



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES**

**Projet de Fin d'Etudes**

**Licence Sciences & Techniques**

**Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources**

**Titre**

**Contribution à la valorisation d'une plante aromatique et  
médicinale : cas de *Cupressus azironica***

**Présenté par : Ameggouz Mouna**

**Encadré par :**

**-Mme Meryem Benjelloun ( FST-FES)**

**- Mr Satrani Badr ( c.Rech.For)**

**Soutenu le : 7juin 2018**

**Devant le jury composé de :**

➤ **Mme Mikou**

**Année universitaire**  
**2017/2018**



## Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon tuteur de stage au laboratoire de chimie du Centre de Recherche Forestière de Rabat Monsieur le docteur **SATRANI Badr** pour tout le temps qu'ils m'a consacré, ses directives précieuses, et pour la qualité de son suivi durant toute la période de mon stage.

Mes profonds remerciements vont à mon encadrante à la FSTF Madame le professeur. **BENJELLOUN Meryem** qui a accepté d'encadrer mes travaux durant ces 2 mois de stage.

Mes plus vifs remerciements s'adressent aussi à tout le cadre professoral et administratif de la FSTF et du centre de Recherche Forestière de Rabat.

Mes remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I Plantes aromatiques et médicinales .....	4
I.1 Domaines d'applications .....	4
I.2 Présentation de l'espèce étudiée .....	4
II Huiles essentielles .....	5
II.1 Localisation et lieu de synthèse .....	6
II.2 Rôle physiologique .....	6
II.3 Propriétés physico-chimiques.....	6
II.3.1 Propriétés physiques.....	6
II.3.2 Composition chimique .....	6
II.4 Domaines d'utilisation.....	7
II.5 Méthodes d'extraction .....	7
II.5.1 Hydrodistillation.....	7
II.5.2 Vapo-hydrodistillation .....	8
II.6 Méthodes d'analyses.....	9
II.6.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	9
II.6.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) .....	10
III Activité antimicrobienne .....	10
III.1 Mode d'action.....	10
III.2 Techniques d'étude d'activité antimicrobienne.....	11
III.2.1 Technique de micro- atmosphère .....	11
III.2.2 Technique de dilution en milieu de culture liquide ou gélosé.....	12
MATERIEL ET METHODES	
I Matériel végétal .....	15
II Extraction des huiles essentielles.....	15
II.1 Détermination du taux d'humidité de la plante .....	16
II.2 Calcul du rendement en huile essentielle .....	16
III Analyses des huiles essentielles .....	17
III.1 Chromatographie en phase gazeuse.....	17
III.2 Identification des constituants des huiles essentielle.....	17
IV Méthode d'étude de la bioactivité .....	18
IV.1 Microorganismes étudiés .....	18
IV.2 Activité antimicrobienne .....	19
IV.2.1 Préparation de la solution mère .....	19
IV.2.2 Préparation des dilutions successives de l'huile essentielle.....	19
IV.2.3 Préparation des milieux de culture avec les concentrations finales en huile essentielle.....	20
IV.2.4 Ensemencement et incubation des boîtes de Pétri.....	20
RESULTATS & DISCUSSION	
I Teneur en humidité .....	22
II Rendements en huiles essentielles .....	22
III composition chimique .....	22

IV Activité antibactérienne.....	24
CONCLUSION GENERALE .....	26
Référence bibliographiques .....	27

## INTRODUCTION GENERALE

Le Maroc, de par sa situation géographique, constitue une carte naturelle tout à fait originale offrant une gamme complète de bioclimats méditerranéens et sahariens favorisant une flore riche et variée avec un endémisme très marqué. En outre, la flore vasculaire du Maroc regroupe 155 familles, répartie en 5211 espèces et sous espèces végétales dont 452 sous espèces types autonomes, 872 sous espèces additionnelles et 918 genres. Sur les 5211 espèces et sous espèces existantes 951 (18%) sont endémiques (Zollo et *al.*, 1998).

Au Maroc, les Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) représentent une catégorie importante des produits forestiers non ligneux. Ils englobent une large gamme de produits qui existent à l'état spontané, en forêts et en dehors des forêts et/ou sous forme de cultures. Après avoir été longtemps considérés comme produits secondaires ou menus produits, les PAM ont connu un essor considérable à l'égard de la demande sans cesse accrue du marché international.

