la biosynthèse de certains groupes chimiques et la compréhension de l'activité modulée de certains extraits par rapport au produit pur responsable de l'activité.

Trois méthodes ont été utilisées :

1-L'hydrodistillation pour la cannelle.

2-L'expression à froid pour le citron.

3-L'hydrodistillation, entraînement à la vapeur d'eau saturée pour le thym.

Tableau n° 05 : Temps nécessaire pour le traitement de la matière végétale.

Échantillon	Méthode (Procédé)	Temps
01	Expression à froid	Expression du zeste jusqu'à épuisement total
02	Hydrodistillation	1Hh30
03	Hydrodistillation	1Hh30
	Entraînement à la vapeur d'eau saturé	

2.2.1. Expression des épicarpes de citrus :

2.2.1.1. Principe :

Pour certaines essences comme celles des fruits de *citrus* (Orange, Citron), on a l'avantage à opérer par expression à froid du zeste frais (Paris et Moysse, 1976), applicable que sur certains végétaux, principalement les agrumes, qui possèdent des glandes oléifères (Chiej, 1982).

Celle-ci peut se faire à la main (procédés à la cuillère, à l'écuelle), ou après scarification mécanique (Paris et Moysse, 1976).

Ce mode d'extraction ne change pas la composition de l'huile et ne fait pas intervenir la chaleur.

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 (Chiej, 1982).

En relation avec le système utilisé pour la rupture de cette paroi, on a à faire soit à des procédés agissant sur le fruit entier, soit des procédés agissant sur le fruit découpé en deux ou plusieurs quartiers et débarrassés de l'endocarpe (après extraction du jus), (Nannotti, 1890, Kobert, 1906, Herisset et Jolivet, 1973).

2.2.1.2. Mode opératoire :

Rompues mécaniquement par pression, incision ou abrasion à froid, ces poches à essences libèrent leur HE ; entraînée par un courant d'eau, celle-ci est ensuite épurée par décantation ou centrifugation (Richard et Giampoali, 1992).

2.2.2. L'hydrodistillation des écorces de la cannelle et du thym :

2.2.2.1. Principe :

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans l'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (Bruneton, 1995).



Figure n° 19 : Dispositif de l'hydrodistillation.

L'obtention des HE a été effectuée dans un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). Une distillation a été réalisée par ébullition, pendant une heure et demie, de 200 g de matériel végétal frais avec un litre d'eau dans un ballon de deux litres surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. Le rendement en HE est exprimé par le volume d'huile (en millilitre) obtenu pour la masse 100 g de matière végétale sèche. L'HE a été stockée à 4 °C à l'obscurité en présence de sulfate de sodium anhydre.

Remarque :

- Les concentrations relatives de certains composants de l'huile demeurent constantes alors que d'autres varient considérablement.
- Les variations de la composition de l'huile en fonction du temps sont généralement les mêmes quel que soit le procédé d'entraînement.
- Les variations, en fonction du temps, des concentrations de plusieurs composants sont très significatives.
- Le rendement et la composition des extraits chloroformiques de l'eau du distillat varient selon la procédure d'entraînement.

2.2.3. L'entraînement à la vapeur d'eau du thym :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE, à la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter.

2.2.3.1. Principe :

De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est en suite 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.

2.2.4. Dosage volumétrique (Calcul du rendement) :

C'est une méthode d'identification quantitative qui permet après l'extraction, le calcul direct de la quantité du principe actif à l'œil nu à l'aide de tube gradué (ml), ainsi que le rendement final (%), et qui est en relation avec la pesée de la prise d'essai (g). Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R = (Ph / Pv) \times 100$$

R = rendement en huile essentielle en %.

Ph = poids de l'huile essentielle en gramme.

Pv = poids de la biomasse végétale en gramme.

2.2.5. Caractéristiques des HE :

La caractérisation d'une essence consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur).
- Déterminer ses indices physiques (densité et indice de réfraction).
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

2.2.5.1. Indices physico-chimiques :

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico- chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

2.2.5.1.1. Mesure de l'indice de réfraction (norme NF T 75 – 112) :

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé Prisma- CETI convexe. Quand la détermination est effectuée à une température différente de 20°C, on effectue la correction à 20°C par le biais de la formule :

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

I₂₀ = Indice à 20°C

I_t = Indice à la température ambiante ou de mesure.

T = Température ambiante.

Les produits étalons de qualité pour réfractométrie servant à ajuster le réfractomètre sont les suivants :

- Eau distillée (1,333)
- P- cymène (1,4906)
- Benzoate (1,5685)
- Bromo-1- naphthalène (1,6585).

2.2.5.1.2. Détermination du point de fusion (AOCS, 1997. In Soares *et al.*, 2009) :

2.2.4.1.2.a. Principe :

Le principe repose sur le chauffage d'un tube capillaire contenant une prise d'essai de l'HE dans un chauffage et la notation de la température de fusion.

2.2.5.1.2. b.Mode opératoire :

- Remplir un tube capillaire propre sur une hauteur de 0,5 cm avec l'échantillon de l'HE ;
- Chauffer de façon à ce que la température s'élève d'environ 0.5 °C par minute, en surveillant le moment où l'HE commence à monter dans le tube capillaire ;
- Lire cette température.

2.2.5.1.3. Mesure de la densité relative à 20°C (Norme NF T 75 - 111) :

La densité relative de l'H.E est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse égale de volume d'eau distillée à 20°C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est d_{20}^{20} . La densité est mesurée à l'aide d'un pycnomètre de volume : 5 ml à la température de 20°C.

2.2.6. Analyse chromatographique :

La CG/SM est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (Agilent technologie) 6800 plus, couplé avec un spectromètre de masse (série HP (Agilent technologie) MSD 5973). L'analyse de la composition chimique des HE a été faite au niveau du : Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico Chimiques de (Bab Ezzouar, Alger) (CRAPC).

2.2.6.1. Injecteur :

Température : 250 °C,

Mode d'injection : Split 1/50,

Volume injecté : 0,2 µl.

2.2.6.2. Colonne :

Type : hp-5ms,

Dimensions : (long 30 m × D int 250 µm), épaisseur film 0,25 µm,

Phase stationnaire : diphényle (5%) –Diméthylarylènesiloxane,

Température du four : 60 (8), 2 °C/min/280 (10),

Gaz vecteur : Hélium pur 99,9998%,

Débit CV : 0,5 ml/min.

2.2.6.3. Détecteur de masse :

Température de l'injecteur : 280 °C,

Type d'ionisation : électronique,

Intensité du filament : 70 eV,

Type d'analyseur de masse : Quadripôle,

Température du quadripôle : 150 °C,

Température de la source : 230 °C,

Vide : 60 torr.

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre wiley7n.l.

2.2.7. Analyse par FTIR :

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est réalisée avec un appareil de type PERKIN ELMER (universal ATR Sampling Accessory), les conditions opératoires sont les suivantes : technique : ATR, gamme d'analyse : 4000-600 cm⁻¹. Les résultats sont directement comparés avec ceux de la bibliographie interne de la l'appareil ;01. Euclidean, 02. PSU/peak, 03. MIX PSU, 04. Peak Match, 05. PEAK/psu06.MIX PEAK. Dans notre étude nous avons utilisé la bibliothèque Euclidean. L'analyse de la composition chimique des HE par FTIR a été faite au niveau du laboratoire régional de la police scientifique de Constantine.

2.2.8. Activité antioxydante :

L'activité antioxydante in vitro a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) selon la méthode décrite par Burits et Bucar (2000), où 50 µl de chacune des solutions méthanoliques de l'huile essentielle testées à différentes concentrations (200, 400, 600, 800 et 1000 µg/ml) sont mélangées avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004 %). Après une période d'incubation de 30 minutes à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 517 nm. L'inhibition du radical libre DPPH par la vitamine E a été également analysée à la même concentration pour comparaison. On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour la vitamine E et pour l'huile essentielle (Pourcentage d'inhibition, l'index IC50, le temps d'équilibre TC50 et l'efficacité antiradicalaire EA). Tous les essais ont été effectués en triple.

2.2.8.1. Détermination du pourcentage d'inhibition :

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I \% = ([A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}] / A \text{ blanc})$$

avec :

Ablanc : Absorbance du blanc (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai,

Aéchantillon : Absorbance du composé d'essai.

La cinétique des réactions de l'huile essentielle et de la l'acide ascorbique avec le DPPH, a été inscrite à chaque concentration examinée. Les concentrations en huile essentielle et en acide ascorbique, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la

réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50 % (Sharififar *et al*, 2007).

2.2.8.2. Détermination du temps d'équilibre TEC50 :

Le paramètre TEC50 est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC50. Ce temps est calculé graphiquement.

2.2.8.3. Détermination de l'efficacité antiradicalaire EA :

Les deux facteurs IC50 et TE50 sont combinés afin d'obtenir le paramètre d'efficacité antiradicalaire :

$$EA= 1/IC50 \times TEC50$$

2.2.8.4. Analyses statistiques :

Les méthodes classiques de statistiques ont été utilisées pour calculer les moyennes et les écarts types. Toutes les mesures ont été reproduites trois fois, et les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type. Les analyses de la variance ont été réalisées par l'Anova avec le logiciel « SPSS ». Une probabilité de p inférieur à 0,05 a été adoptée comme critère de différences significatives.

2.2.9. Microorganismes utilisés :

Le choix des bactéries a été porté sur 16 souches fréquentes en pathologie humaine. Ces espèces sont souvent responsables de (TIA) constituant ainsi un problème majeur de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens.

Les souches bactériennes sont : *B. subtilus*:BS, *Entérobacter aérogènes* : EA, *Entérobacter faecalis*: EF, *Escherichia coli*: EC, *klebsiell oxy*: KO, *Klebsiell pneumoniae carbapinémas*: (KPC), *Micrococcus luteus*: ML, *Proteus mirabilis*: PM, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*: S, *Staphylococcus aureus*: SA, *Acinetobacter* sont des souches hospitalières. Ces souches nous ont été fournies aimablement par les responsables de laboratoire de Microbiologie de centre hospitaliers Universitaires (CHU) Ibn Rochd d'Annaba, elles ont été procurées dans des tubes stériles contenant 10 ml de gélose de conservation.

2.2.9.1. Étude de l'activité antibactérienne :

Test « *in vitro* »

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose : appelée aromatogramme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (Benjelali *et al.*, 1986).

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Figure n° 20).

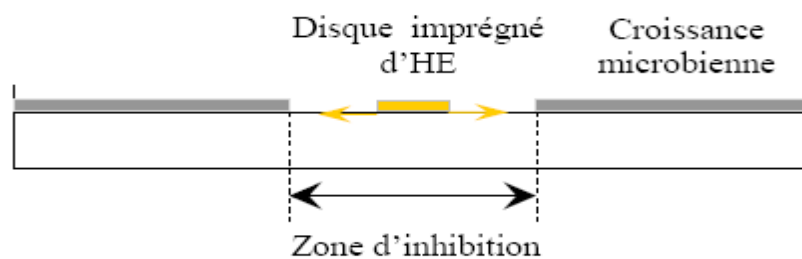


Figure n° 20 : Diffusion sur milieu gélosé (Ponce *et al.*, 2003).

2.2.9.2. Protocole expérimental :

Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé Mueller Hinton (M.H) en surfusion dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse, 1ml de chaque suspension de culture bactérienne de concentration d'environ (10⁶ UFC/ml) est préparé à partir d'une culture de 18 heures, et ensuite étalé à la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'un râteau.

2.2.9.3. Dépôt de disques :

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de cellulose stérile cellulose (disque de référence : papier filtre MN 640w, MACHEREY-NAGEL GmbH & co. KG Germany. Diamètre : 6mm) et l'imbiber avec l'HE à tester en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'HE jusqu'à l'imprégnation totale du disque (5µl), puis déposer sur la gélose. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 mn, puis mises à l'étuve à la température de 37°C pendant 24 heures. Dans les boîtes de contrôle, les disques sont trempés dans de l'eau distillée stérile. L'expérience est répétée trois fois pour chaque HE et pour chaque espèce bactérienne.

2.2.9.4. Lecture :

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HE, (Ponce *et al.*, 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

RÉSULTATS ET DISCUSSION.

1. Extraction (Expression des épicarpes de citrus, L'hydrodistillation des écorces de la cannelle) :

Le tableau suivant indique les caractéristiques des HE (couleur, odeur, saveur, solubilité) chez les trois espèces étudiées.

Tableau n° 06 : Caractéristiques des HE chez les trois espèces.

N° éch	Couleur de HE	Odeur	Saveur	Solubilité
01	Liquide transparent, Jaune pâle ou jaune verdâtre	Aromatique, typique de citral	Aromatique et amère	Liposoluble, miscible avec d'autres solvants
02	Liquide Clair, Couleur jaunâtre	Odeur et goût épicé	Brûlante, douce et aromatique	Liposoluble, soluble dans l'alcool et dans l'acide acétique glacial
03	Liquide clair, transparent Incolore à brun rougeâtre	Odeur agréable thymol	Piquante	Liposoluble, soluble dans 2 volumes d'alcool 80%

Les essences obtenues sont des substances odorantes volatiles (Paris et Moyse, 1976), ($M < 400$ Daltons), dont la tension de vapeur sous pression atmosphérique et température ambiante est suffisamment élevée pour qu'elles se trouvent à l'état de vapeur dans l'atmosphère et puissent, au contact de la muqueuse olfactive, provoquer un stimulus. (Richard et Giampoali, 1992), peu soluble dans l'eau, solubles dans l'alcool et solvant organique (Paris et Hurabielle, 1980).

Leur volatilité les oppose aux huiles fixes qui sont des lipides. Ces HE sont un mélange de constituants plus ou moins nombreux, généralement liquides (Paris et Moyse, 1976).

Selon Naves aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. La meilleure et la plus générale est peut être la suivante : Les huiles essentielles sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. On peut étendre cette définition aux HE obtenues par expression à froid dans des péricarpes ou zestes des fruits de Citrus à cause de l'importance du rôle de l'eau utilisée dans les procédés mécaniques pour entraîner l'essence.

Un point très important, c'est comme le souligne Naves, que du point de vue de la physiologie végétale, l'huile essentielle, du moins dans le cas de l'hydrodistillation, ne constitue pas un produit biologiquement défini : seuls le sont, et parfois par partie, certains constituants (Garnero, 1991).

2. Dosage volumétrique :

L'analyse quantitative nous a permis d'obtenir :

- *Citrus limon* : 04ml qui représente 04g d'huile essentielle.

Le rendement, $R=100.4/400=1,0\%$.

- *Cinnamomum zeylanicum* : 03ml qui représente 03g d'huile essentielle.

Le rendement, $R=100.3/200=1,5\%$.

- *Tymus numidicus* :

- par entraînement à la vapeur d'eau : 0,8 ml qui représente 0,8g d'huile essentielle.

Le rendement, $R=100. 1,6 /200=0,8\%$.

- par hydrodistillation : 1,1 ml qui représente 1,1g d'huile essentielle.

Le rendement, $R=100. 2,2 /200=1,1\%$.

Nos résultats sont comparables à ceux de :

- Chez *Citrus limon* : D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, il est bien évident que les agrumes renferment peu d'HE. Les résultats obtenus dans ce travail sont presque similaires aux autres résultats cités. En effet, Jeannot *et al.*, (2005) et Fuselli *et al.*, (2008) ont observé des rendements allant de 0,7 à 0,9% pour l'HE de *C. limonum*. Cependant, Rega *et al.*, (2003) ont rapporté que les rendements en HE chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et contre toute attente ont signalé des rendements de 1 à 3%. Cette différence pourrait être expliquée selon Kelen et Tepe, (2008) par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'HE. Le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en HE (Vekiari *et al.*, 2002).

- Chez *Cinnamomum zeylanicum*: Mahmoudi, 1994: Les écorces de cannelle contiennent 1 à 2% d'huile essentielle de densité supérieure à celle de l'eau, jaune pâle fraîchement distillée, dans l'essence on trouve : 70% d'aldéhyde cinnamique accompagné d'un peu d'eugénol et de divers carbures terpéniques. D'autre part selon Khanfri, 2012 : les résultats montrent que le rendement en huile essentielle obtenu par l'hydrodistillation varie entre 1,2% et 1,5% avec une durée dépassant 5 heures.

- Chez *Tymus numidicus*: Hadeff, 2004: Les rendements en HE de *Thymus numidicus* obtenu à partir de la matière sèche de la partie aérienne de la plante (région de Annaba en Algérie) est de 1,10 %, riche en thymol et en carvacrol.

3. Densité :

La densité d'une HE constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une HE dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, chimique, etc.). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité du produit ainsi que les tentatives de fraudes et d'altération.

Tableau n° 07 : Valeurs des densités des HE (moyenne±écart type).

Plante	Densité (trouvé)	Densité (AFNOR NF T. 75-202)
Citron	0,855±0,005	0,850 à 0,870
Cannelle	1,050±0,005	1,045 à 1,063
Thym	0,900±0,005	0,894 à 0,930

D'après les résultats (**Tableau n°07**) des densités obtenues, on peut dire que les trois huiles sont conformes aux normes internationales. Selon l'Association Française de Normalisation. D'autre part selon Ferhat *et al.*, 2007 la densité de l'huile essentielle du citron obtenu par Expression est de: 0,856.

4. Indice de réfraction :

Les indices de réfraction ont été calculés et ramenés à 20°C à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé, et sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau n° 08 : Valeurs des indices de réfraction à 20°C (moyenne±écart type) des trois HE.

Plante	Indice de réfraction (trouvé)	Indice de réfraction (AFNOR)
Citron	1,4700±0,005	1,474 à 1,475
Cannelle	1,6020±0,007	1,6020 à 1,6060
Thym	1,4830±0,003	1,4830 à 1,5100

L'indice de réfraction c'est le rapport entre la célérité de la lumière dans le vide et la célérité de la lumière dans le milieu considéré. Ce rapport indique la capacité des HE à réfléchir la lumière. Les valeurs de l'indice de réfraction de nos échantillons correspondent aux normes d'AFNOR. Elles indiquent leur faible réfraction à la lumière.

Selon Ferhat *et al.*, 2007 l'Indice de réfraction de l'huile essentielle du citron obtenu par Expression est de: +1,475.

5. Indice de fusion : selon Chemat *et al* 2007.

Tableau n° 09 : Valeurs des indices de fusion des trois HE.

Plante	Indice d'ébullition (Température d'ébullition/Téb) (trouvé)	Température d'évaporation (trouvé)	Indice de fusion (littérature)
Citron	180	188	limonene 175.4
Cannelle	185	196	cuminaldehyde 236
Thym	233	255	Thymol 233, carvacrol 237.2

L'indice de fusion est généralement relevé directement sur les composés majoritaires de huiles essentielles après séparation et non pas sur l'huile elle-même. Donc une séparation des composants majoritaires de l'huile est indispensable et indiquée pour bien déterminer cet indice.

6. Composition chimique :

Dans la recherche de méthodes alternatives de lutte antibactérienne, le règne végétal offre beaucoup de possibilités. De nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier des composés de plantes qui ont une activité antibactérienne, antioxydante, antifongique et insecticide (Djenane *et al.*, 2002 ; Bousbia, 2004 ; Bouzouita *et al.*, 2008; Djenane *et al.*, 2011b). Les résultats de l'analyse de la composition des huiles testées sont obtenus par comparaison des données de la masse des spectres et des temps de rétention sont résumés dans les **Tableaux : 10, 11 et 12.**

6.1. Composition chimique de l'HE du citron :

L'analyse qualitative et quantitative par (GC/SM) de l'essence a permis d'identifier 53 composés qui représentent un total de 99,986 % (**Tableau 10**). L'essence de *Citrus limon* est constituée principalement de composés dont :

Limonene (61.647%), β -Pinene (13.852%), γ -terpinène (9.959%) sont des composés majoritaires, suivis par d'autres molécules à faible teneur comme : α -pinène (2.279%), Myrcene (1.888%), α -Citral (1.702%), β -Citral (1.046) β -Bisabolene (1.026%), totalisant environ 93,399 %.

Nos résultats concernant le profil chimique de l'HE du *Citrus limon* concorde avec ceux de (Vekiari *et al.*, 2002) qui ont montré que les essences de citron sont caractérisées par la concentration élevées de: β -Pinene (21.2%), γ -terpinène (17.4%), α -pinène (9.8%)

D'autre part des études réalisées également en Algérie ont donné des résultats presque identique ; Par Hellal , 2011: Limonene (51.39%), β -Pinene (17.04%), γ -terpinène (13.46%), α -pinène (3.07%).

Plusieurs investigations de Moufida et Merzouk, 2003, Bellefi *et al.*, 2004, Rehman *et al.*, 2004, ont démontré que généralement les essences du citron sont constituées principalement de composés monoterpéniques (97%). Alors que les autres composés comme les alcools, les aldéhydes, les esters ne sont représentés qu'avec des teneurs faibles allant de (1.8% à 2.2%).

En étudiant la composition chimique des essences du citron, Nogata *et al.*, 2006 ont conclu qu'en plus des monoterpène, ces essences renferment des acides gras en quantités assez faibles (0.8%). L'acide linoléique est l'acide gras principal de *C. sinensis*; l'acide linoléique est retrouvé dans *C. limonum* et l'acide oléique dans *C. aurantium*. Les flavonoïdes se retrouvent dans les essences de citrus et composent la partie non volatile des huiles et ils sont utiles dans la différenciation entre les espèces d'agrumes.

Selon Senator *et al.*, 2002, les variations rencontrées dans la composition chimique de l'essence du citron, du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs: le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante et la présence de chimiotypes. En effet, (Wolford *et al.*, 1971; Shaw, 1979; Boelens, 1991; Smith *et al.*, 2001) ont distingué que les HE de *C. limonum* pourraient être de chimiotypes β -pinène, limonène, linalol, acétate de linalyle, citral, et citronellal ; *C. aurantium* de chimiotypes limonène, linalol, decanal, et *C. sinensis* de chimiotypes D-limonène, géraniol, linalol, citral, citronellal, terpinéol et décanal. Il faut noter aussi que selon Minh *et al.*, (2002), la maturité du fruit a un impact important sur la composition chimique de l'huile essentielle. Ainsi, les terpènes sont exclusivement présents dans l'HE du fruit non mûr, à mesure que le fruit mûrit les concentrations en aldéhydes, les terpènes oxygénés et sesquiterpènes aliphatiques augmentent.