De nombreuses PAM rencontrées dans les différentes régions marocaines possèdent bien des vertus thérapeutiques démontrées par des expériences. Cependant, et d'une manière générale, les possibilités de guérir du monde végétal, qu'elles soient affirmées ou potentielles, méritent d'être justifiées par des études scientifiques. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (2003), 80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire. Plus de 20000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée et plus de 50% des produits pharmaceutiques disponibles sur le marché sont d'origine naturelle (Hamilton, 2003).

Le Cyprès (*Cupressus arizonica*) est une plante aromatique et médicinale qui fait partie de la Famille de Cupressaceae. C'est un arbre forestier classique à une extrême longévité. Jusqu'à l'heure actuelle, peu d'études ont concerné l'activité biologique de cette espèce. D'où l'objectif de notre travail est la valorisation de cette espèce à travers l'étude de l'activité antimicrobienne de ses huiles essentielles.

Ce travail sera présenté comme suit :

La première partie sera réservée à une étude bibliographique, comportant un aperçu général sur les plantes aromatiques et médicinales, leurs utilisations, leurs dérivés ainsi que les différentes techniques d'extractions des huiles essentielles, suivies des principales méthodes conventionnelles utilisées pour leurs analyses et leurs pouvoirs antimicrobiens.

La deuxième partie concernant le travail expérimental, il met en évidence les techniques d'extraction et d'analyse des huiles essentielles ainsi que les tests d'activités antimicrobiennes utilisés.

Enfin, dans la troisième partie seront présentés les résultats et discussion et nous terminerons par une conclusion générale et perspectives comme continuation à ce travail.

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



# **I Plantes aromatiques et médicinales**

Les plantes aromatiques et médicinales ont été utilisées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaine, parce qu'elles contiennent des composantes à valeurs thérapeutiques très importante. Récemment, l'adhésion de la médecine traditionnelle comme une forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques actuels a mené des auteurs à étudier l'activité antimicrobienne des PAM.

## **I.1 Domaines d'applications**

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie, et en pharmacie. Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif de l'utilisation des PAM dans les pays développés comme dans les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effets secondaires défavorables. Ainsi, une recherche de nouvelles substances naturelles est un choix normal.

Ces dernières ont été utilisées dans différentes applications :

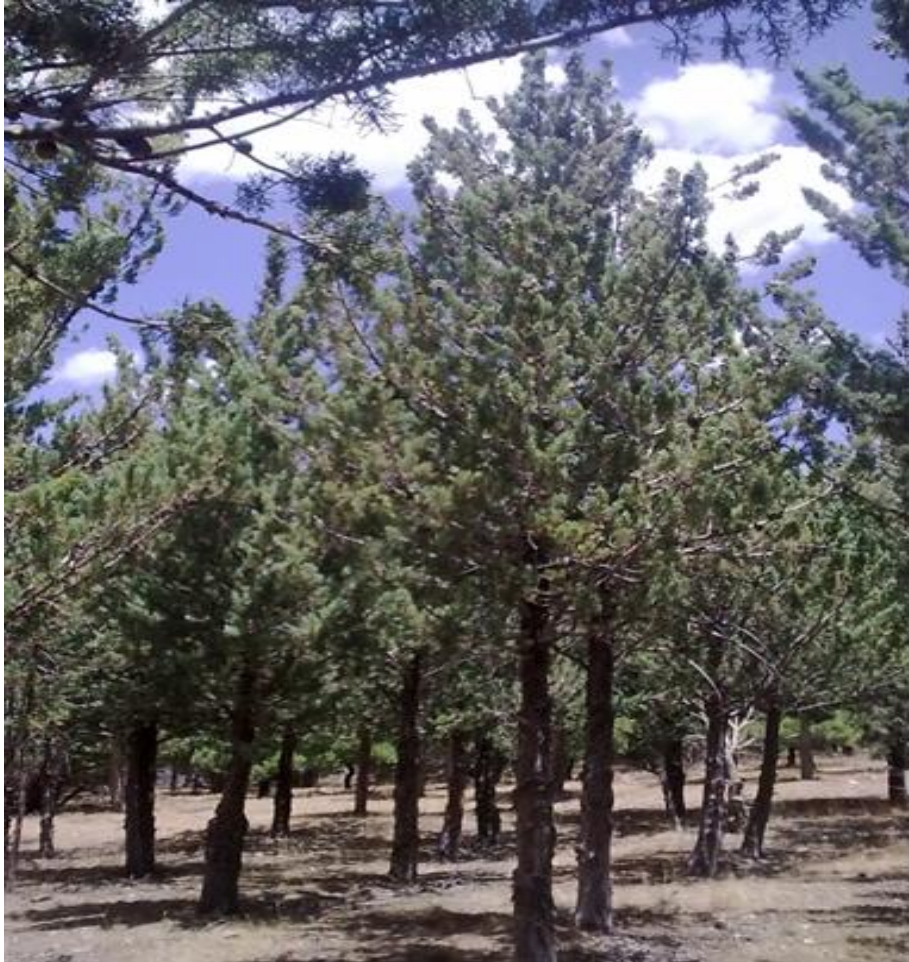
- Utilisation en médecine : en tant que médicament pour l'Homme ; exemple : contre le diabète, conte les maladies de stress, contre la malaria.
- Utilisation en agriculture : pour lutter contre les insectes et les nématodes par exemple.
- Utilisation en alimentation : des assainissements, des boissons, des colorants, et des composés aromatiques. Les épices et les herbes aromatiques utilisées dans l'alimentation sont pour une bonne part responsable des plaisirs de la table. Considérées comme condiments et aromates.
- Utilisation en cosmétique : des produits de beauté, parfums et articles de toilette, produit d'hygiène.

## **I.2 Présentation de l'espèce étudiée (Figure 1)**

Le *Cyprès de l'Arizona*, appartient à la Famille des *Cupressaceaes*. C'est un arbre monoïque de taille moyenne avec feuillage persistant en forme d'écailles de couleur vert grisâtre, bleu-vert disposées en face par paires qui émettent une odeur fétide quand on les écrase. C'est un arbre à écorce lisse de couleur rouge-brun qui devient parfois fibreuse avec des crêtes aplaties. Les cônes sont un peu ronds, brun rougeâtre foncé, avec 6 à 8 écailles ligneuses en forme de bouclier. Les cônes mûrissent à l'automne, mais persistent sur l'arbre pendant de nombreuses années.

Le *Cyprès de l'arizona* a été utilisé comme brise-vent favori dans les prairies désertiques élevées. Egalement, il est utilisé pour la lutte contre l'érosion.

*Cupressus arizonica* présente une bonne adaptation aux conditions climatiques plus continentales et tolère notamment mieux le froid.



**Figure 1 :** *Cupressus arizonica*

## **II Huiles essentielles**

Les huiles essentielles ont, à toute époque, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'Homme, qui les utilisaient pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. De nombreux travaux ont été réalisés dans ce sens, du fait de l'importance incontestable des HE dans divers secteurs économiques, comme par exemple, l'industrie de la parfumerie et de la cosmétique, l'industrie alimentaire, pharmaceutique et plus particulièrement, la branche de l'aromathérapie qui utilise leurs propriétés bactéricides et fongicides (Bakkali et *al.*, 2008).

## **II.1 Localisation et lieu de synthèse**

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules végétales sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes et recouverte d'une cuticule. Ensuite, elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux en fonction de l'espèce : les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rose,...), les sommités fleuries (tagète, lavande), les feuilles (laurier, eucalyptus), les racines (vétiver), les rhizomes (curcuma, gingembre), les fruits (badiane), le bois (bois de rose, santal) ou les graines (ambrette, muscade) (Bruneton *et al.*, 1999 ; Oussla *et al.*, 2006 ).

## **II.2 Rôle physiologique**

Les huiles essentielles sont produites en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste inconnu. Certains auteurs pensent qu'une plante utilise ses huiles essentielles pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. Alors que d'autres considèrent ces huiles essentielles, comme source énergétique, facilitant des réactions chimiques et conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Belaiche, 1979).

## **II.3 Propriétés physico-chimiques**

### **II.3.1 Propriétés physiques**

Les huiles essentielles sont des substances odorantes, volatiles contenues dans les végétaux. Liquides à température ambiante, elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est généralement, inférieure à celle de l'eau à laquelle, elles sont généralement, peu miscibles, voire non miscibles. Liposolubles, elles sont en revanche solubles dans les solvants organiques usuels (Bruneton *et al.*, 2009).