Tableau n° 10 : Composition chimique de l'huile essentielle du citron.

N	Composé	Temps de rétention	(m/m) %	N	Composé	Temps de rétention	(m/m) %
1	5-Methylisothiazole	5.453	0.011	34	Trans- . α -ocimene	42.751	0.055
2	α -Fellandrene	9.818	0.557	35	(-)-Caryophyllene	42.945	0.370
3	α -Pinene	10.241	2.279	36	Bergamotene	44.076	0.728
4	Terpinolen	11.045	0.086	37	Alpha-Humulene	45.040	0.025
5	β -Pinene	13.091	13.852	38	β -Farn esene	45.415	0.041
6	Myrcene	13.856	1.888	39	Epi- β -Santalene	45.498	0.001
7	Origanene	14.616	0.099	40	l-Caryophyllene	47.018	0.037
8	α -Terpinene	15.474	0.094	41	Val encen	47.491	0.056
9	Limonene	17.422	61.647	42	Bicyclogermacrene	47.710	0.096
10	Cis-Ocimene	17.496	0.066	43	α -Caryophyllene	48.197	0.084
11	Trans -Ocimene	17.978	0.114	44	β -Bisabolene	48.606	1.026
12	γ -Terpinen	18.923	9.959	45	α -Caryophyllene	50.531	0.012
13	Trans-Sabinenehydrate	19.283	0.113	46	Germacrene	52.426	0.015
14	Terpilene	20.579	0.530	47	α -Santalene	54.579	0.017
15	Cissabinehydrate	21.344	0.100	48	Pyrazolo(3-4)Cyclohexane	56.981	0.018
16	p-Mentha-1,4(8)-diene	21.597	0.170	49	l- β -Bisabolene	57.790	0.038
17	n-Nonanal	21.773	0.119	50	Anymol Levomenol	58.662	0.054
18	d-Camphor	24.404	0.016	51	Citroptene	73.520	0.142
19	Rhodinal	25.217	0.127	52	Xanthotoxol	94.464	0.096
20	Camphol	26.153	0.020	53	Isoalloalant olactone	100.807	0.031
21	4-Carvomenthenol	26.874	0.037				
22	α -Terpineol	27.960	0.411				
23	Decaldehyde	28.934	0.045				
24	Nerol	30.674	0.130				
25	β -Citral	31.511	1.046				
26	Cis-Geraniol	32.559	0.127				
27	α -Citral	33.645	1.702				
28	n-Tetradecanal	35.891	0.029				
29	Antioxine	36.632	0.466				
30	Citronellol acetate	38.951	0.049				
31	Neryl Acetate	39.759	0.788				
32	Geraniol acetate	40.972	0.366				
33	n-Cetane	41.854	0.017				

File : D:\Spectres de gcms\Prestations\Prestation2013\Prest annabaz2\
 PS_HE_CITRON.D
 Operator :
 Instrument : GC/MS Ins
 Acquired : 30 Jul 2013 22:45 using AcqMethod HE60NS
 Sample Name: Citrus limon
 Misc Info :

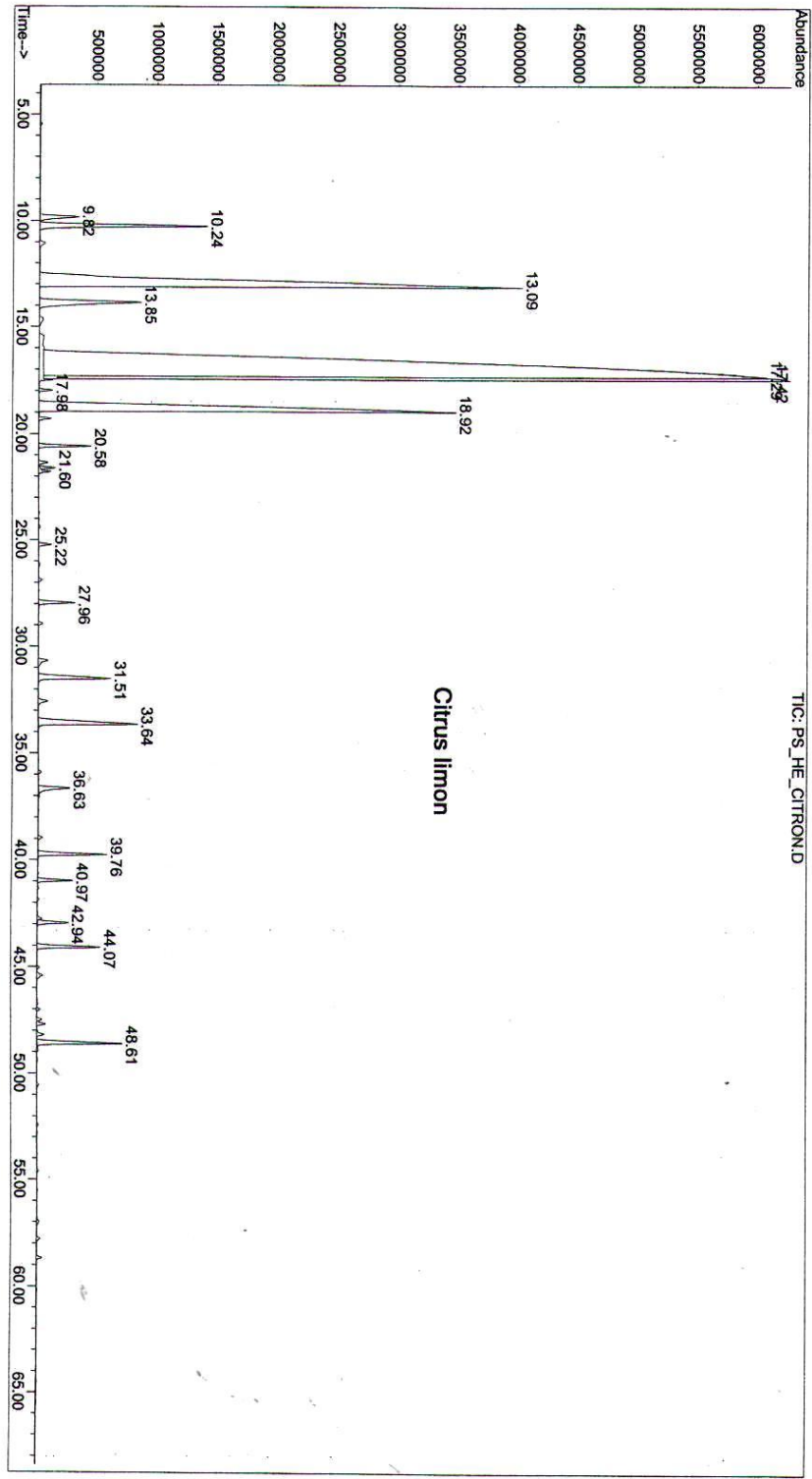


Figure n° 21 : Profil chromatographique de L'HE du *C. limonum* analysée par CG/SM.

6.2. Composition chimique de l'HE de la cannelle :

L'analyse qualitative et quantitative par (CG/SM) de l'HE a permis d'identifier 60 composés qui représentent un total de 99.938 % (**Tableau 11**). L'essence de *Cinnamomum zeylanicum* est constituée principalement de :

Cinnamic aldehyde (81.529%), Eugénol (2.915%), p-Cineole (2.914%), Camphène (2.124%), α -pinène (1.482%), Hydrocinnamic aldehyde (1.218%), α -Terpineol (1.041%). totalisant environ 93.223%.

Les premières recherches sur la composition de l'huile essentielle de l'écorce de la cannelle de Ceylan ont été réalisées par Blanchet en 1833. Quelques temps après, Dumas et Peligot (1834 et 1835) indiquent que le principal constituant de cette essence est le "Cinnamaldéhyde" ou "Aldéhyde cinnamique" (Guenther, 1977) et (Vernon et Richard, 1976). D'autres composés furent identifiés en 1892 et 1902 par les chimistes de la société Schimmel, en particulier, Walbaum et Hüthing, notent que la teneur en eugénol dans l'huile essentielle des feuilles est plus importante que celle de l'écorce (Guenther, 1977), ils mirent en évidence plusieurs composés par préparation de dérivés chimiques (réactions chimiques) (Vernon et Richard, 1976).

D'autre part Valnet, 1990, a déterminé que l'écorce de Cannellier de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*) est très riche en huile essentielle, en 1-pinène, en cinéol, en phellandrène, en furfurol, en cymène, en linalol, en sucre, en mucilage, en tanin, en amidon, en mannite... L'huile essentielle d'écorce est elle-même composée de 65 à 75 % d'aldéhyde cinnamique, de 4 à 10 % d'eugénol, de carbures et d'alcools terpéniques (<http://www.uni-graz.at>).

Selon Wright ,1995 la Composition chimique approximative de l'huile essentielle de l'écorce de cannelle est: Cinnamaldéhyde (forme trans) (76%), Eugénol (4%), Cinnamyl acétate (5%), 1-linalol (2%), β -caryophyllène (3%), α -terpineol (0.7%), Coumarine (0.7%), 1,8-cineole (0.6%), Terpinene 4-ol (0.4%).

Nos résultats concernant le profil chimique de l'HE du *Cinnamomum zeylanicum* concordent avec ceux de (Khanfri, 2012) (Site n° 05) qui ont montré que l'HE de la cannelle analysé par GC-MS a révélé la présence de 37 composants dominants, sont caractérisés par la concentration élevées de : E-aldéhyde cinnamique (63,23%), camphène (19,74%), a-pinène (14,53%) et 1,8-cinéol (6,52%).

Tableau n° 11 : Composition chimique de l'huile essentielle de la cannelle.

N	Composé	Temps de rétention	(m/m) %	N	Composé	Temps de rétention	(m/m) %
1	Cyclopropylmethanol	4.854	0.007	34	Trans-2-Decenal	32.843	0.006
2	Styrene	7.997	0.051	35	Cinnamic aldehyde	36.418	81.529
3	Pinene	9.531	0.017	36	3-Phenylpropenal	36.930	0.039
4	Bicyclo[3.1.0]hexane	9.814	0.038	37	Styrone	37.061	0.092
5	α -Pipene	10.252	1.482	38	Linarodin	37.344	0.099
6	Camphene	11.061	0.741	39	3-Phenylacrolein	38.781	0.013
7	Benzaldehyde	11.860	0.537	40	α -Copaene	40.408	0.184
8	Pseu dopinene	12.766	0.516	41	Bergamotene	42.888	0.021
9	β -Pinene	13.745	0.017	42	β -Caryophyllen	43.083	0.084
10	Cymene	15.982	0.159	43	Cumarine	44.837	0.569
11	p-Cineole	16.513	2.914	44	Camphène	45.300	2.124
12	Salicylal	17.326	0.035	45	Eugénol	45.494	2.915
13	β - Ocimene	17.672	0.010	46	α -Longipinene	46.644	0.016
14	delta.-3-carene	18.335	0.073	47	α -MuuroleneBenzyl	48.072	0.035
15	Hypnone	18.978	0.024	48	Benzyl phthalate	48.768	0.032
16	α -Terpinen	20.410	0.038	49	Delta-Cadinene	49.441	0.100
17	Terpinolene	21.526	0.211	50	3-Ethylquinoline	50.620	0.013
18	Fenchyl alcohol	22.427	0.029	51	α -Calacorene	52.719	0.009
19	3-Chromene	24.346	0.076	52	Caryophyllene oxide	52.919	0.106
20	Linalol	24.741	0.044	53	Anthracenedimethanol	53.138	0.009
21	Isoborneol	25.477	0.018	54	Naphthalene	55.506	0.101
22	Hydrocinnamic aldehyde	26.066	1.218	55	Cedreanol, (-)-	56.310	0.076
23	2-Bornanol (CAS)	26.275	0.474	56	Delta-Cadinene	56.548	0.025
24	1,2-Chromene	26.607	0.160	57	β -Gurjunene	56.992	0.025
25	4-Carvomethenol	26.996	0.773	58	Hydroxycarbostyryl	57.333	0.022
26	p-Cymen-8-ol	27.791	0.009	59	4-Phenox yacetophenone	58.025	0.023
27	(-)- α -Terpineol	28.088	1.041	60	Bisoflex 81	97.330	0.060
28	Estragol	28.414	0.022				
29	Cinnamal	29.949	0.705				
30	Allylbenzol	31.108	0.007				
31	p-Isopropylben zaldehyde	31.240	0.072				
32	Phenylsulfonyl	31.357	0.006				
33	l-Carvone	31.537	0.147				

File : D:\Spectres de gcms\Prestations\Prestation2013\Prest annaba2\
 PS_HE_CANNELLE.D
 Operator :
 Instrument : GC/MS Ins
 Acquired : 31 Jul 2013 3:21 using AcqMethod HE60NS
 Sample Name: Cinnamomum zeylanicum
 Misc Info :

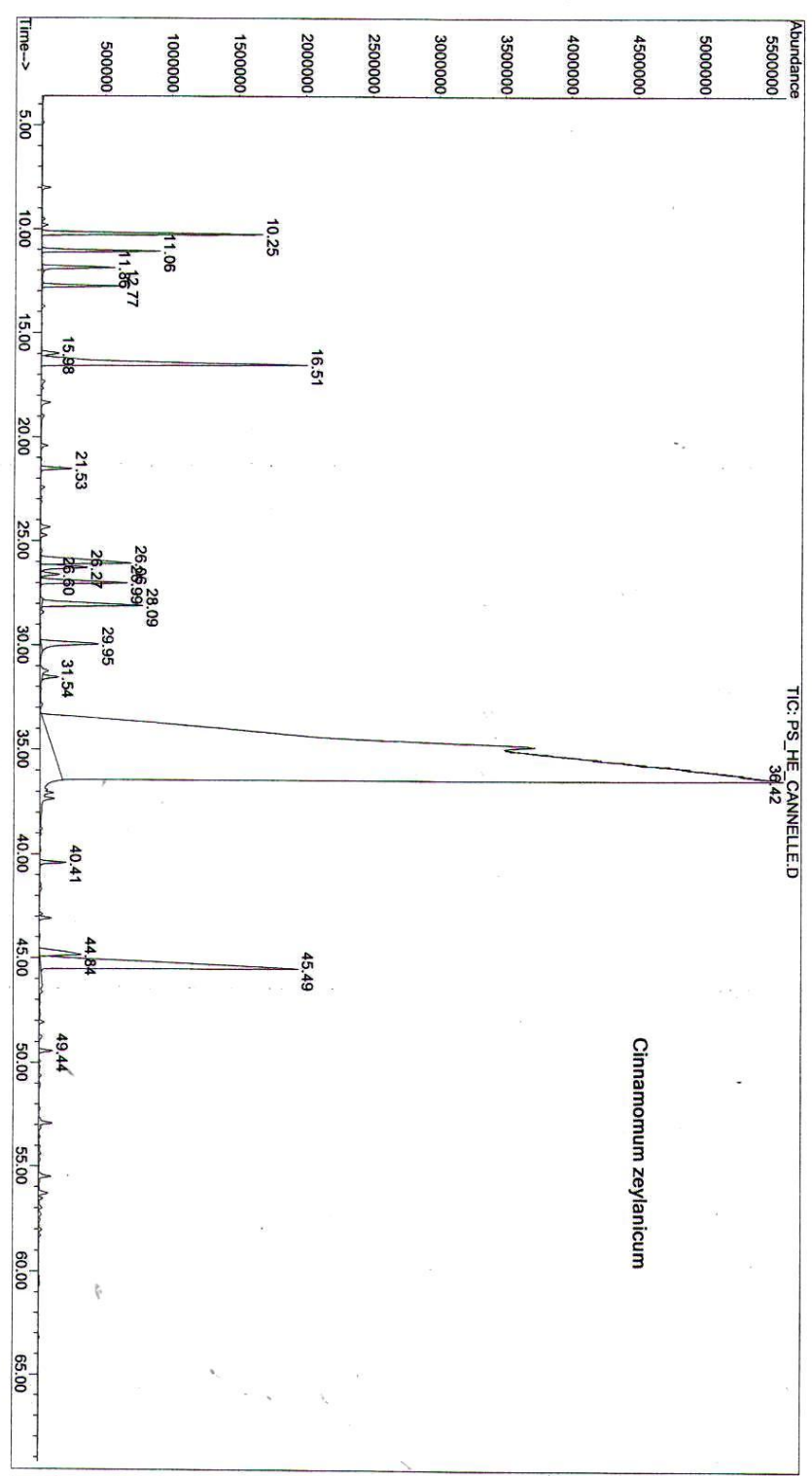


Figure n° 22 : Profil chromatographique de L'HE de *Cinnamomum zeylanicum* analysée par CG/SM.

6.3. Composition chimique de l'HE du thym :

L'analyse qualitative et quantitative par (GC/SM) de l'HE a permis d'identifier 65 composés qui représentent un total de 95.70% (**Tableau 12**). L'essence de *Thymus numidicus* est constituée principalement de : carvacrol (27.388%), thymol (22.476%), p- cymene (9.411%), delta.3-Carene (8.424%), β -Pinène (5.971%), α -terpinolène (5.808%), Limonène (1.917%), α -pinène (1.743%), β -Cubebène (1.651%), α -Copaene (1.385%), α -terpinène (1.353%), α -thujen (1.166%), totalisant environ 88,693 %.

Des études réalisées également en Algérie ont donné des résultats différents avec la dominance du thymol au lieu du carvacrol ;

Par Hadeff, (2004) pour la région de Annaba : thymol (60,80 %), p- cymene (10.32%), linalol (8%), γ -terpinène (7.60%) et le carvacrol (5,07 %).

Par Saidj *et al.*, (2009): thymol (51.0 %) carvacrol (9.4 %), linalool (3.3 %), thymolmethyl-ether (3.2 %) et le iso-caryophyllene (2.7 %).

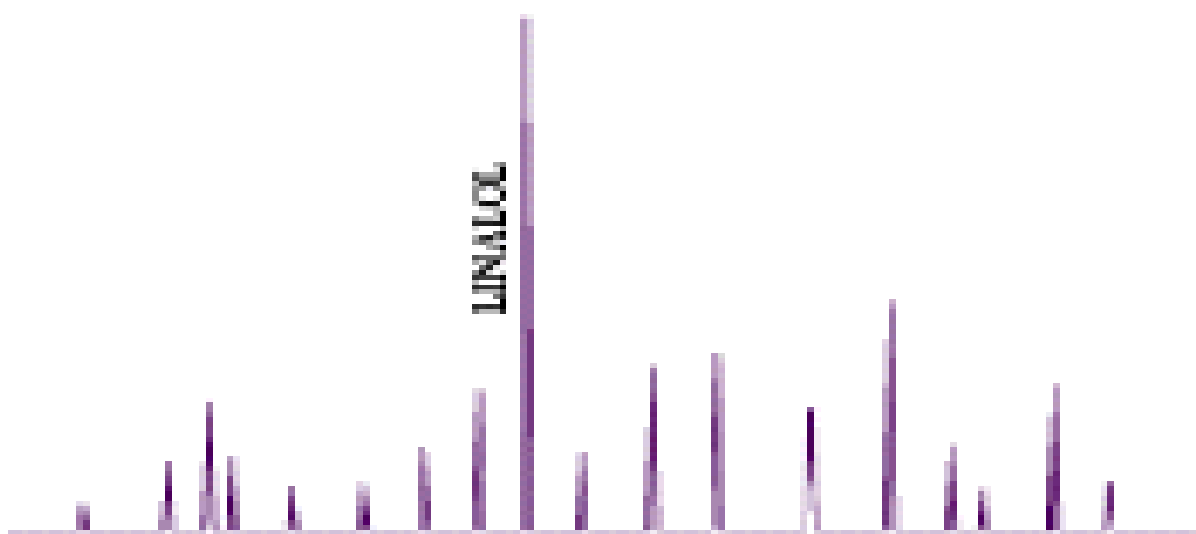
Par Kabouche *et al.*, (2004) pour la région de constantine: thymol (68.2%), carvacrol (16.9%), linalool (11.5%), p-Cymene (01.0%).

Cette grande diversité et variabilité de la composition chimique des HE de thym est très connue. Plusieurs facteurs sont responsables de cette variabilité et dont les plus importants sont le climat, le sol, la période de récolte et la méthode de conservation et d'extraction. Les facteurs génétiques et le cycle végétatif prennent part également à cette diversité chimique des huiles volatiles du *tymus numidicus*.

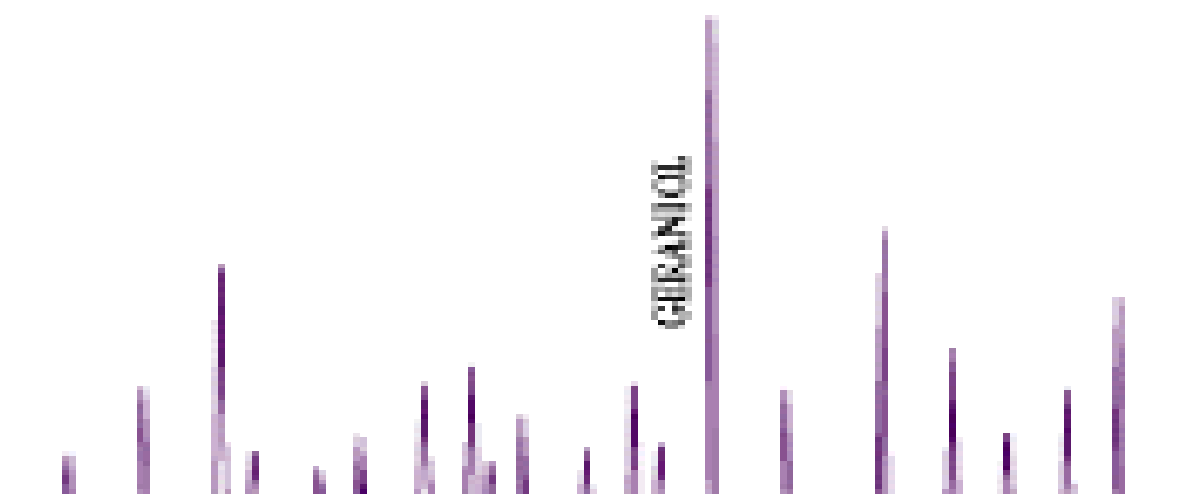
Selaon Pibiri, 2006 en aromathérapie, l'utilisation de la CPG est indispensable pour différencier dans une même espèce les variations chimiques induites par différents facteurs qui ont une influence sur la biosynthèse végétale, tels que l'ensoleillement, l'altitude, la nature et la composition du sol. Ils permettent de définir le **CHÉMOTYPE** ou race chimique de l'espèce concernée. En effet, l'observation d'un massif de Thym et la connaissance de son origine ne suffisent pas à caractériser son huile essentielle.

Par exemple, une huile essentielle de *Thymus vulgaris* peut être à chémotype thymol, linalol, thuyanol, géraniol (**Figure n° 23**). Botaniquement, il s'agit de la même plante de la famille des *Lamiacées* (ou *Labiées*).

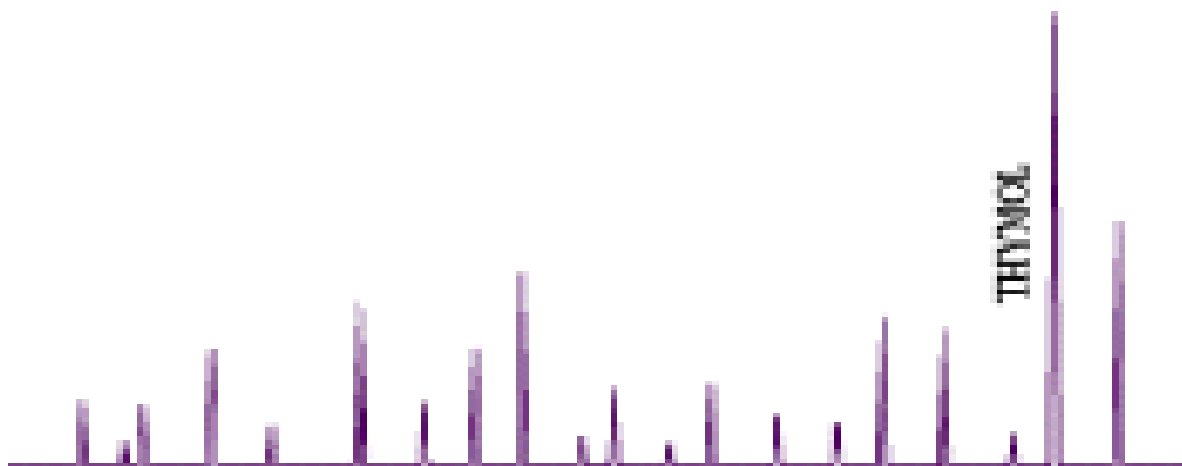
Cette notion de chémotypes est fondamentale en aromathérapie car les indications thérapeutiques qui découlent de ces divers éléments chimiques spécifiques peuvent être très différentes.



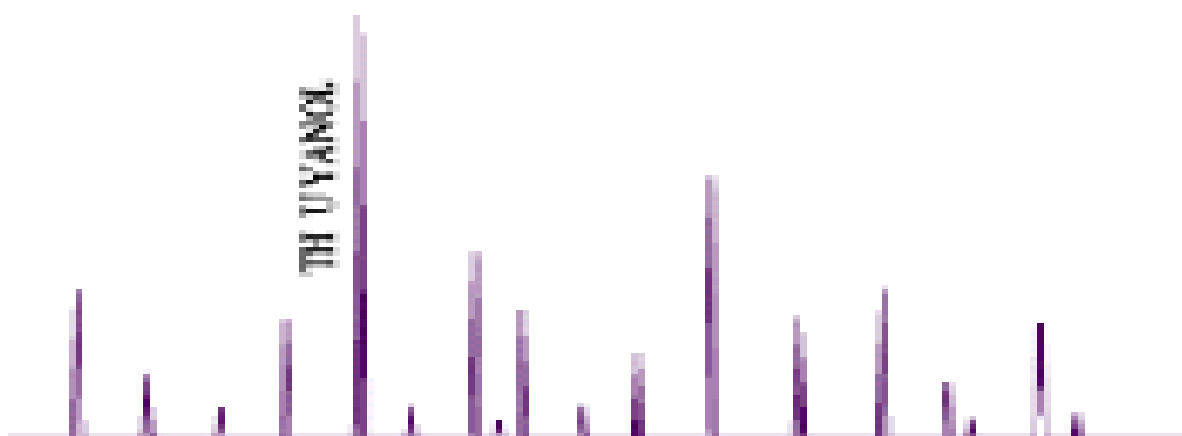
Thymus vulgaris
chénotype **Linalol**



Thymus vulgaris
chénotype **Géraniol**



Thymus Vulgaris
chénotype **Thymol**



Thymus Vulgaris
chénotype **Thuyanol**

Figure n° 23 : Illustration simplifiée de chromatographies en phase gazeuse de 4 chénotypes différents de Thym (Site n° 06).

Tableau n° 12 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus numidicus*.

No.	Compounds	Retention time (min)	%
1.	α -Thujen	9.862	1.166
2.	α -Pinene	10.266	1.743
3.	Nopinene	12.765	0.303
4.	1-octen-3-ol	13.408	0.272
5.	3-Hydroxy-1-octene	13.53	0.427
6.	β -Pinene	14.081	5.971
7.	α -phellandrene	14.641	0.272
8.	α -Terpinene	15.518	1.353
9.	p- Cymene	16.385	9.411
10.	α -Terpinolene	16.551	1.917
11.	Δ .3-Carene	18.806	8.424
12.	Sabinene hydrate	19.211	0.358
13.	α -Terpinolene	22.051	5.808
14.	4-Terpinenol	26.908	0.206
15.	Dihydrocarvone	31.161	0.229
16.	Thymol	36.676	22.476
17.	Carvacrol	37.879	27.388
18.	N-N-butylpyrrole	41.026	0.528
19.	l-Caryophyllene	43.136	0.575
20.	Germacrene-d	43.725	0.278
21.	Gamma-muurolen	46.751	0.674
22.	β -Cubebene	47.048	1.651
23.	Copaen	47.764	0.433
24.	2-isopropyl-5-metylphenol	48.105	0.204
25.	α -Amorphene	48.948	0.496
26.	α -Copaene	49.576	1.385
27.	α -Caryophyllene	50.663	0.441
28.	δ .-Cadinene, (+)-	56.255	0.194
29.	Muurolol	56.996	0.274
30.	Dicryl	80.395	0.351
31.	(E)- β -farnesene	80.663	0.495
	Total		95.70

File :D:\Spectres de gcms\Prestations\Prestation2013\Prest annaba2\
 PS_HE_THYM.D
 Operator :
 Instrument : GC/MS Ins
 Acquired : 31 Jul 2013 1:03 using AcqMethod HE6ONS
 Sample Name: Thymus numidicus
 Misc Info :

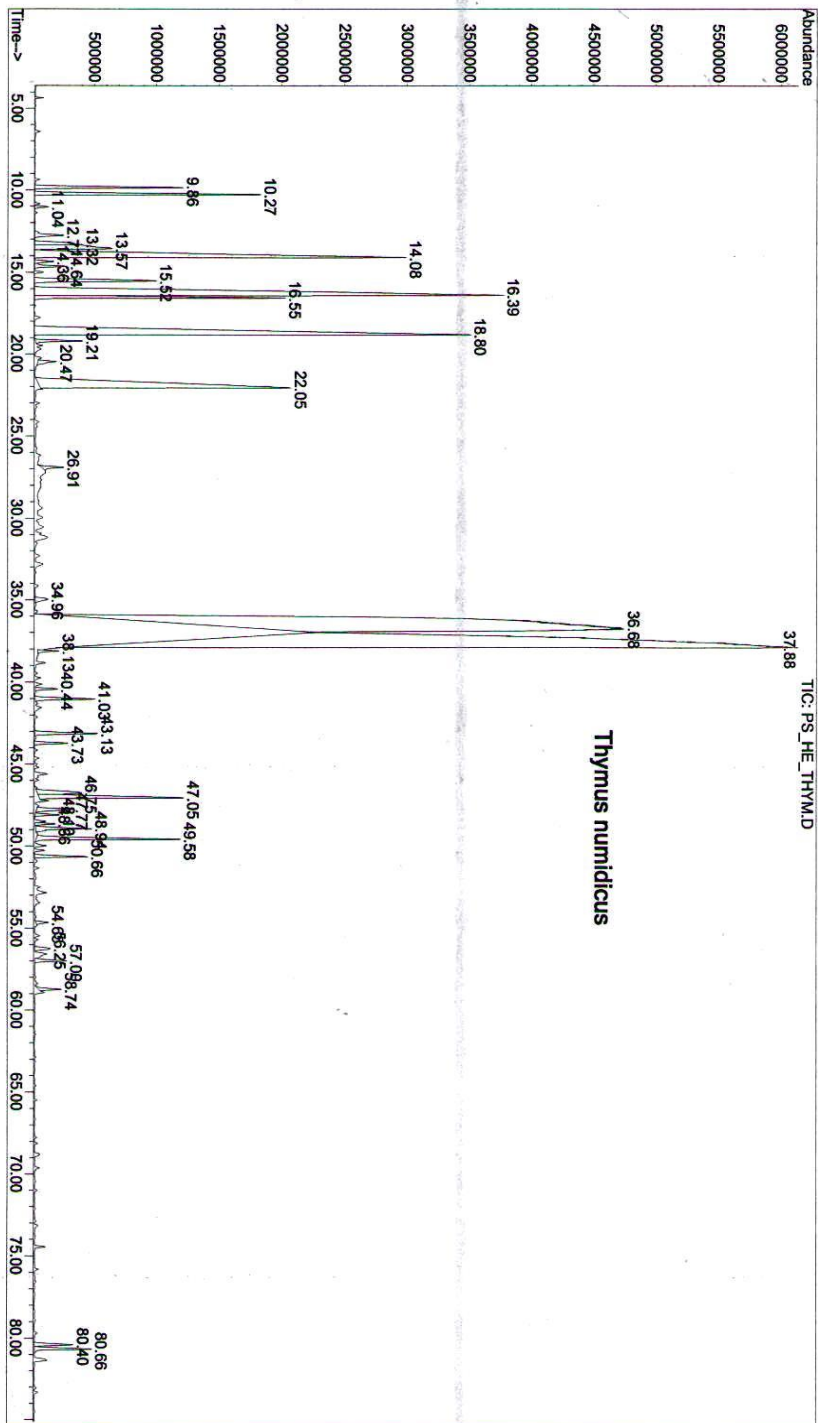


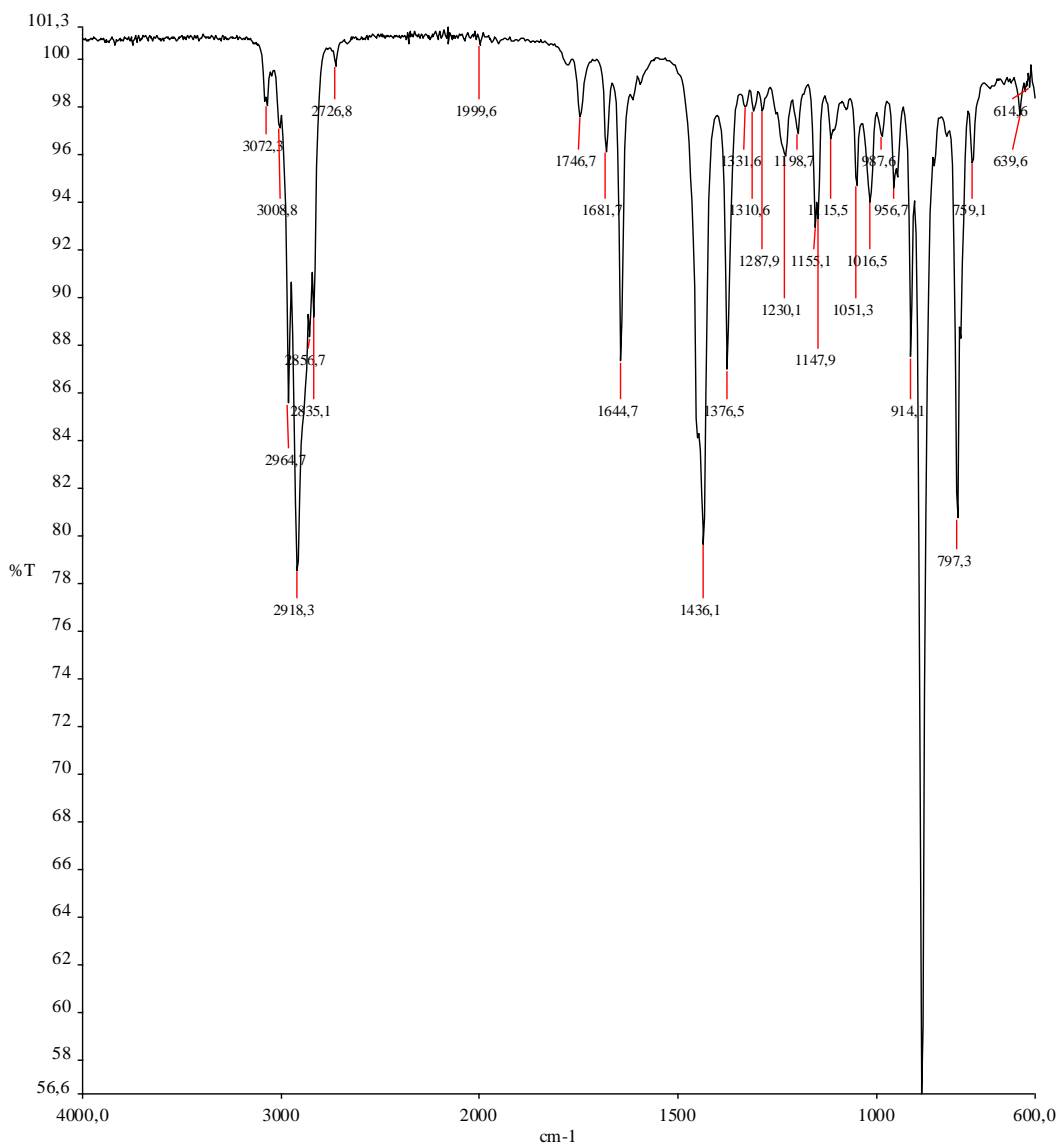
Figure n° 24 : Profil chromatographique de L'HE de *Thymus numidicus* analysée par CG/SM.

7. FTIR :

L'étude complète et détaillée d'un spectre est une opération rarement pratiquée dans l'interprétation courante à cause de la complexité de l'analyse. Celle-ci se limite donc souvent à l'identification des groupes fonctionnels par l'entremise de l'emplacement des différentes bandes sur le spectre.

Les spectres des composants majoritaires ainsi que celui des trois huiles essentielles pures comportent plusieurs similarités, ce que l'on peut constater aussi, c'est que certains des spectres ont des ressemblances, certaines bandes représentant les groupes fonctionnels sont très similaires.

- 0.883 CF0590 (-)-LIMONENE, 92%
- 0.882 CF0591 (+)-LIMONENE, 97%
- 0.857 CF3466 VALENCIA ORANGE OIL
- 0.757 CF0684 ISOPRENE
- 0.660 CF0365 ISOPRENE
- 0.583 CF1073 (-)-CARVEOL
- 0.582 CF3171 PATCHOULI OIL
- 0.564 CR0430 OIL OF TURPENTINE
- 0.518 W00737 STYRENE/ISOPRENE COPOLYMER
- 0.509 CF0583 alpha-CARYOPHYLLENE, 60%



— Huile essentielle du citron 03.sp - 06/03/2013

Figure n° 25 : FTIR de l'huile essentielle du citron.

Huile essentielle du citron 03.sp / Spectrum.lst Euclidean Search Hit List

0.883 CF0590 (-)-LIMONENE, 92%
0.882 CF0591 (+)-LIMONENE, 97%
0.857 CF3466 VALENCIA ORANGE OIL
0.757 CF0684 ISOPRENE
0.660 CF0365 ISOPRENE
0.583 CF1073 (-)-CARVEOL
0.582 CF3171 PATCHOULI OIL
0.564 CR0430 OIL OF TURPENTINE
0.518 W00737 STYRENE/ISOPRENE COPOLYMER
0.509 CF0583 alpha-CARYOPHYLLENE, 60%

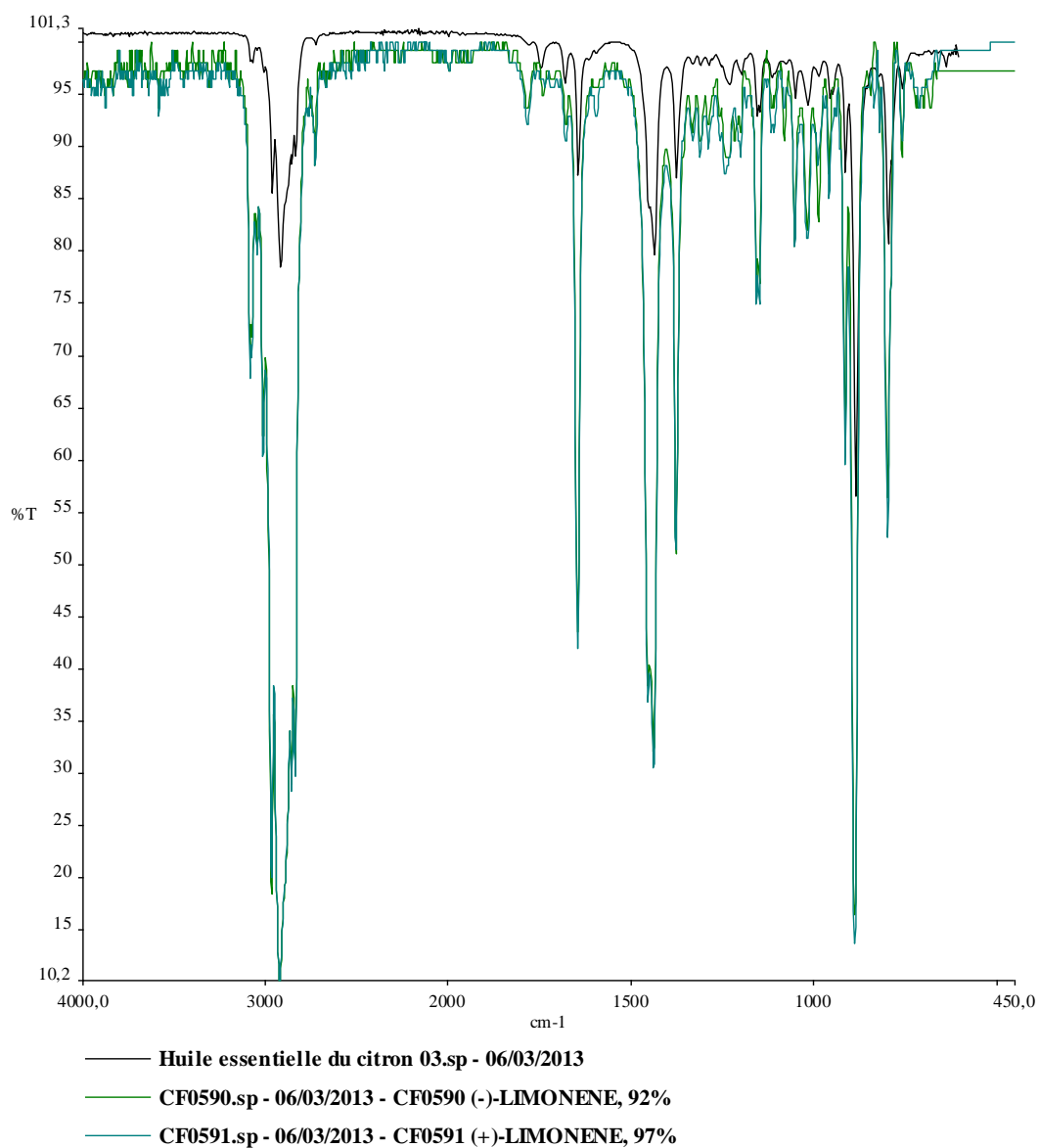
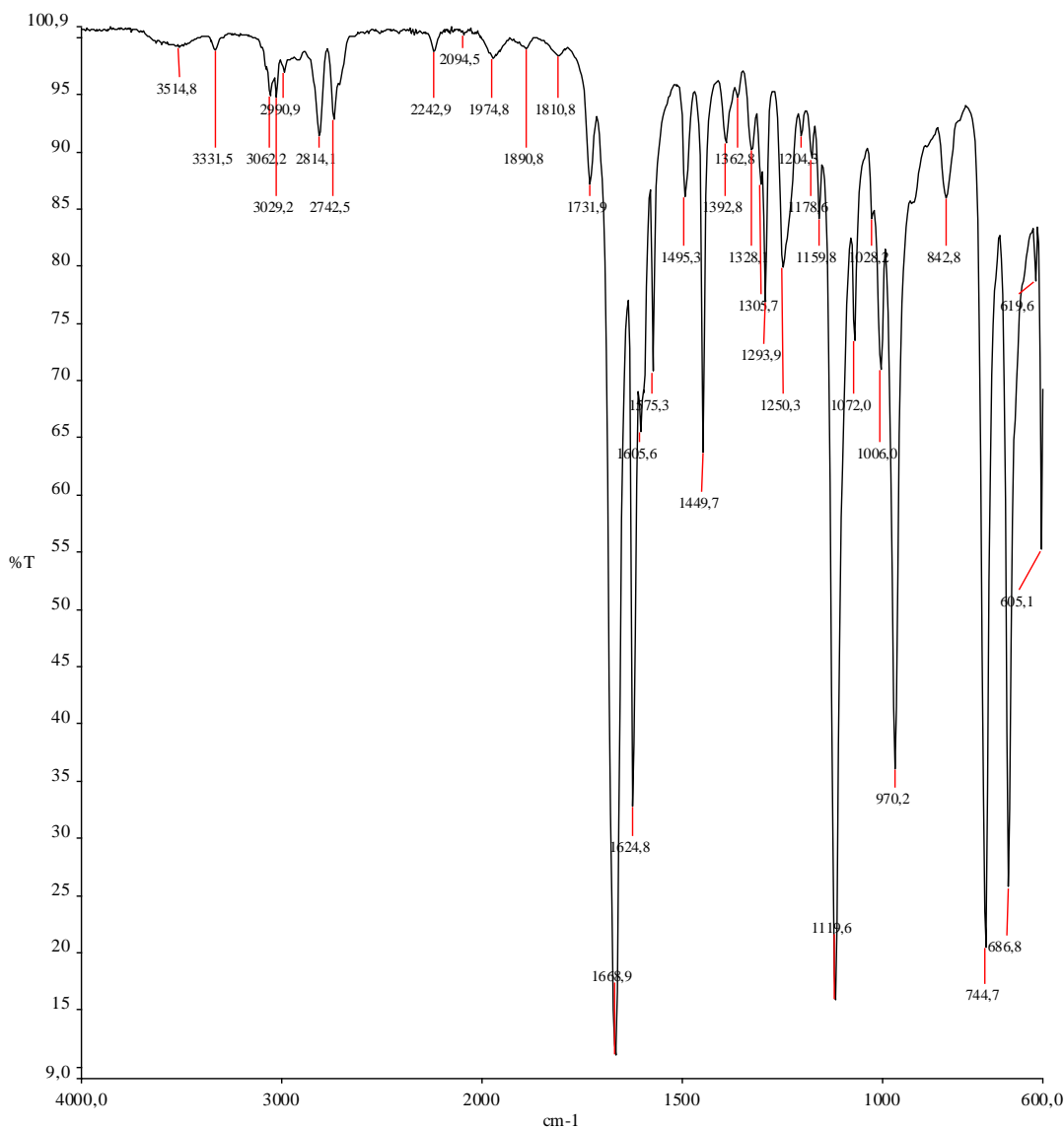


Figure n° 26 : FTIR de l'huile essentielle du citron comparée a la bibliographie.