### **II.3.2 Composition chimique**

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses (Garnero, 1991). Ainsi, par l'analyse instrumentale moderne, on peut reconnaître plusieurs dizaines voire des centaines de constituants dans une huile essentielle (vétiver, patchouli et géranium). Par contre, certaines HE ne contiennent que quelques composés, avec généralement, la prédominance d'un composé. Enfin les propriétés odorantes de ces HE sont souvent, sous l'influence de plusieurs composés qui ne sont présents qu'à de très faibles proportions. L'ensemble de ces composés

peut être divisé en deux grands groupes à savoir, les hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes) et les composés oxygénés, qui sont considérés comme substances aromatiques (Kurt, 1982).

#### **II.4 Domaines d'utilisation**

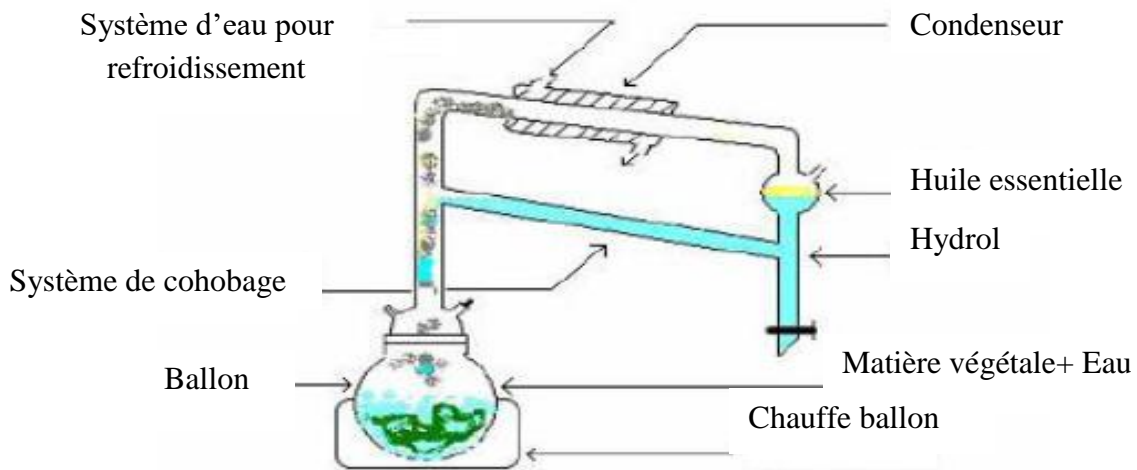
Les HE sont des mélanges naturels à haute valeur ajoutée, utilisées dans de nombreuses industries aussi diverses que la parfumerie, la cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire ou encore l'aromathérapie. Elles entrent dans la composition d'un grand nombre de produits, tels que les additifs alimentaires (épices ou aromates), certaines préparations pharmaceutiques, de nombreux parfums, ou même de détergents. Les propriétés antiseptique des HE de plus en plus leurs utilisation à des fins diverse.

#### **II.5 Méthodes d'extraction**

Parmi les nombreuses techniques d'extraction des huiles essentielles des PAM, la distillation étant la plus ancienne et est, la plus utilisée. D'autres techniques plus récentes restent d'un emploi très limité. En général, le choix de la méthode d'extraction des HE dépend de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), le rendement en HE et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (Hillal, 2010). Parmi les différentes techniques, on distingue l'extraction par distillation, par solvant volatil, par expression à froid, extraction par CO<sub>2</sub> liquide et enfin l'extraction assistée par micro-onde.

##### **II.5.1 Hydrodistillation**

L'Hydrodistillation est le procédé chimique le plus ancien, et est le plus utilisé. Il convient le mieux à l'extraction des molécules en vue d'une utilisation thérapeutique. Cependant, cette technique présente parfois des inconvénients non négligeables (Bruneton, 1993), dont le plus important est un risque de discrimination des composés les plus volatils par dégradation thermique ou par hydrolyse (Richard, 1992). Cette méthode peut facilement être reproduite au laboratoire, celle-ci, consiste à placer le matériel végétal à distiller dans un ballon avec de l'eau, en chauffant l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense (Figure 2). Elle est ensuite récupérée dans un erlenmeyer où on distingue 2 phases : HE et eau aromatique (ou hydrolat).