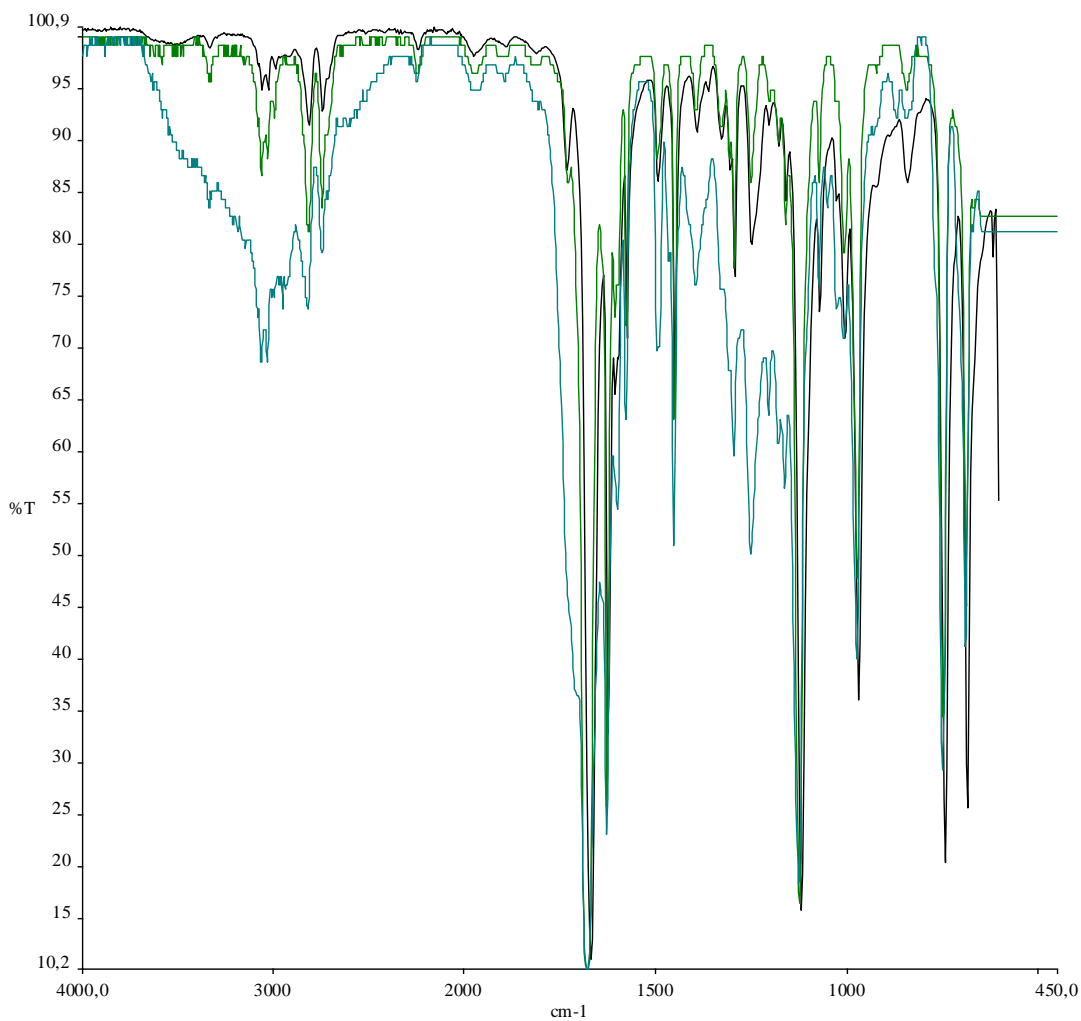
- 0.790 CF0195 trans-CINNAMALDEHYDE
- 0.694 CF3468 CASSIA OIL
- 0.604 CF0490 N-FORMYLMETHAMPHETAMINE
- 0.545 CR0340 ISOPHORONE (97%)
- 0.543 CF2572 n-BUTYL NITRITE
- 0.526 CF3270 2,5-DIMETHOXYCINNAMALDEHYDE
- 0.522 CR0402 N,N-DIETHYLFORMAMIDE (99%)
- 0.522 DL0405 CITRAL IN KBr
- 0.512 SR0076 N,N-DIETHYLFORMAMIDE
- 0.500 CF0881 ISOBUTYL NITRITE



— Huile essentielle de la cannelle 03.sp - 06/03/2013

Figure n° 27 : FTRI de l'huile essentielle de la cannelle.

0.790 CF0195 trans-CINNAMALDEHYDE
0.694 CF3468 CASSIA OIL
0.604 CF0490 N-FORMYLMETHAMPHETAMINE
0.545 CR0340 ISOPHORONE (97%)
0.543 CF2572 n-BUTYL NITRITE
0.526 CF3270 2,5-DIMETHOXYCINNAMALDEHYDE
0.522 CR0402 N,N-DIETHYLFORMAMIDE (99%)
0.522 DL0405 CITRAL IN KBr
0.512 SR0076 N,N-DIETHYLFORMAMIDE
0.500 CF0881 ISOBUTYL NITRITE

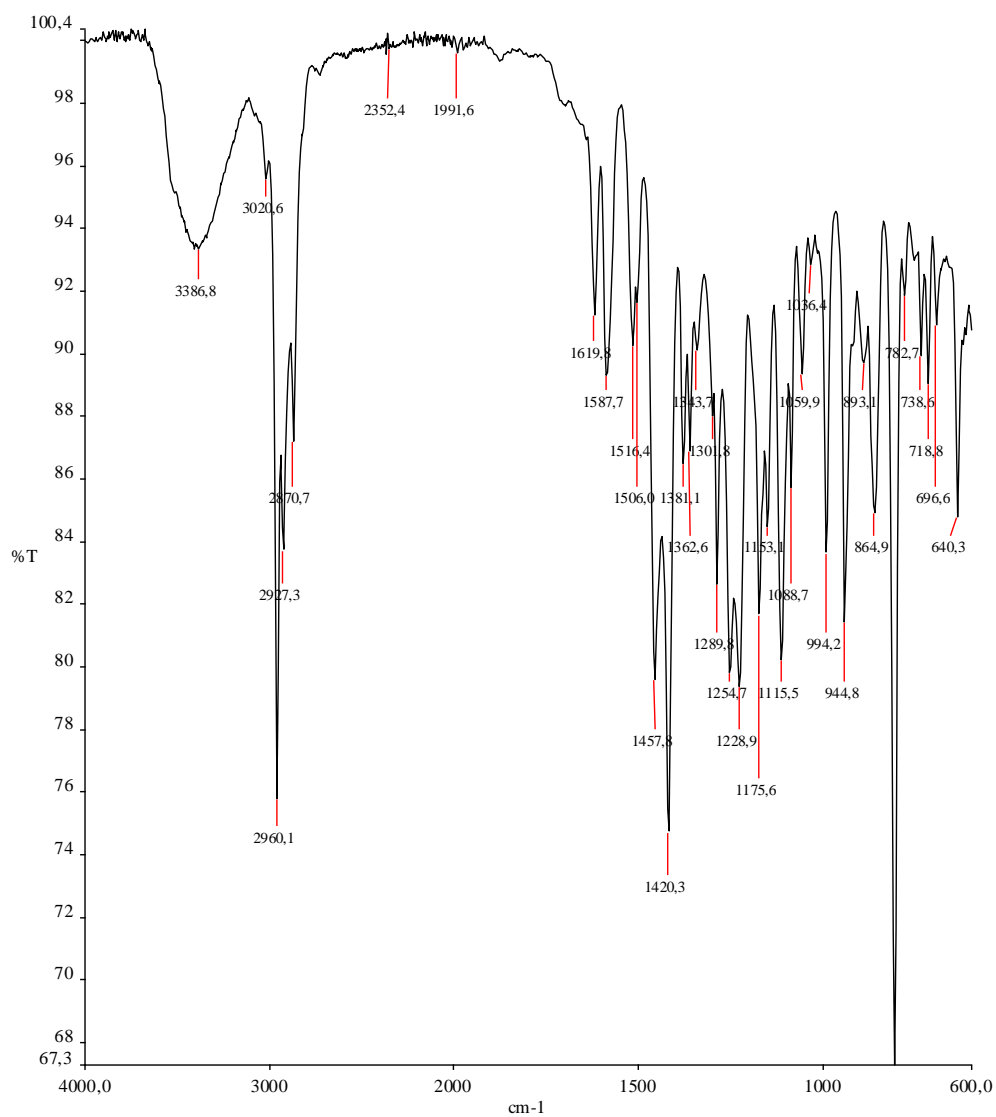


— Huile essentielle de la cannelle 03.sp - 06/03/2013
— CF0195.sp - 06/03/2013 - CF0195 trans-CINNAMALDEHYDE
— CF3468.sp - 06/03/2013 - CF3468 CASSIA OIL

Figure n° 28 : FTIR de l'huile essentielle de la cannelle comparée à la bibliographie.

thym 04 .sp / Spectrum.lst Euclidean Search Hit List

0.847 CF3464 THYME OIL
0.816 CF1723 CARVACROL
0.596 DL1177 THYMOL IN KBr
0.570 CF0637 TETRAETHYLENE GLYCOL
0.570 CF1286 p-CYMENE
0.507 CF3115 2,5-DIMETHYLBENZYL ALCOHOL
0.501 CF3124 p-ISOPROPYLBENZYL ALCOHOL
0.501 OL1336 PLASKON MELAMINE COATING RESIN NO. 3382
0.478 CF3288 4-ETHYLAMPHETAMINE
0.461 CF3397 HEXAMINE



— thym 04 .sp - 05/06/2013

Figure n° 29 : FTRI de l'huile essentielle du thym.

thym 04 .sp / Spectrum.lst Euclidean Search Hit List

0.847 CF3464 THYME OIL
0.816 CF1723 CARVACROL
0.596 DL1177 THYMOL IN KBr
0.570 CF0637 TETRAETHYLENE GLYCOL
0.570 CF1286 p-CYMENE
0.507 CF3115 2,5-DIMETHYLBENZYL ALCOHOL
0.501 CF3124 p-ISOPROPYLBENZYL ALCOHOL
0.501 OL1336 PLASKON MELAMINE COATING RESIN NO. 3382
0.478 CF3288 4-ETHYLAMPHETAMINE
0.461 CF3397 HEXAMINE

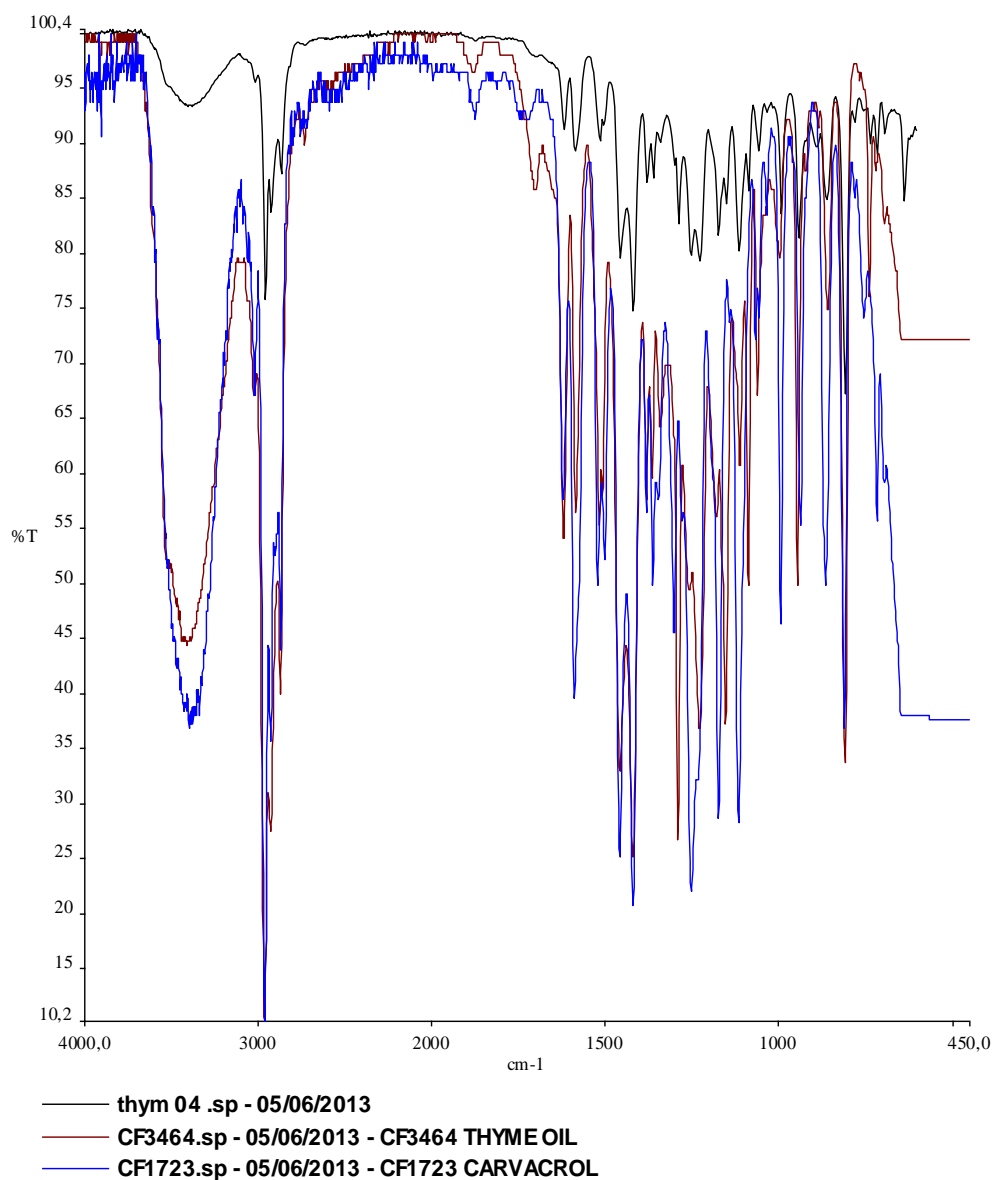


Figure n° 30 : FTIR de l'huile essentielle du thym comparée a la bibliographie.

Et voici les liens que nous analyserons sur les graphiques de la spectroscopie IR.

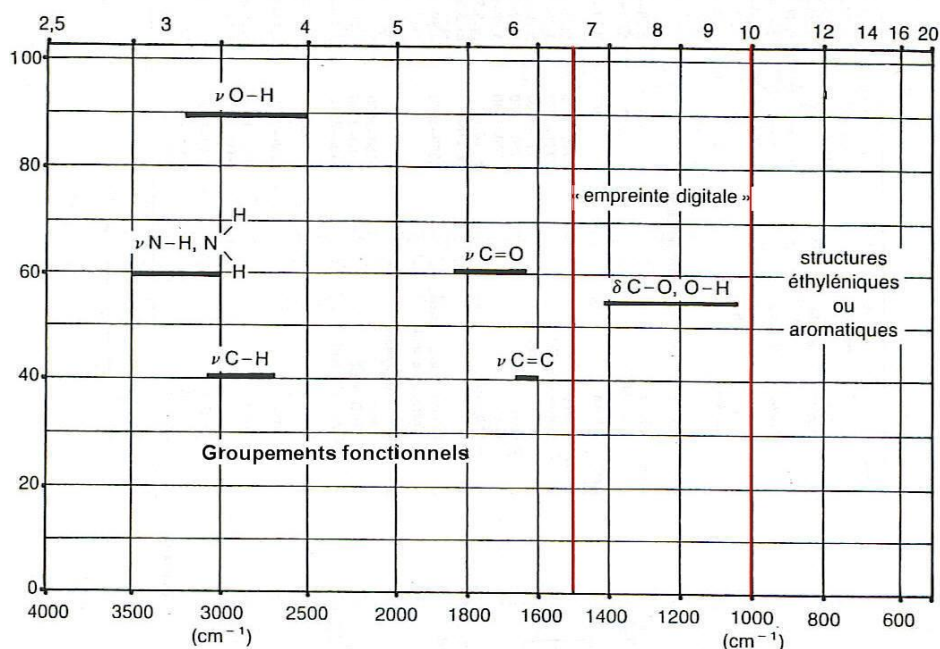


Figure n° 31 : graphiques de la spectroscopie IR.

7.1. Citron:

Voici les liens présents dans la molécule de limonène (Figure n° 31):

Tableau n° 13 : liens présents dans la molécule de limonène.

Liens présents dans la limonène	Fréquence théorique de la bande (cm ⁻¹)	Présence de la bande dans le spectre
C-H (alcène)	3100-3000	Oui
C-H (aromatique)	3150-3050	Oui
C=C	1600-1680	Oui

le spectre de la limonène ainsi que celui de l'huile essentielle pure comportaient plusieurs similarités (Figure n° 25 et 26). Malheureusement, aucune « empreinte digitale » de l'huile extraite ne coïncidait avec celle de l'huile essentielle pure ou de la limonène.

Parmi les dix composés révélés par l'FTRI: (1). (-)-limonene, 92%, (2). (+)-limonene, 97%, (3). valencia orange oil, (4). Isoprene, (5). Isoprene, (6). (-)-carveol, (7). patchouli oil, (8). oil of turpentine, (9). styrene/isoprene copolymer, (10). alpha-caryophyllene, 60%, on trouve un composé qui est en commun entre cette dernière et la CG/SM: Limonene

7.2. Cannelle :

Parmi les dix composés révélés par FTIR: (1). Trans-cinnamaldehyde, (2). Cassia oil, (3). N-formylmethamphetamine, (4). Isophorone (97%), (5). N-butyl nitrite, (6). 2,5-dimethoxycinnamaldehyde, (7). N,n-diethylformamide (99%), (8). Citral in kbr, (9). N,n-diethylformamide, (10). Isobutyl nitrite. On trouve un composé qui est en commun entre cette dernière et la CG/SM: Cinnamic aldehyde (**Figure n° 27 et 28**).

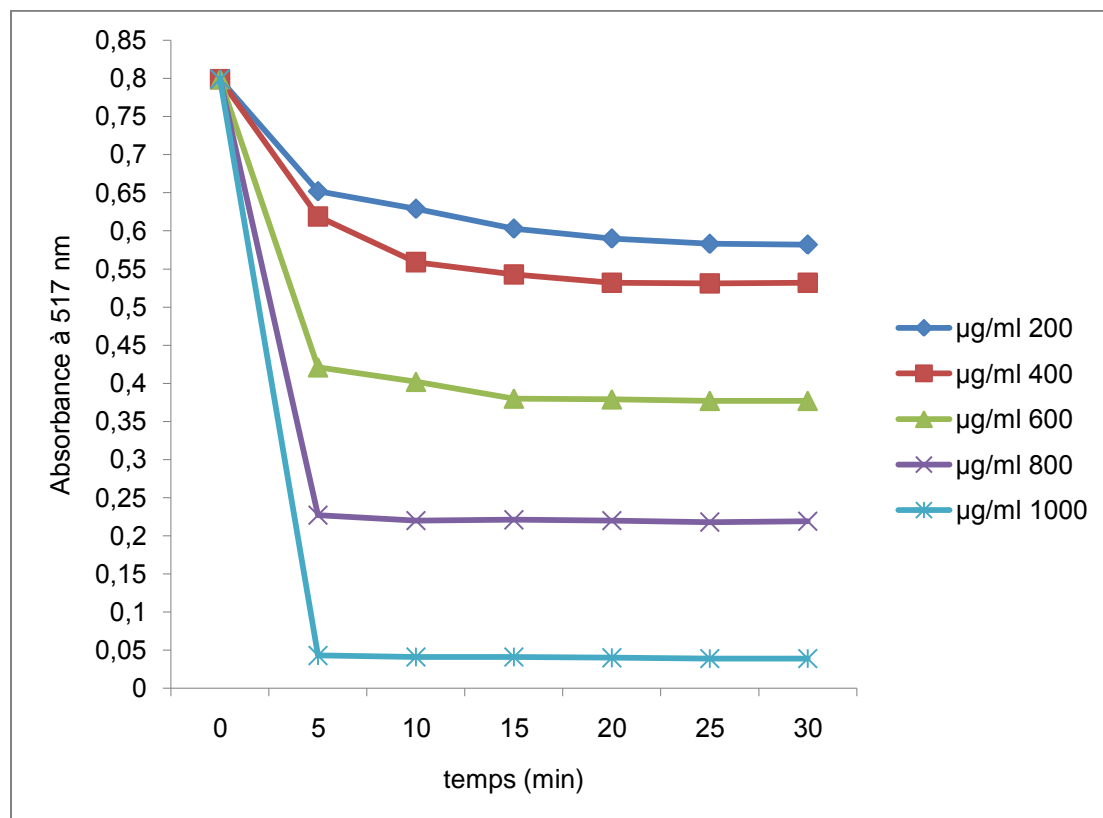
7.3. Thym :

Parmi les dix composés révélés par l'FTIR : (1).thyme oil, (2).carvacrol, (3).thymol in kbr, (4).tetraethylene glycol, (5).p-cymene, (6).2,5-dimethylbenzyl alcohol, (7).p-isopropylbenzyl alcohol, (8).plaskon melamine coating resin no. 3382, (9).4-ethylamphetamine, (10).hexamine. On trouve trois composés sont commun entre cette FTIR et la CG/SM : le thymol, le carvacrol et le p-cymene (**Figure n° 29 et 30**).

8. Activité antioxydante :

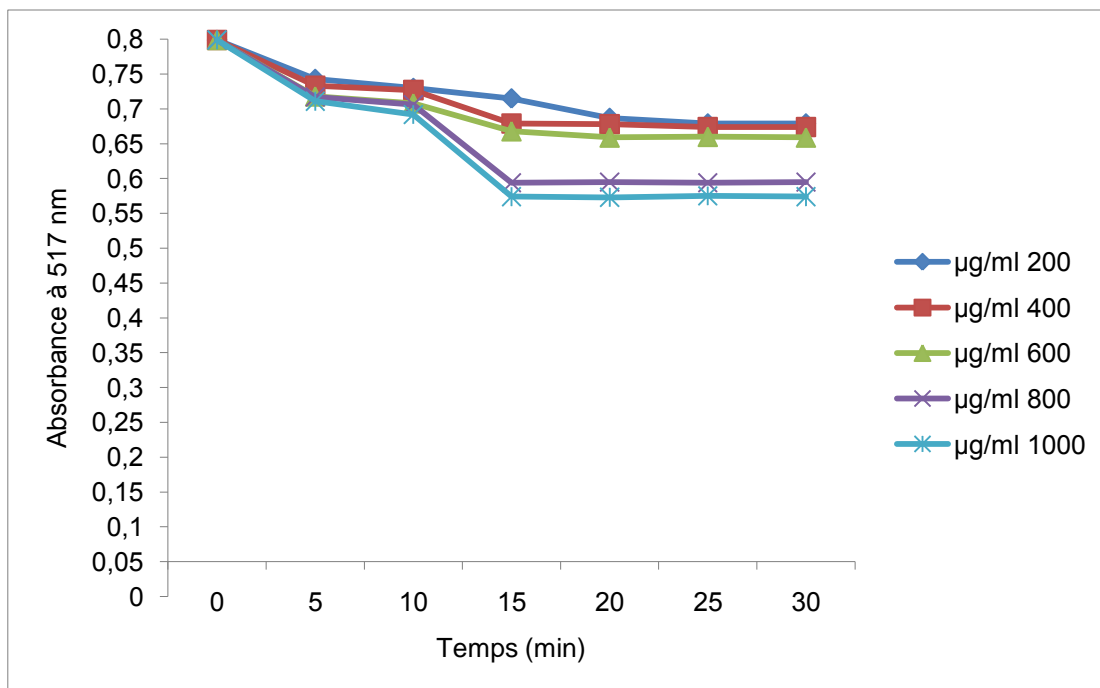
8.1. Cinétique de la réaction :

La cinétique de réduction du radical libre DPPH obtenue pour chaque concentration de l'acide ascorbique et des huiles essentielles est indiquée dans les **Figures 32, 33, 34 et 35**.



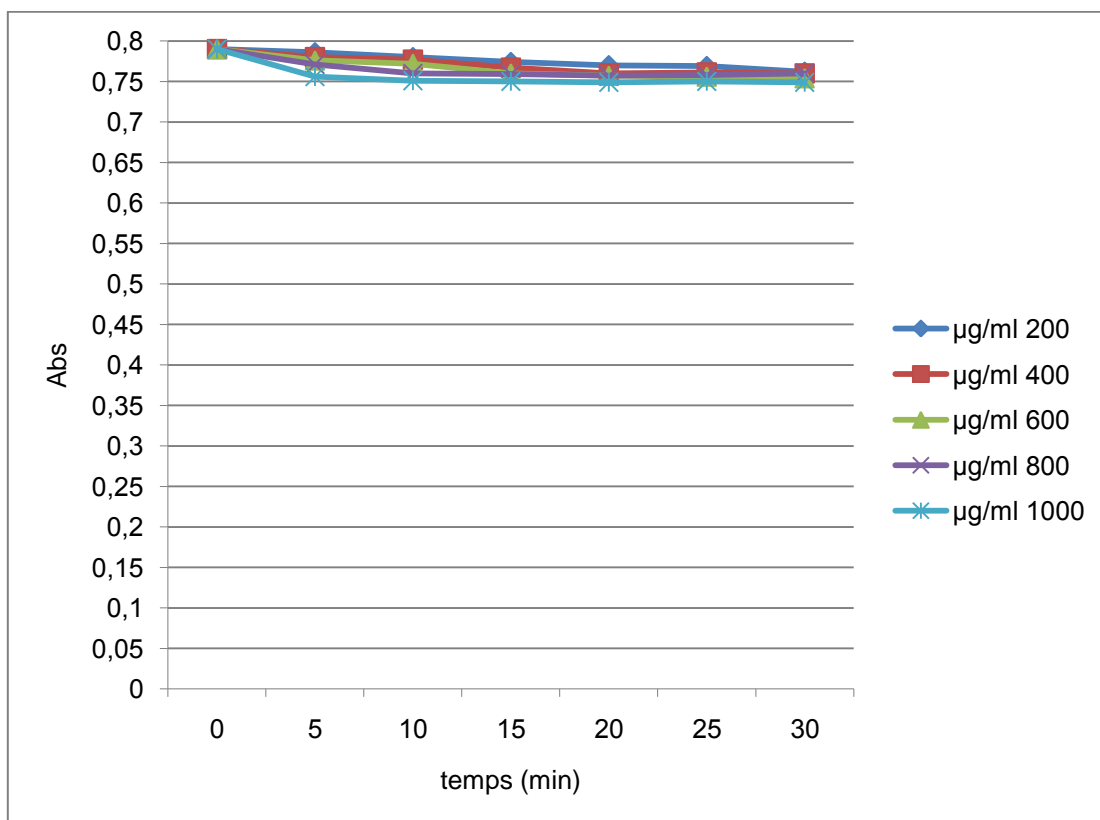
(a) acide ascorbique.

Figure n° 32 : Cinétique de réduction du DPPH par l'acide ascorbique.



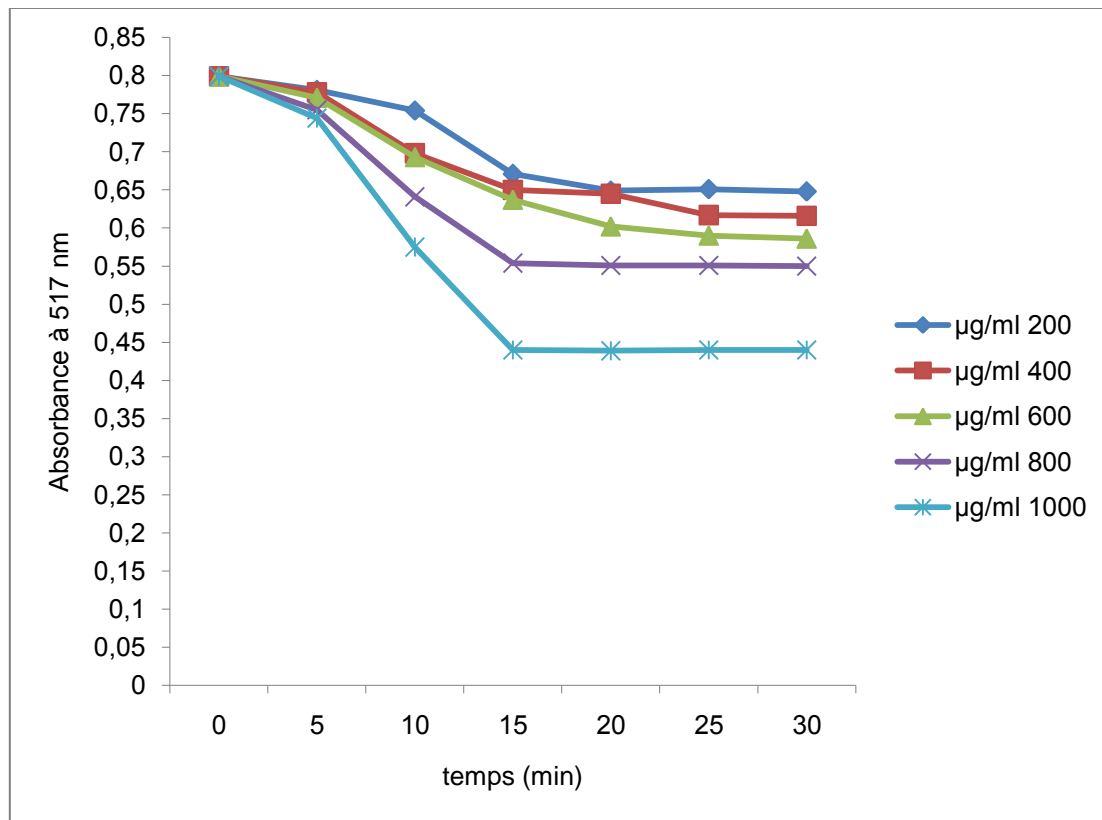
(b) : huile essentielle du citron.

Figure n° 33 : Cinétique de réduction du DPPH par l'huile essentielle du citron.



(c) : huile essentielle de la cannelle.

Figure n° 34 : Cinétique de réduction du DPPH par l'huile essentielle de la cannelle.



(d) : huile essentielle du thym.

Figure n° 35 : Cinétique de réduction du DPPH par l'huile essentielle du thym.

Pour les deux composés examinés (acide ascorbique et huile essentielle), la réaction est biphasée, avec un affaiblissement rapide dans l'absorbance dans les premières minutes, suivie d'une étape plus lente, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint ; alors on distingue deux zones : une zone à forte cinétique de piégeage du radical observée au bout des cinq premières minutes pour l'acide ascorbique pour toutes les concentrations, et au bout de 10 minutes pour la concentration 1000 µg/ml.

Cette zone est observée au bout des 15 premières minutes pour l'huile essentielle; une deuxième zone à faible cinétique de piégeage du radical DPPH ou zone de tendance vers l'équilibre constatée après les 5 minutes pour toutes les concentrations de l'acide ascorbique, exceptée la concentration 1000 µg/ml. Pour l'huile essentielle, cette zone est constatée après les et 15 minutes.

Lorsqu'on effectue la réaction entre le DPPH et l'acide ascorbique donne use d'hydrogène, on constate que la réaction atteint un équilibre au bout d'un temps court par rapport au 'huiles essentielles.

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH, l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène.

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont enregistrés dans la **Figure n° 36**. Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration que ce soit pour l'acide ascorbique ou pour les huiles essentielles.

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour les huiles essentielles est inférieur à celui de l'acide ascorbique pour toutes les concentrations utilisées.

Pour une concentration de 1000 µg/ml, l'huile essentielle a révélé un pourcentage d'inhibition de = (28,16±0,091) % pour le citron, (4,3 ± 0,112) % pour la cannelle et (44,93±0,157) % pour le thym tandis que l'acide ascorbique est inhibée avec (94,81±0,286) % de DPPH.

Tableau n° 14 : Pourcentage d'inhibition pour l'acide ascorbique, et les huiles essentielles du citron, de la cannelle et du thym.

Concentrations (µg/ ml)	HE du <i>C. limon</i>	HE du <i>T. numidicus</i>	HE de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Acide ascorbique
200	15,01±0,043	18,77±0,067	02,65±0,009	26,20±0,077
400	15,64±0,047	22,78±0,075	03,67±0,011	32,65±0,098
600	17,52±0,051	26,16±0,088	03,80±0,013	51,89±0,155
800	25,65±0,083	31,16±0,107	03,92±0,011	72,15±0,218
1000	28,16±0,091	44,93±0,157	04,92±0,014	94,81±0,286

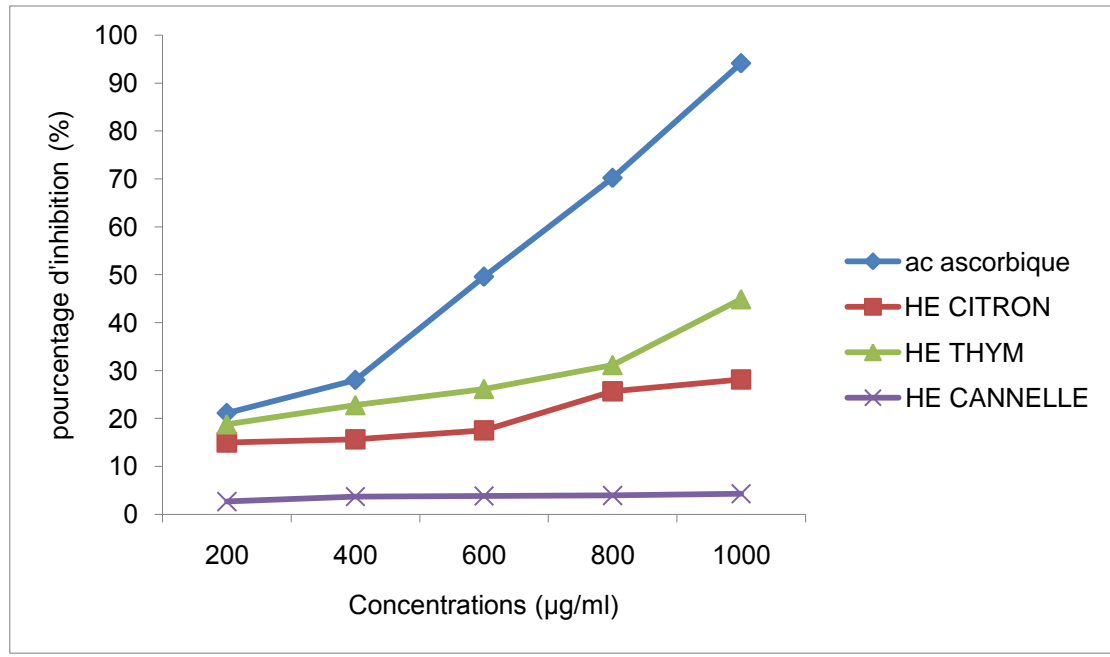


Figure n°36 : Pourcentage d'inhibition pour l'acide ascorbique, et les huiles essentielles du citron, de la cannelle et du thym.

3.8.2. Détermination d'IC50 :

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %.

Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande, un exemple de calcul est schématisé dans la **Figure n° 37**.

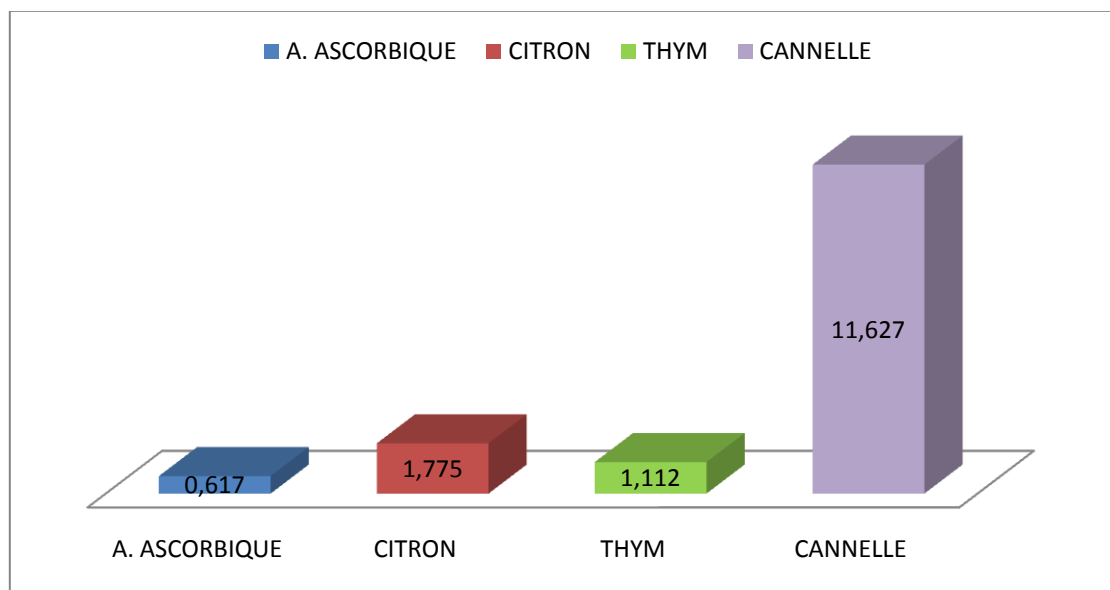


Figure n° 37 : Détermination d'IC50.

8.3. Détermination de TC50 :

On a choisi l'état d'équilibre comme période de mesure où il s'avère que la réaction ne progresse pas plus loin. Le temps à l'état d'équilibre dépend de la réactivité des antioxydants et des concentrations utilisées. On constate que la l'acide ascorbique réagit d'une façon plus rapide avec DPPH. Le TEC50 pour l'HE étudiée est de 15 ± 1 min, alors que l'acide ascorbique a besoin seulement de $5 \pm 0,66$ minutes pour diminuer la concentration du radical libre de 50 %.

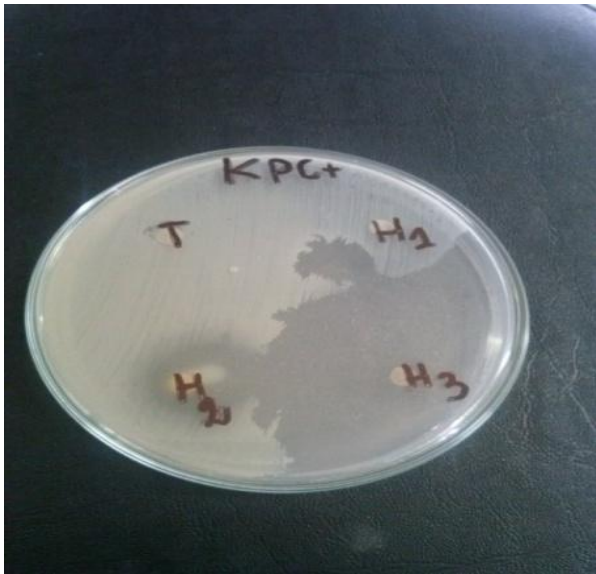
Il semble que l'huile essentielle de *Thymus numidicus* a une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celle de l'acide ascorbique. Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle. Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres. Le thymol qui est un composé majoritaire de notre huile essentielle avec une concentration de (22.476%) possède une forte activité antioxydante. Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres, (Lu *et al.*, 2001), (Sing *et al.*, 2006).

9. Activité antibactérienne « in vitro » :

9.1. Aromatogramme :

Les observations effectuées sur l'effet des H.Es sur la croissance des souches bactériennes testées: sont représentées dans les **Figures: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53** et les **tableau 15 et 16**.

Essai avec l'H.Es:



Figures 38 : Inhibition obtenu pour KPC+



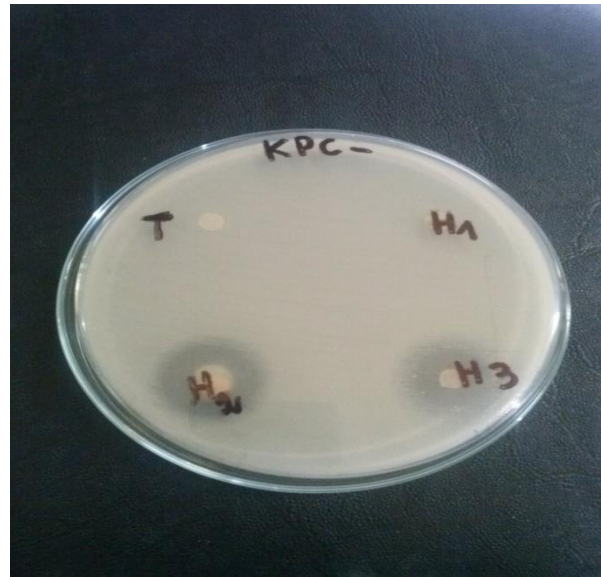
Figures 39 : Inhibition obtenu pour Sa S 178



Figures 40 : Inhibition obtenu pour P miabilis S 120



Figures 41 : Inhibition obtenu pour Shigella S 241



Figures 42 : Inhibition obtenu pour SCN 128 **Figures 43 :** Inhibition obtenu pour KPC -



Figures 44 : Inhibition obtenu pour Serratia **Figures 45 :** Inhibition obtenu pour SFL S 156



Figures 46 : Inhibition obtenu pour K.oxy S113



Figures 47 : Inhibition obtenu pour Sa ATCC 23



Figures 48 : Inhibition obtenu pour Ef S 154



Figures 49 : Inhibition obtenu pour AC S239



Figures 50 : Inhibition obtenu pour CF S 208 **Figures 51 :** Inhibition obtenu pour Ea S 214



Figures 52 : Inhibition obtenu pour Ef ATCC 29

Figures 53 : Inhibition obtenu pour Salmo S 226

Tableau n° 15 : Halos d'inhibition en (mm) provoqués par l'HE.

Ø halo d'inhibition	HE du citron	HE de la cannelle	HE du thym
KPC+	>6	22	16.8
KPC -	>6	20	61.8
SFL S 156	>6	22.1	33.4
Salmo S 226	>6	25.4	36
AC S239	>6	23.2	46
SCN 128	10.5	41.6	27.4
P miabilis S 120	>6	21	70
Shigella S 241	7	38	70.6
CF S 208	>6	76	32.6
Serratia	>6	22.3	21.8
Sa ATTC 23	>6	18.2	96
Sa S 178	>6	21.5	45.6
Ef S 154	25.4	42.8	70
Ef ATTC 29	>6	43	55.8
K.oxy S113	20	57	82
Ea S 214	>6	21.7	27

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des diamètres de la zone d'inhibition.

Tableau n° 16 : Sensibilité provoquée par l'HE.

Sensibilité	HE du citron	HE de la cannelle	HE du thym
KPC+	Non sensible	Extrêmement sensible	Très sensible
KPC -	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
SFL S 156	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
Salmo S 226	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
AC S239	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
SCN 128	Sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
P miabilis S 120	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
Shigella S 241	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
CF S 208	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
Serratia	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
Sa ATTC 23	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
Sa S 178	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
Ef S 154	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
Ef ATTC 29	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
K.oxy S113	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible
Ea S 214	Non sensible	Extrêmement sensible	Extrêmement sensible

Les résultats ci-dessus concernant l'activité antimicrobienne « *in vitro* » obtenue à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose (aromatogramme) montrent que l'activité antibactérienne des HE testées est en fonction de la bactérie cible.

9.1.1. Citron :

Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis des 13 souches (**Figures: 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 47, 49, 50, 51, 52, 53**). Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne de H.E de *Citrus*. Il est à noter que l'activité antimicrobienne la plus élevée a été enregistrée avec l'HE de *C. limonum* avec une valeur moyenne de l'auréole d'inhibition de 25,40 mm.

D'après Kalemba et Kunicka, (2003), la sensibilité d'un microorganisme aux HE dépend des propriétés de l'HE et le microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram (+) sont plus sensibles aux HE que les bactéries à Gram (-). Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des HE confirment ce phénomène (Poole, 2001 ; Cimanga *et al.*, 2002 ; Burt, 2004b; Bekhechi *et al.*, 2008).

Selon (Poole, 2001 ; Burt, 2004a ; Busatta *et al.*, 2008), la grande résistance des bactéries à Gram (-) aux HE est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram (+).

À l'inverse, Celikel et Kavas, (2008) ont souligné, que l'action des HE volatiles a peu d'influence sur l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram (-) et Gram (+). Cependant, quelques HE semblent être plus spécifiques, et exercent une importante activité inhibitrice contre les bactéries à Gram (+) plus importante que sur Gram (-). Les mécanismes d'action des HE et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés.

Il est à noter aussi, qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre la teneur des composants chimiques et l'activité antibactérienne de l'HE du *Citrus* testées pour 13 souches. En effet, le limonène constitue le composant majoritaire de l'HE (61.647%) a démontré une efficacité antimicrobienne inférieure. D'après ces observations, il est évident que le limonène n'a exercé aucune influence sur le potentiel antibactérien de H.E testées.

Nos observations rejoignent celles qui ont été faites par Inouye *et al.*, (2001), que les HE contenant du phénol ou de l'alcool comme composés majoritaires étaient plus actives, que celles contenant le limonène (hydrocarbure monoterpénique) comme composé majoritaire. Ces mêmes observations ont été également partagées par Dorman et Deans, (2000), qui ont montré que les hydrocarbures monoterpéniques, abondants dans les HE de *Citrus* contenant le limonène comme constituant principal est faiblement inhibiteur contre une panoplie de microorganismes.

Et selon Delaquis *et al.*, (2002) ont estimé que l'activité antimicrobienne de certaines HE pourrait être attribuée à la présence des composés mineurs présents à de faibles taux non négligeables tels que: le nérol, le néral, bornéol, linanol, cinnamaldehyde, carvacrol, géraniol, myrténal et eugénol connus pour exhiber une activité antibactérienne impliquées dans les phénomènes de synergie entre les différents constituants qui peuvent être à l'origine d'une activité antimicrobienne beaucoup plus prononcée que celle prévisible par les composés majoritaires.

9.1.2. Cannelle :

Selon Khanfri, 2012 (Site n° 05) : L'étude microbiologique de l'huile essentielle de Cannelle pure avec la technique de dilution en milieu solide (gélose) porte sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices, bactéricide et fongicide (CMI, CMB, CMF) sur la croissance des levures et les bactéries. L'ensemble des résultats microbiologiques obtenus au cours de cette étude, montre que tous les produits testés possèdent une activité antibactérienne et antifongique très importante, dans laquelle certaines souches semblent se distinguer par une sensibilité très élevée (**Figures: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53**).

La cinnamaldéhyde ferait également partie des composés procurant à la cannelle des propriétés antimicrobiennes (Lai et Roy, 2004)

En effet, depuis des lustres, des épices comme la cannelle sont utilisées pour prolonger la conservation des aliments. Des études sur des extraits de cannelle démontrent aujourd'hui qu'elle peut aider à diminuer la multiplication de plusieurs micro-organismes (Lai et Roy, 2004). (Nielsen et Rios, 2000).

9.1.3. Thym :

Une très extrême sensibilité a été observée vis-à-vis des 16 souches étudiées (**Figures: 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53**), L'activité antibactérienne de HE de thym a été démontrée dans plusieurs recherches, Bhaskara *et al.*, (1998), Cosentino *et al.*, (1999), Cruz *et al.*, (1989), Daferera, (2000), Karaman, (2001), Kulevanova et Panovska, (2002), Marino *et al.*, (1999).

L'importante bioactivité de cette essence est en relation avec sa teneur en thymol (22.476%). En effet, plusieurs auteurs Gergis *et al.*, (1990), Panizzi *et al.*, (1993), Pellecier *et al.*, (1980), Satrani *et al.*, (2008), Sivropoulou *et al.*, (1996), Trombetta *et al.*, (2002), ont montré que les HE riches en dérivés phénoliques (carvacrol et thymol) possèdent une forte activité antimicrobienne. Effectivement, les HE de *Thymus bleicherianus* et de *Thymus ciliatus*, riches en thymol (respectivement 24 et 44,2 %), ont exercé une forte activité antimicrobienne Amarti *et al.* (2008), Amarti *et al.*, (2010), El Ajjouri *et al.*, (2008), El Ajjouri *et al.*, (2010). Dorman et Deans ont montré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne contre 25 genres de bactéries testées. Lambert *et al.*, (2001) et Juven *et al.*, (1994) ont expliqué ce phénomène par le fait que le thymol se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne. D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatile est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure Juven *et al.*, (1994).

Les principaux composants actifs des HE contre les agents pathogènes d'origine alimentaire contiennent généralement 1% des composés phénoliques tels que le carvacrol, l'eugénol, et le thymol (Dorman et Deans, 2000 ; Lambert *et al.*, 2001) ; le citral 1,8-cinéole et le linalol (Cristiani *et al.*, 2007). Les propriétés antibactériennes de ces composés sont en partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois bactériennes, perturbant ainsi le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires ; dégradation de la paroi cellulaire (Helander *et al.*, 1998), dommages de la

membranocytoplasmique (Knobloch *et al.*, 1989 ; Ultee *et al.*, 2002), dommages des protéines membranaires (Juven *et al.*, 1994 ; Ultee *et al.*, 1999), fuites du contenu des cellules (Oosterhaven *et al.*, 1995 ; Lambert *et al.*, 2001), coagulation du cytoplasme et l'épuisement de force motrice des protons (Ultee et Smid, 2001).

Cependant la comparaison de l'efficacité des HE à travers les différentes publications reste difficile à réaliser, et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables : comme la composition chimique des HE qui varie selon les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une même espèce. Donc les activités antimicrobiennes d'une HE peuvent changer par sa composition chimique, par les géotypes, jusqu'aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disque sur agar ou par méthode de dilution) les résultats obtenus par chacune de ces deux méthodes peuvent être différents ; selon le choix et conditions physiologiques des microorganismes, la période de l'exposition du microorganisme à l'HE, aux doses d'HE utilisées, le choix de l'émulsifiant pour solubiliser les HE. Soit autant de facteurs pouvant expliquer parfois les résultats contradictoires des différentes études.

Conclusion et perspective:

Cette thèse a pour objectif de contribuer à une meilleure gestion et protection de l'environnement par la valorisation des ressources végétales (huiles essentielles) et s'inscrit dans une démarche de développement durable.

Plusieurs étapes, souvent dépendantes entre-elles, sont nécessaires pour caractériser complètement ces huiles essentielles et ces extraits végétaux : la détermination de la composition chimique, la mise en évidence d'une éventuelle spécificité, le contrôle de la qualité, la valorisation de co-produits d'extraction, la recherche de modes d'extraction plus respectueux de l'environnement (chimie verte).

Les huiles essentielles et les extraits se présentent sous la forme de mélanges complexes. Cette complexité résulte de la diversité structurale et fonctionnelle des constituants qui paradoxalement sont construits à partir de la même entité (synthon isoprénique).

Les étapes de notre travail consiste à :

1. l'extraction des huiles essentielles des trois espèces choisies par trois méthodes différentes:
 - a-L'hydrodistillation pour la cannelle
 - b-L'expression à froid pour le citron
 - c-L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau saturé pour le thym,
2. Analyse quantitative (par dosage volumétrique) et qualitative (par CG/SM et FTIR),
3. Détermination de quelques caractères physico chimiques : indice de densité, indice de réfraction et l'indice de fusion ou d'ébullition,
4. Enfin l'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH, et l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur milieu gélosé (aromatogramme) de ces huiles.

Selon nos résultats, nous avons conclu donc que l'huile essentielle de du thym et de la cannelle peuvent être utilisée en qualité d'antimicrobienne efficace dans le traitement des mycoses cutanées.

Nous pouvons dire aussi que les extraits des espèces étudiées ont une bonne activité antioxydante et une capacité de piégeage de radicaux libres. Cette analyse trouve une importante application dans l'industrie pharmaceutique comme elle peut trouver aussi une application dans l'industrie alimentaire.

Les plantes aromatiques et médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale.

Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative être liés à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour.

Références bibliographiques.

1. Adams RP. (1989). Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press N.Y. Inc. 302 p.
2. Adams RP. (2001). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL.
3. Adio AM, Paul C, Kloth P et Konig WA. (2004). Sesquiterpenes of the liverwort *Scapania undulate*. *Phytochem.* 65: 199-206.
4. AFNOR NF T-75- 111, 112 & 202 : (Association Française de Normalisation, Norme). « Huiles essentielles ». Paris, France.
5. AFNOR. (2000). Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. Paris, 440 p.
6. Aghel N, Yamini Y, Hadjiakhoondi A et Mahdi Pourmortasavi S. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium L.* essential oil. *Talanta.* 62, p : 407-411.
7. Agnihotri A, Khatoun S et Shanta M. (2003). Pharmacognostical evaluation of an antioxidant plant-Acorus calamus linn. *Nat. Prod. Sci.* 9(4)264-269.
8. Agnihotri S et Vaidy AD. (1996). A novel approach to study antibacterial properties of volatile components of selected Indian medicinal herbs. *Indian J Exp Biol* 34(7): 712–5.
9. Aiache J.M, Aiache S et Renoux R. (1989-2001). Initiation à la connaissance du médicament- Préface du Pr Y. Cohen. 4ème édition 220-225. © Masson, Paris, Masson S.A – 120, bd Saint- Germain. 75280 Paris Cedex 06. 337p.
10. Alcamo E. (1997). Fundamentals of microbiology (5ème edition): *The fungi*- Adison Wilsey Longman Inc; pp 429-461.
11. Amarti F, Satrani B, Aafi A et al. (2008) Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie* 6: 342–7.
12. Amarti F, Satrani B, Ghanmi M et al. (2010) Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* et *Thymus ciliatus* du Maroc. *Biotechnol Agron Soc Environ* 14(1): 141–8.
13. Anton R et Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522p.

14. Bardeau F. (2009). Les huiles essentielles : Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Editions Lanore, 315.
15. Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.
16. Baser KHC, Kirimer N, Tumen G et Duman H. (1998). Composition of the essential oils of *Thymus canaoviridis* Jasas. *J Essent Oil Res* 10: 199–200.
17. Baser KHC, Ozek T, Tumen G. (1992) Essential oils of *Thymus cariensis* and *Thymus haussknechtii*, two endemic species in Turkey. *J Essent Oil Res* 4: 659–61.
18. Basil A, Jimenez-carmonna M. M. et Clifford A.A. (1998). Extraction of rosemary by super heated water. *Journal of food chemistry*.46, p : 5205-5209.
19. Bekhechi C, Atik-Bekkara F et Abdel Ouahid D.E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6, 153-159.
20. Belaiche P. (1991). Encyclopédie des médecines naturelles. Section C –Aromathérapie.
21. Belletti N, Nidagijimana M, Sisto C, Guerzoni M.E, Lanciotti R et Gardini F. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of Citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52 (23), 6932-6938.
22. Benjelali B, Tantaoui E.A. et Esmaili-Alaoui M. (1986). Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 20, 155-167.
23. Benjelali B, Hammouni M, M'Hamedi A et Richard H (1987a) Essential oil composition of different Moroccan thyme varieties: principal component analysis. *Sci Aliments* 7: 275–99.
24. Benjelali B, Hammouni M, Richard H (1987b) Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils: compounds characterization. *Sci Aliments* 7: 77–91.
25. Benzie I. F., Strain J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
26. Berger M.M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. (20) : 48-53.
27. Besombes C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de Doctorat de l'Université de la Rochelle*. France.

28. Bézanger L, Pinkas M, Trotin F et Torck. M. (1980). Les plantes médicinales des régions tempérées. 1 Vol. 440p, Éd. Maloine, Paris.
29. Bhaskara RMV, Angers P, Gosselin A et Arul J. (1998). Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry* 47(8): 1515–20.
30. Bilia AR, Flamini G, Taglioli V, Morelli I et Vincieri FF. (2002). GC-MS analysis of essential oil of some commercial Fennel teas. *Food Chem.* 76 : 307-310.
31. Biocchio E. (1985). *Parfum Cosmét. Arômes.*, 63, 61-68.
32. Blois M.S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* 1958, 181, 1199-1200.
33. Boelens M. H. (1991). A critical review on the chemical composition of Citrus oils. *Perfum Flavor*, 16(2), 17-34.
34. Born Max et Wolf Emil. (1993) *Principles of optics: Electromagnetic theory of propagation interference and diffraction of light*, Pergamon Press, 6^e éd.
35. Bouhdid S, Idaomar M, Zihi A, et al. (2006). Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès international de biochimie, 9–12 mai 2006, Agadir, Maroc.
36. Bourrel C. (1993). Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, France.
37. Bousbia N. (2004). Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option *Sciences Alimentaires*, INA. Algérie.
38. Bouzouita N, Kachouri F , Ben Halima M et Chaabouni M. (2008). Composition chimique et activités: antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
39. Brand-Williams W, Cuvelier M.E, Berset C.(1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
40. Brantner AH, Pfeifhofer HW, Ercegovac O, et al. (2005). Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus bracteosus* Vis. ex Benth. *Flav Frag J* 20(6): 596–600.
41. Brouta F, Descamps F, Losson B et Mignon B. (2001). Données récentes sur la pathogénèse de l'infection à *Microsporium canis* chez les carnivores domestiques- *Ann. Méd. Vét* ; Vol. 145 ; pp 236-242.

42. Bruneton J. (1993). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, (2^{ème} édition). Technique documentation, Paris. p 406, 410,915.
43. Bruneton J. (1995). Phytochimie des plantes médicinales.
44. Bruneton J. (1999). Pharmacognosie- Phytochimie- Plantes médicinales. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120 p.
45. Burt S.A. (2004a). Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods. *International Journal of Food Microbiolog*, 94 (3), 22-25.
46. Burt S.A. (2004b). Des huiles essentielles, leurs propriétés antibactériennes et applications dans les aliments-Un examen. *Journal International de Microbiologie des Aliments*, 94, 223- 253.
47. Busatta C, Vidal R.S, Popiolski A.S, Mossi A.J, Dariva C, Rodriguez M.R.A, Corazza M.L, Vladimir O.J. et Cansian R.L. (2008). Appliication of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, 25, 207-211.

48. Caccionni D, Guizzardi M, Biondi D, Agantio R et Guisepe R. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on penicillium digitatum and penicillium italicum. *International J. Food Microbiol.* 43(12), 73- 79.
49. Caillet S et Lacroix M. (2007). Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA). P : 1- 8.
50. Cavaleiro C. (2001). Oleos essenciais de *Juniperus* de Portugal. Thèse de Doctorat, Université de Coimbra, Portugal.
51. Celikel N et Kavas G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Science*, 26, 174-181.
52. Chaumont J.P, Leger D. (1989). Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisin. Relation structure –activité. *Plant Med. Phyto.* 23(2), 124-126.
53. Chemat F, Abert Vian M et Dangles O. (2007) *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 1.
54. Chericoni S, Flamini G, Campeol E, Cioni PL et Morelli I. (2004). GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. *Biochem Syst Ecol.* 32 : 423-429.
55. Chiej R. (1982). Les plantes médicinales. Edition Solar.
56. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totte J, Pieters L et Vlietinck A.J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 213-220.
57. Clevenger JF. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *J Am Pharm Assoc* 17: 346–1.
58. Coleman WM et Lawrence BM. (1997). A comparison of selected analytical approaches to the analysis of an essential oil. *Flav Fragr J* 12: 1-8.
59. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisanol B, et al. (1999). In vitro anti-microbial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol* 29(2): 130–5.
60. Couderc V.L. (2001). Toxicité des huiles essentielles. Thèse de grade Docteur Vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse, 61 p.

61. Cox S.D, Mann C.M, Markham J.L, Bell H.C, Gustafson J.E, Warmington J.R et Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobialaction of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170 – 175.
62. Cristiani M, D'arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro M.G, et Micieli D. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6300-6308.
63. Cruz T, Cabo MP, Cabo MM, et al. (1989). In vitro antibacterial effect of the essential oil of *Thymus longiflorus* Boiss. *Microbios* 60: 59–61.
64. Cu J.Q. (1990). Extraction de compositions odorantes végétales par divers solvants organiques. Thèse de l'Institut Nationale Polytechnique. Toulouse, France.
65. Culmann P. (1901). Nouveaux réfractomètres. *J. Phys. Theor. Appl.* 10, 691-704.
66. Cuminet J. (1999). Les carcinomes annexiels cutanes a propos de 17 cas ; Thèse de doctorat d'etat en medcine ; Faculté de medcine Cochin Port-Royal ; université Rene Descartes.

D

67. D'andreta C. (1969). Les plantes médicinales. Diffusé en Suisse par édition Batelier, Paris.
68. Daferera DJ, Ziogas BN et Polissiou MG. (2000). GC-MS Analysis of essential oil from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J Agric Food Chem* 48: 2576–81.
69. Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek T.A et Linssen J.P.H. (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food and Agriculture*. 77(1), p: 140-146.
70. De Billerbeck V.G, Roques C, Vaniere P et Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huile essentielle. *Hygiène* (Revue officielle de la société française d'hygiène hospitalière), 10, 248-251.
71. De Billerbeck V.G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques – Phytothérapie ; Vol. 5 ; pp 249–253.
72. De Gaulejac Saint-Cricq, Provost N et Vivas N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 425-431.
73. Degim T. (2005). Understanding skin penetration: computer aided modeling and data interpretation; *Current Computer-Aided Drug Design*; Vol. 1; pp 11-19.
74. Delaquis P.J, Stanich K, Girard B et Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, *cilantro*, *coriander* and *eucalyptus* essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 74 (1-2), 101-109.
75. Deng C, Yao N, Wang A et Zhang X. (2005). Determination of essential oil in a traditional Chinese medicine, *Fructus amomi* by pressurized hot water extraction followed by liquidphase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. P : 236-237.
76. Denny F.K. (1988). *Dev. Food Sci.* 18, 85-95.
77. Descargues P, Deraison C, Bonnart C et Hovnanian A. (2005). Syndrome de Netherton : un modèle d'étude de la régulation de la desquamation- *Médecine Sciences* ; Vol. 21 ; N°5; pp 457-458.
78. Djabou N. (2006). *Sambucus Nigra* L., une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord africaine - Thèse de Magistère en chimie, université Abou-Bekr Belkaid ; Tlemcen.
79. Djenane D, Meddahi A et Roncales P. (2006). Les systèmes antioxydant et antimicrobien pour la conservation de la viande. *Sciences des Aliments*, 26, 37-73.

80. Djenane D, Sánchez-Escalante A, Beltrán J.A et Roncalés P. (2002). Ability of α -tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 76, 407- 415.
81. Djenane D, Yangüela J, Montañés L, Djerbal M et Roncalés P. (2011b). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja Montana essential* oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media; efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, 22, 1046-1053.
82. Dorantes L, Colmenro R, Hernandez H, Mota L, Jaramillo M.E, Fernandez E et Solano C. (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal Food Microbiology*, 57, 125-128.
83. Dorman H.J.D et Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2), 308-316.
84. Dugo G et Di Giacomo A. (2002). Citrus: the genus Citrus. Medicinal and aromatic plants- Industrial profiles. CRC Press Taylor and Francis group, 642 p.

E

- 85.** El Ajjouri M, Ghanmi M, Satrani B, et al. (2010). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth contre les champignons de pourriture du bois. Acta Botanica 2: 285–94.
- 86.** El Ajjouri M, Satrani B, Ghanmi M, et al. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm et Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. Biotechnol Agron Soc Environ 12 (4): 345–51.
- 87.** Elberling J et Skov PS. (2007). *Increased release of histamine in patients with respiratory symptoms related to perfume*. Clin Exp Allergy. Nov, 37 (11): 1676-80.
- 88.** Examen mycologique en dermatologie. (2005). Ann Dermatol Venereol; Vol.132; pp 889-104.
- 89.** Eymard S. (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus*), choix des procédés. Thèse de Doctorat en Génie des procédés (Ecole Doctorale en Génie des Procédés: Spécialité Biochimie. Nante. France.

F

90. Feistel R et Wagner W. (2006). « A New Equation of State for H₂O Ice Ih [archive] ».
91. Feuilhade M, Bazex J, Claudy A et Roujeau J.C. (2002). Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques. Infections à dermatophytes de la peau glabre, des plis et des phanères- *Ann Dermatol Venereol* ; Vol. 129; pp 2S58-2S64.
92. Fisher K et Phillips C. (2008). Potentiel antimicrobien des huiles essentielles dans les aliments : est-ce la réponse ? Une revue. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156-164.
93. Fisher K, Rowe C et Phillips C. (2007). La survie de trois souches de *Acrobacter butzleri* en présence d'huiles essentielles de citron, d'orange et de bergamote et de leurs composants *in vitro* et dans les aliments. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 495-499.
94. Fuselli R, Susana B, Garcia D.L.R, Martin J et Rosalia F. (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des essences de citron sur le pathogène bactérien de la larve d'abeille *Paenibacillus larvae*, l'agent causal de la maladie américaine de la larve. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2067-2072.

G

- 95.** Ganou L. (1993). Contribution a l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielle. Thèse de l'INP Toulouse, France.
- 96.** Garnero J. (1991). Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Edition Techniques. Encycl. Méd. Nat. (Paris, France), Phytothérapie, Aromathérapie, C-2, p. 2-15.
- 97.** Garnero M.J. (1977). Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles *in* Parfumes cosmétiques, arômes .14, p : 31-40.
- 98.** Gergis V, Spiliotis V et Poulos C. (1990). Antimicrobial activity of essential oils from Greek sideritis species. *Pharmazie* 45: 70.
- 99.** Glordani R et Kaloustian J. (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques- *Phytothérapie* ; Vol. 3 ; pp 121–124.
- 100.** Guenther E. (1975-1977). The essential oils Volumes II, IV and VI. Robert E Krieger Publishing.
- 101.** Guerin-Fauble V et Carret G. (1999). L'antibiogramme, principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées Nationales GTV- INRA, 5-12.
- 102.** Guillen MD et Manzanos MJ. (1998). Composition of the extract in dichloromethane of the aerial parts of a Spanish wild growing plant *Thymus vulgaris* L. *Flav Frag J* 13(4): 259–62.

- 103.**Haddouchi F, Lazouni h, Ahammer K.A, Carson C.F et Riley T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990.
- 104.**Hadef Y. (2004). composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *thymus vulgaris L* et *thymus numidicus* (Poiret) de l'Algérie, 5, 12.
- 105.**Hamoir J, Goret M, Mignon B et Gustin P. (2001). Actualité sur les antifongiques enregistrés en Belgique dans le cadre du traitement des dermatophytoses chez les carnivores domestiques- Ann. Méd. Vét ; Vol. 145 ; pp 226-232.
- 106.**Hart T et Shears P. (1997). Atlas de poche de microbiologie Médecine-Sciences-Flammarion 4, rue, Casinir-Delarigne, 75006 PARIS ISBN : 2-257-10125-1.
- 107.**Hatzidimitriou Ef, Nenadis N et Tsimidou M.Z. (2007). Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry*, 105, 1504-1511.
- 108.**Hayakawa R. (1987). Depigmented contact dermatitis due to incense. *Contact Dermatitis*, 16, 272-274.
- 109.**Hazzit M, Baaliouamer A, Verissimo AR, et al. (2009). Chemical composition and biological activities of Algerian thymus oils. *Food Chem* 116: 714–21.
- 110.**Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*sardina pilchardus*): 1.
- 111.**Hua Li, Xiaoyu Wang, Peihong Li, Yong Li, Hua Wang. (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6), 67-73.
- 112.**Huang D, Ou B et Prior R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- 113.**Hudaib M, Speroni E, Di Pietra M et Cavrini V. (2002). GC/MS ecaluation of thymus (*Thymus vulgaris L.*) oil composition and variations during during the vegetative cycle. *J. Pharma. Biom. Analysis*. 29(4), 691-700.
- 114.**Hulin A, Deguillaume A.M, Bretagne S et Bézie Y. (2005). Bon usage des antifongiques dans letraitement des candidoses et aspergilloses invasives - *J Pharm Clin* ; Vol.24 N°3; pp 125-38.

I

- 115.**Inouye S et Abe S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse-Phytothérapie ; Vol. 1; pp 2-4.
- 116.**Inouye S, Takizawa T et Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565-573.
- 117.**Iserin P, Masson M, Restellini J.P, Ybert E et Moulard F. (1996). Encyclopédie des plantes médicinales ; Identifications, Préparations, Soins. Ed : Larousse-Bordas pour l'édition originale en langue française, France. 335 p.

J

- 118.**Jaset-Dongmo P.M, Tatsadjieu N.L, Tchinda Sonwa E, Kuate J, Amvam Zollo P.H et Menut C. (2008). Antiradical potentiel and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4045-4050.
- 119.**Jeannot V, Chahboun J, Russell D et Baret P. (2005). Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium L. ssp. aurantium*). *International Journal of Aromatherapy*, 15 (2),94-97.
- 120.**Jennings W et Shibamoto T. (1980). Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography, Jovanovich H.B. Ed., Academic Press, New York.
- 121.**Joulain D et König WA. (1998). *The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*: E.B.-Verlag, Hamburg.
- 122.**Joulain D, (1994) Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, 19, 5-17.
- 123.**Juven BJ, Kanner J, Schved F et Weiss-lowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 76: 626-31.

K

- 124.** Kabouche A, Kabouche Z et Bruneau C. (2004). Analysis of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret) from Algeria. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL Flavour Fragr. J.* 20: 235–236.
- 125.** Kalembe D et Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
- 126.** Karaman S, Digrak M, Ravid UA et Ilcim A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J Ethnopharmacol* 76: 183–6.
- 127.** Kelen M et Tepe B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology*, 99, 4096-4104.
- 128.** Kim N.S et 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*. 98, p : 31-47.
- 129.** Koba K, Sanda K, Raynaud C, Nenonene Y.A, Millet J et Chaumont J.P. (2004). Activities antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp.* Vis-à-vis des germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, 202-206.
- 130.** Koedam A. (1982). The influence of some distillation conditions on essential oil composition in aromatics plants: basic and applied aspects. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands. 229-236.
- 131.** Koedam A. (1987). Some aspects of essential oils preparation in capillary gas chromatography in essential oils analysis. Ed. P. Sandra, C. Bicchi. Herdelberg. New York.
- 132.** Kuda T, Iwai A et Yano T. (2004). Effect of red pepper *Capsicum annum var.* conides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. *Food Chemistry Toxicology*, 42, 1695-1700.
- 133.** Kulevanova S et Panovska TK. (2002). Inhibition of thermal autooxidation of lard by antioxidative action of *Thymus* extracts. *Acta Pharm* 52: 29–35.
- 134.** Kurita N, Miyaji M, Kurane R et Takahara Y. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem.* 45(4), 945.
- 135.** Kurita N, Miyaji M, Kurane R, Takahara Y et Ichimura K. (1979). Antimicrobial activity of dalmatian sage oil from different regions of the Yugoslav Adriatic coast. *Agric. Biol. Chem.* 43 (11), 2365.

L

- 136.**Lagunez Rivera L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse. P : 15-35.
- 137.**Lai PK et Roy J. (June 2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Curr Med Chem*; 11(11):1451-60.
- 138.**Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P et Nychas GJE. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 91: 453–62.
- 139.**Langenheim J.H. (1969). Amber: a botanical inquiry. *Science*. 163(872), 1157-1169.
- 140.**Laplante A. (2002). Mécanismes de réépithélialisation de plaies cutanées : expression des protéines de stress chez la souris et analyse à l'aide d'un nouveau modèle tridimensionnel humain développé par génie tissulaire- Thèse de doctorat ; université Laval.
- 141.**Le Hir A. (1981). Abrégé de pharmacie galénique 3e édition p: 346 Préface du Pr Y. Cohen. © Masson, Paris, Masson S.A – 120, bd Saint Germain. 75280 Paris Cedex 06.
- 142.**Le monde de la nature. (1978). (L'univers en couleurs, Larousse).
- 143.**Legrand G. (1993). Manuel de préparateur en Pharmacie. Masson, Paris.
- 144.**Lehucher-Michel M.P, Lesgards J.F, Delubac O, Stocker P, Durand P et Prost M. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. (30) : 1076-1081.
- 145.**Liang YZ, Xieb P et Chan K. (2004). Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B*, 812: 53-70.
- 146.**Loziene K, Vauciunine J et Venskutonis P. (1998). Chemical composition of the essential oil of creeping thyme (*Thymus serpyllum* L.) growing wild in Lithuania. *Planta Med* 64: 772–3.
- 147.**Lu F et Foo L.Y. (2001). Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197-202.
- 148.**Luicita. lagunez rivera. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- 149.**Luque de Castro M.D et Jiménez-Carmona M.M. (1998). Conventional techniques for the isolation of valuable essential oils. *Trends Anal. Chem.* 17, p : 441.

- 150.**Madhavi D. L, Deshpande S. S et Salunkhe D. K, (1996). Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. P : 65.
- 151.**Mahmoudi Y. (1994). La thérapeutique par les plantes médicinales en Algérie. Edition : palais du livre Blida.
- 152.**Malecky M. (2007). Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de Doctorat de l'institut des Sciences et Industries du Vivant et de l' Environnement* (Agro. Paris,Tech.).
- 153.**Mangena T et Muyima N.Y.O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *artemisia afra*, *pteronia incana* and *rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Appli. Microbiol.* 28(4) 291-296.
- 154.**Mann C.M et Markham J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 538-544.
- 155.**Marc Fr, Davin A, Deglene-Benbrahim L, Ferrand C et al. (2004). Methodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit, M/S : médecine sciences*, 20(4), 458-463.
- 156.**Marino M, Bersani C et Comi G. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a biopedometric method. *J Food Prot* 62: 1017–23.
- 157.**Martinez-Sosa M.A. (1981). Thèse de l'Institut National de Sciences Appliquées. Toulouse France.
- 158.**Masada Y. (1976). Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry, John Wiley & sons, New York.
- 159.**Mc Lafferty FW et Stauffer DB. (1994). Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th ed., Mass spectrometry library search system BenchTop/PBM, version 3.10d. Palisade Co.: Newfield.
- 160.**Mejlholm O et Dalgaard P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27-31.
- 161.**Meynadier J.M et Raison-Peyron N. (1997). *Allergie aux parfums*. Re. Fr. Allergol., 37 (5), 641-650.
- 162.**Miguel G, Simões M, Figueiredo AC et al. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititus*, *Thymus camphoratus*, and *Thymus mastichina*. *Food Chem* 86: 183–8.

- 163.** Minh Tu N.T, Thank L.X, Une A, Ukeda H et Sawamura M. (2002). Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and limepeel oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 169-174.
- 164.** Miura K et Nakatami N. (1989). Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Agric Biol Chem* 53: 3043–5.
- 165.** Mohammedi Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister. Option : Produits naturels, activité biologique et synthèse. Faculté des Sciences. Université ABB. Tlemcen. Algérie.
- 166.** Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211-219.
- 167.** Morin P et Richard H. (1985). thermal degradation of linalyl acetat during steam distillation inproc., 4 Fh Weurman Flav. Res. Symp. Elsevier Science. Publ. B.V. Amsterdam., pp 563-576.
- 168.** Moufida S et Marzouk B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62 (8), 1283-1289.
- 169.** Multon J.L. (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique & Documentation, Paris Apria. Volume 1, 576p.

- 170.**Näf R. (1992). La préparation d'extraits, une étape cruciale dans l'analyse des arômes. *Analisis Magazine*, France, v 20, n° :7.
- 171.**Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M et Hara Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md*, 21(6), 895-902.
- 172.**Nenadis N et Tsimido M. (2002). Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(12), 1191-1195.
- 173.**Nielsen PV et Rios R. September (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *Int J Food Microbiol*, 25;60(2-3):219-29.
- 174.**Nikoh N, Iwabe N, Kuma K.I et Miyata T. (1994). Phylogenetic relationship of the kingdoms of Animalia, Plantae, and Fungi, inferred from 23 different protein species- *Mol Biol Evol*; Vol. 11; pp 762-768.
- 175.**Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M et Ohta H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissue of citrus species. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70(1), 178-192.

- 176.**Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z et Naghdibadi H. (2007). Antifungal activity of tyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18, 1518-1523.
- 177.**Optical Society of America, *Handbook of optics*. (2009). vol. I à V, Mc Graw-Hill Professional, novembre, 3^e éd, 5600 p.
- 178.**Ouraini D, Agoumi L A, Ismaili-Alaoui M, Alaoui K, Cherrah Y, Amrani M et Bellabas M.A. (2005). Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, 4,147-157.
- 179.**Ouraini D, Agoumi A, Alaoui M.I, Alaoui K, Cherrah Y, Alaoui M.A et Belabbas M.A (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques– *Phytothérapie* ; Vol.1 ; pp 6–14.
- 180.**Oussalah M, Caillet S, Saucier L et Lacroix M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), 1046-1055.
- 181.**Oussou K.R, Coffi K, Nathalie G, Seriyolou, Gerard K, Mireille D, Yao T.N, Gilles F et Jean-Claude C.H. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. *Comptes Rendus de Chimie*, 7, 1081-1086.

- 182.** Panizzi L, Flamini G, Cioni PL et Morelli I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oil of four Mediterranean Lamiaceae. *J Ethnopharmacol* 39: 167–70.
- 183.** Paolini J. (2005). caractérisation des huiles essentielles par cpg/ir, cpg/sm-(ie et ic) et rmn du carbone-13 de *cistus albidus* et de deux asteraceae endémiques de Corse : *eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* et *doronicum corsicum*, 5,6.
- 184.** Papageorgio V. (1980). GLC-MS Computer analysis of the essential of *Thymus capitatus*. *Plant Med Supplement*: 29–33.
- 185.** Paris R.R et Moyse. H. (1976). Précis de matière médicale, Tome1, deuxième édition, Masson, Paris.
- 186.** Paris R.R et Moyse. H. (1980). Abrégé de matière médicale, Pharmacognosie, Tome 1, Maison éd, Paris.
- 187.** Pauli A. (2001). Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, 11, 126-133.
- 188.** Paupardin C, Leddet C et Gautheret R. (1990). Genetics, selection and multiplication. Improvement of *Artemisia* species (*Artemisia ubelliformis* and *E. genipi*) by meristem culture. *J. Jap. Bot.* 65, 33.
- 189.** Pavida D.L, Lampman G.M et Kriz G.S. (1976). Introduction to organic laboratory techniques. W.B. Saunders Co. Philadelphia, USA. 567-573.
- 190.** Pellecuer J, Jacob M, Simeon de Buechberg M et Allegrini J. (1980). Therapeutic value of cultivated mountain savory (*Satureia Montana* L). *Acta Horti* 96: 35–9.
- 191.** Pellecuer J, Roussel J.L et Andary C. (1980). Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. *Rivista Italiana Essenzo (EPPOS)*. 23,45-50.
- 192.** Pharmacopée Française, IX ème édition.
- 193.** Pibiri M-C. (2006). assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, *Thèse de Doctorat de l'institut des infrastructures, des ressources et de l'environnement*. Ecole polytechnique fédérale de lausanne.
- 194.** Pingot A. (1998). Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 230- 236.
- 195.** Ponce A.G, Fritz R, Del Valle C et Roura S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 679-684.
- 196.** Poole K. (2001). Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 500-508.

197.Popovici C, Saykova I et Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH Revue de génie industriel, 4, 25-39.

198.Prabuseeninivasan S, Jajakumar M et Ignacimuthu S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils; BioMed Central Complementart and Altemative Medicine, Vol. 6, N° 39.

199.Prasad R et Kapoor K. (2004). Multidrug resistance in yeast Candida- Int. Rev. Cytol; Vol.242; pp 215-248.

200.Prudent D, Perineau F, Bessiere J.M, Michel G.M et Baccou J.C. (1995). Analysis of th essential oil of with oregano evaluation of its bacteriostatic and fungistatic propreties. *Journal of Essetial Oil Research*, 7, 165-173.

Q

201.Quezel P et Santa S. (1962). *Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales*. CNRS: Paris, 805–806.

R

- 202.**Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M et Rice- Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- 203.**Rega B, Fournier N, Guichard E et Russell R. (2003). Citrus flavour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 117-133.
- 204.**Rehman S.U, Hussein S, Nawaz H, Mushtaq A.M, Murtaza M.A et Rizvi A.J. (2007). Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. *Pakistanian Journal of Nutrition*, 6 (6), 558-561.
- 205.**Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* ; Thèse de Doctorat National. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar Mehraz -Fès.
- 206.**Ricardo da Silva J.M, Darmon N, Fernandez Y et Mitjavila S. (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 549-1552.
- 207.**Rice-Evans C.A, Miller N.J, Bolwell P.G, Bramley P.M et Pridham J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 1995, 22, 375-383.
- 208.**Richard F. (1992). Manuel des corps gras, Paris, Ed : Lavoisier, Tec. & Doc., p :1228-1242.
- 209.**Richard H et Giampoali P. (1992). Extraits aromatiques et arômes. *Analisis Magazine*, France, v 20, n° :7.
- 210.**Richard H et Peyron F. (1992). Epices et aromates. Ed .Tec & Doc-Lavoisier.Paris.p :339.
- 211.**Ridgway. R. (1994). Le traitement naturel. Asthme. Les éditions Modus Vivendi, Canada.
- 212.**Roberfroid M. (2002). Aliments Fonctionnels. Ed : Lavoisier, Paris, 475p. Alais C., Linden G. et Midlo L., 2003. Biochimie alimentaire. Ed: Dunod, 245 (5) :51-71.
- 213.**Robert A et Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- 214.**Robert-Demuet S. (1995). Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes, 131-137. Montréal-Canada.
- 215.**Roux D. (2008). conseil en aromathérapie, 2 ème édition, pro-officina., 187.

- 216.**Saez F. (1998). Variability in essential oils from populations of *Thymus hyemalis* Lange in southeastern Spain. *J Herbs Spices Med Plants* 5:65–76.
- 217.**Safaei-Ghomi J, Ebrahimabadi AH, Djafari-Bidgoli Z et Batooli H.(2009). GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. *Food Chem* 115: 1524–8.
- 218.**Salah N, Miller N.J, Paganga G, Tijburg L, Bolwell, G.P et Rice-Evans C.A. (1995). Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339-346.
- 219.**Sanchez-Moreno C, Larrauri Jose A et Saura-Calixto F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- 220.**Sanchez-Moreno C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8 (3), 121-137.
- 221.**Sandra P et Bicchi C. (1987). Capillary gas chromatography in essential oil analysis, Huethig, Heidelberg.
- 222.**Satrani B, Ghanmi M, Farah A et al. (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull Soc Pharm (Bordeaux)* 146: 85–96.
- 223.**Scherer R et Godoy H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112, 654-658.
- 224.**Schnuch A et Uter W. (2006). *Untersuchungen der Bedeutung luftgetragener Kontaktallergene bei der Entstehung von Kontaktekzemen*. Umweltbundesamtes.
- 225.**Schuhmacher A et Reichling P. (2003). Virucidal effect of Peppermint oil on the enveloped viruses *Herpes Simplex Virus* type 1 and type 2 *in vitro*. *Phytomedicine*, 10(6-7), 504-510.
- 226.**Se soigner par les plantes. (1999).Berti Edition.
- 227.**Secrets et vertus des plantes médicinales. (1986). (Publié par sélection du Reader's Digest).
- 228.**Seiller M et Martini M.C. (1996). Formes pharmaceutiques pour application locale-TEC&DOC ; 11, rue Lavoisier F75384 ; Paris cedex 08 ; ISBN: 2-7430-0038-4, pp 13.

- 229.** Senatore F, Arnold NA et Piozzi F. (2004). Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon *J Chromatogr A*. 1052 : 237-240.
- 230.** Senatore F, Napolitano F et Ozcan M. (2000). Composition and antibacterial activity of essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 186-189.
- 231.** Sharififar F, Moshafi M.H, Mansouri S.H, Khodashenas M et Khoshnoodi M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 18, 800–805.
- 232.** Sharma N et Tripathi A. (2006). Fungitoxicity of *Citrus sinensis* L. essential oil on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiological and Biotechnology*, 22, 587-593.
- 233.** Sharma Om P et Bhat T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113 (4), 1202.
- 234.** Shaw P.E. (1979). Review of quantitative analysis of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 246-257.
- 235.** Sing R, Marimuthu P, De Heluani C.S et Catalan Ceser A.N. (2006). Antioxidant and biocidal Activities of *Carum nigrum* (seed) Essential oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 174-181.
- 236.** Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T et Arsenakis M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1202-1205.
- 237.** Smith D.C, Forland S, Bachanos E, Matejka M et Barrett V. (2001). Quantitative analysis of citrus fruits extracts by GC/MS: An undergraduate experiment. *Chemical Educator*, 6, 28-31.
- 238.** Soares J.R, Dinis T.C.P, Cunha A.P et Almeida L.M. (1997). Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, (26) : 469–478.
- 239.** Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA et al. (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* 15: 627–34.
- 240.** Sutour S. (2010). Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de corse et de kumquats these pour obtenir le grade de docteur de l'universite de corse discipline : chimie organique et analytique, page 8 ; 9 ; 10, 11, 12, 43.

T

- 241.**Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J et Dommes J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226-1233
- 242.**Taillet R. (août 2006). *Optique physique : Propagation de la lumière*, De Boeck, 323 p.
- 243.**Tassou C.C, Drosinos E.H et Nychas G.J.E. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on Salmonelle Enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4 and 10°C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 593-600.
- 244.**Teixeira-Duarte M.C, Mara Figueira G et Sartoratto A. (2005). Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 305-311.
- 245.**Thiers S et Tasseaul O. (2005). Les cosméceutique : cosmétiques ou médicaments ?- MIDIFAB ; Vol. 3 ; pp 45-56.
- 246.**Tran H.V, Charleux F, Ehlacher A et Ho Ba Tho M.C. (2005). Propriétés mécaniques multicouches de la peau humaine *in vivo* Modèle numérique anatomique- Colloque National en Calcul des Structures.
- 247.**Trombetta D, Castelli F, Grazia SM, et al. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 49(6): 2474–8.
- 248.**Trombetta D, Saija A, Bisignano G, et al. (2002). Study on the mechanisms of the antibacterial action of some α , β -unsaturated aldehydes. *Lett Appl Microbiol* 35: 285–90.
- 249.**Tumen G, Baser KHC, Demirci B et Ermin N. (1998). The essential oils of *Satureja coerulea* Janka and *Thymus aznavouriii* Velen. *Flav Frag J* 13(1): 65–7.

- 250.** Valnet J. (1990). L'aromathérapie. 10^{ème} édition Maloine S.A., pp 64-66 ; 206-212.
- 251.** Vardar-Ünlü G, Candan F et Sökmen A. (2003). Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey var *pectinatus* (Lamiaceae). *J Agric Food Chem* 51: 63–7.
- 252.** Vekiari S .A, Protopapadakis E.F, Papadopoulou P, Papanicolaou D , Panou C et Vamvakias M. (2002). composition and seasonal variation of essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *journal of agricultural and food chemistry* 5 (1), 147-153.
- 253.** Véret C. (2000). Réfractométrie et interférométrie en analyse chimique. *Technique de l'ingénieur. Traité Analyse et caractérisation.* P500-1.
- 254.** Vernin G, Boniface C, Metzger J, Guiglione C, Hammoud A, Suon K-N, Fraisse D et Parkanyl C. (1988). GC-MS-Specma bank analysis of *J. communis* needles and berries. *Phytochem.* 27 : 1061-1064.
- 255.** Vernon F et Richard H. (1976), Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles Vol. 2. In Série synthèses bibliographiques N° 10 – Centre de documentation internationale des industries utilisatrices de produits agricoles. *Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.*
- 256.** Vila R, Freixa B, Canigueral S et al. (1995). Composition and study of the variability of the essential oil and *Thymus funkii* Cosson. *Flav Flag J* 10: 379–83.
- 257.** Villano D, Fernandez-Pachon M.S, Moy M.L, Troncoso A.M et Garcia-Parrilla M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71, 230-235.
- 258.** Viollon C et Chaumont J.P. (1994). Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 128(3), 151-153.
- 259.** Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J et Perezalvarez J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.), essential oils. *Food Control*, 19, 1130-1138.
- 260.** Volak J et Stodola J. (1983). *Les plantes médicinales*, 319 pp.
- 261.** Von Rechemberg C. (1910). *Theorie der gewinnung and trunnung der ätherisschen öle durch destillation.* Selbsverlag Von Schimel. Miltiz bei, Leipzig.

W

- 262.** Wang† L, Ma L, Leng W, Liu T, Yu L, Yang J, Yang L, Zhang W, Zhang Q, Dong J, Xue Y, Zhu Y, Xu X, Wan Z, Ding G, Yu F, Tu K, Li Y, Li R, Shen Y et Jin Q. (2006). Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed equence tags- BioMed Central Genomics; Vol. 7; pp 255.
- 263.** Weisse S. (2002). Complexes cyclodextrines / ester de vitamine A : stabilisation, solubilisation et promotion de l'absorption cutanée - Thèse de doctorat ; université PARIS ; XI série N° 741.
- 264.** Willem J-P. (2006). *Les Huiles Essentielles : Médecine d'Avenir*. Editions du Dauphin.
- 265.** Wolford R.W, Kesterson J.W et Attaway J.A. (1971). Physicochemical properties of citrus essential oils from Florida. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19 (6), 1097-1102.
- 266.** Wright J. (1995). Essential oils. In Ashurst PR (Ed) Food flavorings. Blackie Academic and Professional Edition.

Y

- 267.** Yayi E, Joachin D, Gbenou, Léon A.A, Moudachirou M et Chalchat J.C.C. (2004). *Chimie* 7, 1013–1018.
- 268.** Yi-Zhong Cai, Mei Sun, Jie Xing, Qiong Luo, Harold Corke. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*. (2006), 78(25), 2872-2888.

Z

- 269.** Zakarya D, Fathallah T et Chascrette M. (1993). Use of multifunctional autocorrelation method to estimate molar volumes of alkanes and oxygenated compounds. Comparison between components of autocorrelation vectors and topological indices. *J. Phys. Org. Chem.* 6(10), 574-582.
- 270.** Zambonelli A, D'Aurelio A.Z, Severi A, Benvenuti E, Maggi L et Bianchi A. (2004). Chemical composition and fungicidal activity of comercial essential oils of thymus vulgaris L. *J. Essent. Oil Res* 16(1), 69-74.
- 271.** Zhiri A. (2006). Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News*. Science, Nutrition, Prévention et santé. Edité par la Fondation pour le libre choix, 12, 8.

Webographie

272. Site n° 01 : Les huiles essentielles, [http:// www. tpejbs2012.canalblog.com/archives](http://www.tpejbs2012.canalblog.com/archives). Consulté le: 27/02/2013 à 18H55.

273. Site n° 02 : Une épice pas comme les autres, Mémoire de fin de formation de Phytothérapie Hippocratus, www.hippocratus.com/.../pdf/memoires/mai2011/cannelle.pdf, Xavier RECULEAU-ARNOUD, HIPPOCRATUS – PRIMUM NON NOCERE, LA CANNELLE. Consulté le: 05/01/2013 à 06H50.

274. Site n° 03 : Réfractométrie, [http:// www. fr.org/Réfractométrie](http://www.fr.org/Réfractométrie). Consulté le 04/03/2013 à 22H55.

275. Site n° 04 : (en) [PDF]SPECTROSCOPIE FTIR - BIOPHY RESEARCH www.biophyresearch.com/pdf/ftir.pdf. Consulté le 27/02/2013 à 18H50.

276. Site n° 05: [http:// www. hdl.handle.net/123456789/315](http://www.hdl.handle.net/123456789/315) Appears in Collections. Magister. date de consultation : septembre 2013. Khanfri Nassima, 2012. Optimisation des techniques d'extraction par hydrodistillation et hydrodistillation assistée par microonde de l'huile essentielle de cannelle algérienne : espece poussant en Algérie. Consulté le: 27/09/2013 à 00H55.

277. Site n° 06 : www.Florilab.fr.

278. Site n° 07 : Microbiologie-medicale. http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie_generale/structure_bacterienne. Consulté le 02/04/2014 à 21H00.

279. Site n° 08 : EFFETS DES ANTIBIOTIQUES, [http:// www.antibio2010.e-monsite.com/pages/content/actions-des-antibiotiques-sur-l-organisme/effets-des-antibiotiques](http://www.antibio2010.e-monsite.com/pages/content/actions-des-antibiotiques-sur-l-organisme/effets-des-antibiotiques). Consulté le: 02/04/2014 à 21H15.

CD

280. Encyclopédie Microsoft ® Encarta ® 99. © 1993 - 1998 Microsoft Corporation.

Annexe

ANNAXE 1: STRUCTURE ET MORPHOLOGIE BACTERIENNES

cellule bactérienne

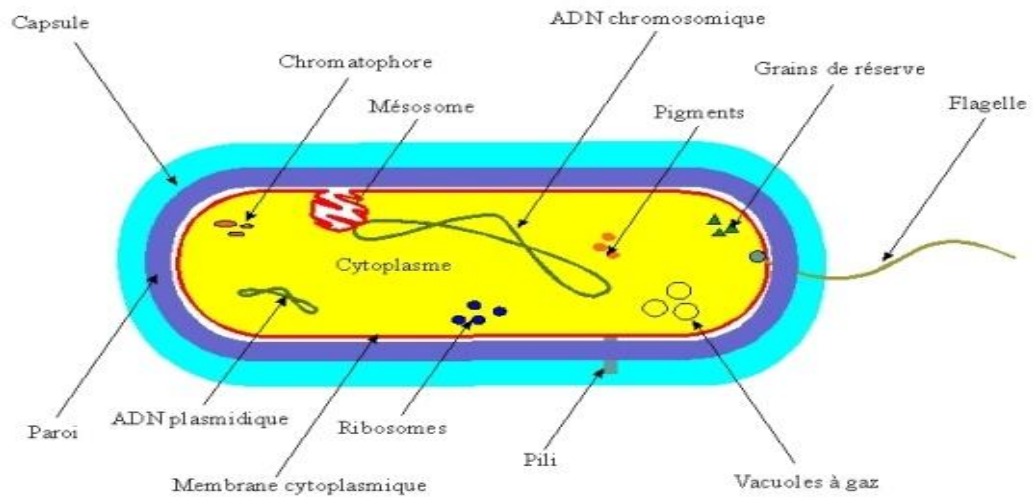
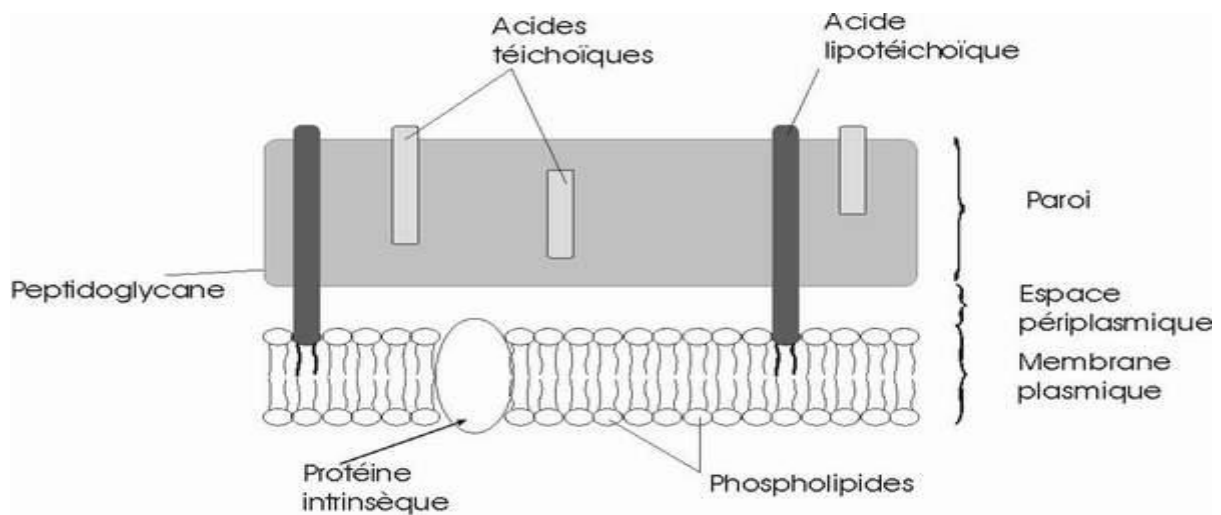


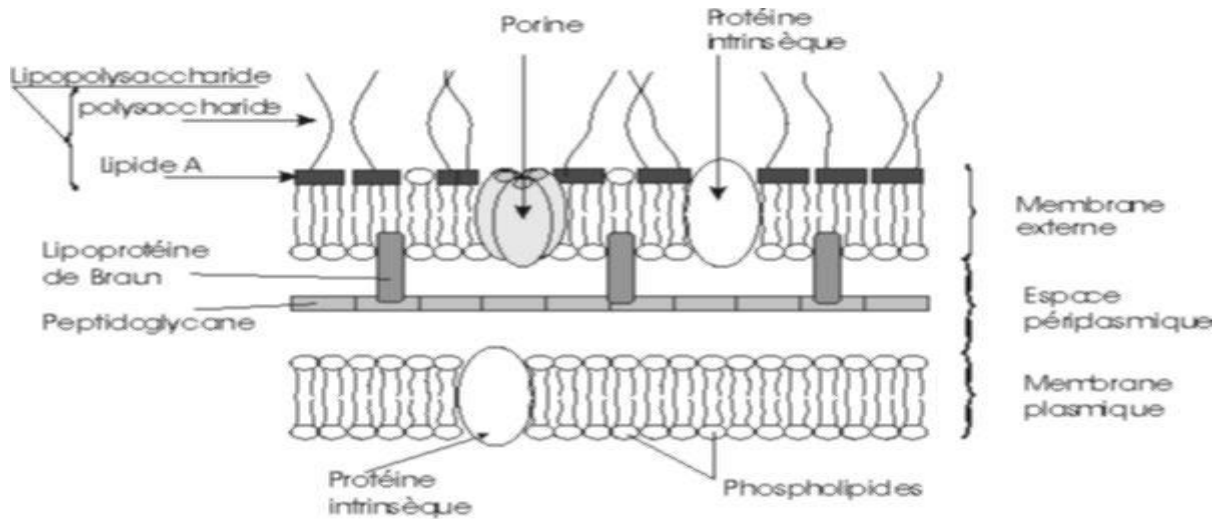
Figure I: Structure et morphologie bactérienne (Site n° 07).



Paroi d'une bactérie Gram positif.

R.Moreda Lycée Lacroix Naborne

Figure II: Structure de la paroi des bactéries à Gram positif (Site n° 07).



Paroi d'une bactérie Gram négatif.

S.M. Moleda lycée saadk Nartonne

Figure III: Structure de la paroi des bactéries à Gram négatif (Site n° 07).

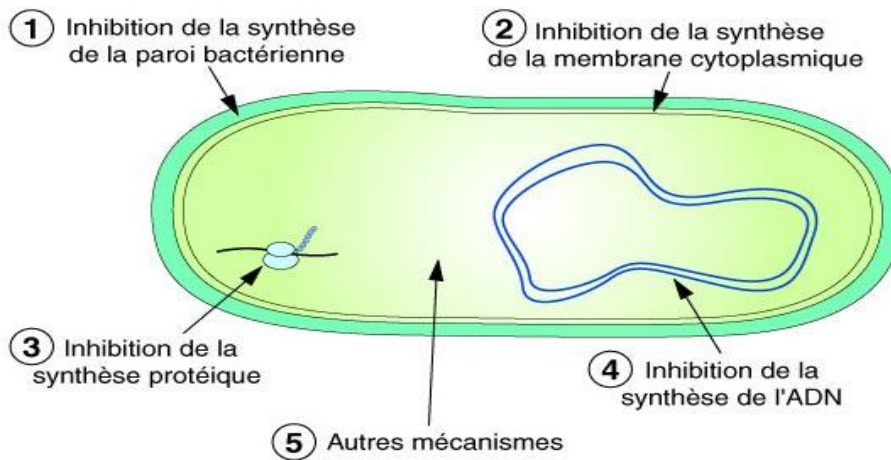
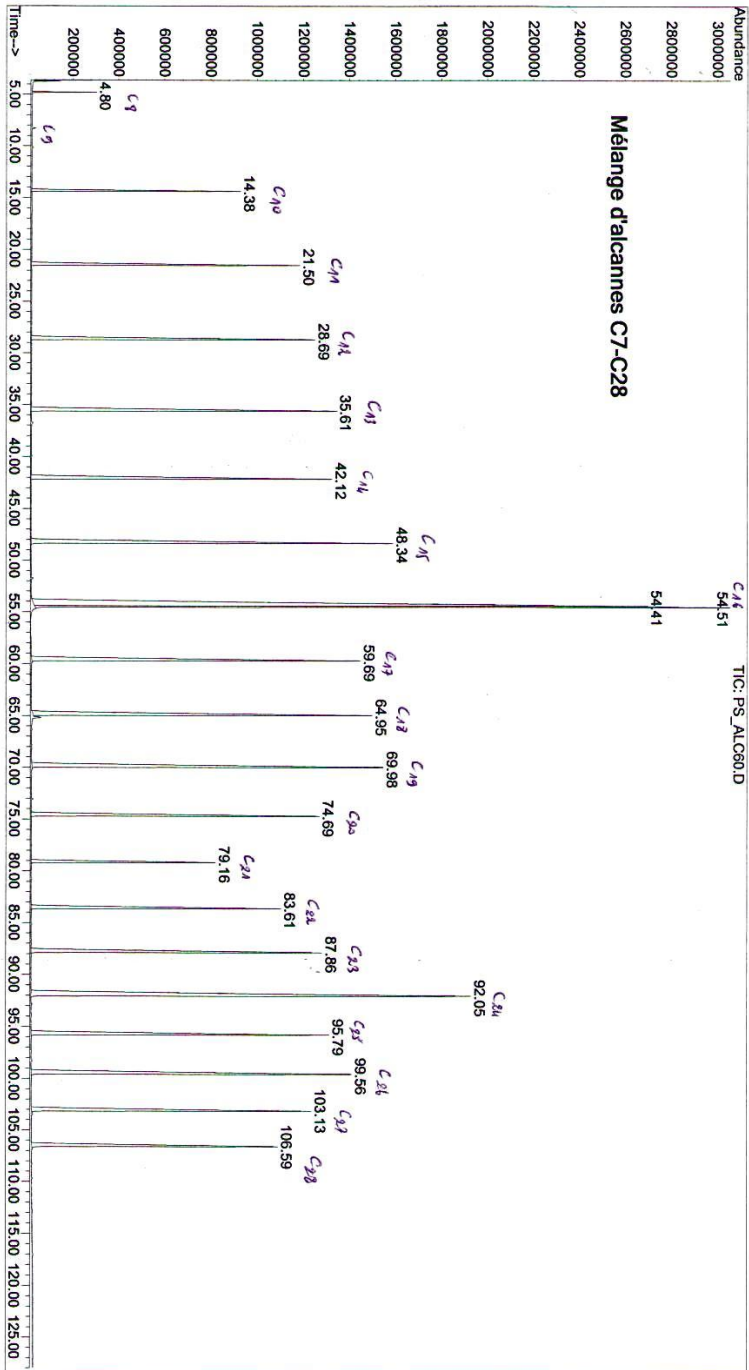
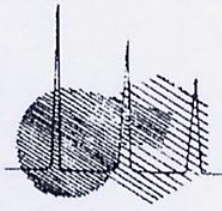


Figure IV: Cibles des antibiotiques (Site n° 08).

File : D:\Spectres de gcms\Prestations\Prestation2013\Pretest annaba2\
 PS_ALC60.D
 Operator :
 Instrument : GC/MS Ins
 Acquired : 31 Jul 2013 5:40 using AcqMethod HE60NS
 Sample Name : 60(8), 27280(10) 0.2 ul split GV 0.5
 Misc Info :





CRAPC

☎ / 📠 : (021) 24 74 06

Ref: 38/PS/CRAPC/2013

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
مركز البحث العلمي والتقني في التحليل الفيزيائي الكيميائي
CENTRE DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
EN ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

C. R. A. P. C.

BP 248 Alger RP 16004 Alger

ALGER, le ... 01 AOUT 2013 ...

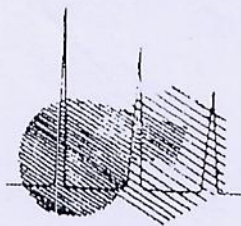
Rapport d'Analyse

Approuvée par le Directeur du CRAPC

مدير مركز البحث العلمي والتقني في التحليل الفيزيائي الكيميائي
في التحليل الفيزيائي والكيميائي
د. بشاري خلدون

Produit : Huile Essentielle de Thym
Numéro de lot : /
Provenance : Particulier d'Annaba
Référence : Méthode interne

TEST	NORMES	RESULTATS
Identification d'un échantillon d'huile essentielle par GC/MS	/	Profil Chromatographique ci-joint.



CRAPC

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
مركز البحث العلمي والتقني في التحليل الفيزيائي الكيميائي
CENTRE DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
EN ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

C. R. A. P. C.

BP 248 Alger RP 16004 Alger

ALGER, le 01 AOUT 2013

☎ / 📠 : (021) 24 74 06

Ref: 39 /PS/CRAPC /2013

Rapport d'Analyse

Approuvée par le Directeur du CRAPC

دبير مركز البحث العلمي والتقني في التحليل الفيزيائي والكيميائي
في التحليل الفيزيائي والكيميائي
م. ب. ب. ك. ف. ك.
يشاري خلدي

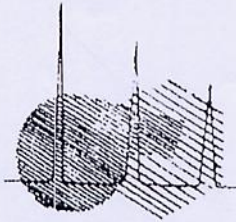
Produit : Huile Essentielle de Citron

Numéro de lot : /

Provenance : Particulier d'Annaba

Référence : Méthode interne

TEST	NORMES	RESULTATS
Identification d'un échantillon d'huile essentielle par GC/MS	/	Profil Chromatographique ci-joint.



CRAPC

RÉPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
مركز البحث العلمي والتقني في التحليل الفيزيائي الكيميائي
CENTRE DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
EN ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

C. R. A. P. C.

BP 248 Alger RP 18004 Alger

01 AOUT 2013

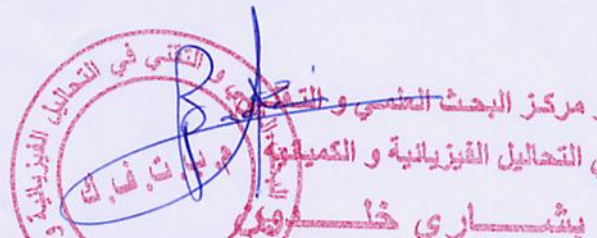
ALGER, le

☎ / 🏠 : (021) 24 74 06

Ref: 40/PS/CRAPC/2013

Rapport d'Analyse

Approuvée par le Directeur du CRAPC



Produit : Huile Essentielle de Camelle

Numéro de lot : /

Provenance : Particulier d'Annaba

Référence : Méthode interne

TEST	NORMES	RESULTATS
Identification d'un échantillon d'huile essentielle par GC/MS	/	Profil Chromatographique ci-joint.

Publication