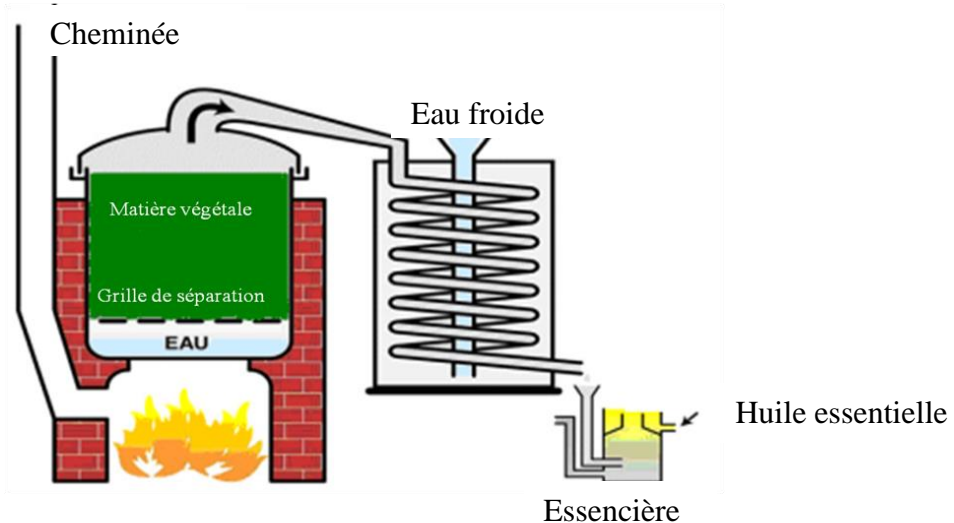


**Figure 2:** Montage d'un appareil d'Hydrodistillation (Ngkegni Limbili, 2012)

Le protocole est le même pour une extraction à grande échelle, mais le ballon et le chauffe-ballon sont remplacés par un alambic et l'erlenmeyer par un vase florentin.

### II.5.2 Vapo-hydrodistillation

A la différence de l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur d'eau ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Figure 3).



**Figure 3 :** Appareillage de Vapo-hydrodistillation

La vapeur d'eau fournie par une chaudière, traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille et durant son passage à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'HE qui est vaporisée et puis condensée. 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 (Baudoux et *al.*, 2012).

## **II.6 Méthodes d'analyses**

L'analyse des HE est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage d'une technique chromatographique, généralement la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) permettant l'individualisation des constituants, avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM) et/ou la spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF), 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. Pour faciliter l'identification des composés minoritaires.

### **II.6.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Arpino, 1995). La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des HE. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit.

Pour chacun des composés, deux indices de rétention, polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (Indice de Kováts) (Kováts, 1965) ou en programmation de température (Indice de Rétention) (Van Den Dool et Kratz, 1963). Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire et ceux de la littérature.

Cependant, la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse (CPG/SM) ou plus rarement l'IRTF s'avère indispensable pour l'amélioration de l'identification d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides.

## **II.6.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)**

Le couplage CPG/SM est la technique la plus utilisée dans le domaine des HE. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (Longevialle, 1981). En plus de leurs spectres de masse, il permet de recueillir des informations en vue d'élucider la structure des composés présents même en faible quantité dans un échantillon. Les composés sont parfois recensés dans les banques de données ou la littérature, en fonction de leur indice de rétention, soit l'indice de Kovats (IK) (c'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du signal maximum du soluté au détecteur)

## **III Activité antimicrobienne**

### **III.1 Mode d'action**

Les HE sont utilisées depuis des siècles, mais la recherche scientifique sur leur activité antimicrobienne est récente, n'a débuté qu'en début du siècle dernier. Depuis, l'utilisation des HE s'est développée jusqu'à devenir une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses.

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activités antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002). De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de protons, fuite d'électrons et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson, 1997).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu de type et de caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions ( $k^+$ ) : ce mécanisme a été observé *in vitro* avec l'huile de l'arbre à thé sur les bactéries Gram<sup>+</sup> (*Staphylococcus aureus*), Gram<sup>-</sup> (*Escherichia coli*) et levure (*Candida albicans*) (Carson *et al.*, 2002).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (Sikkema *et al.*, 1995). Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez Entérobactérie aérogènes aussi été rapporté (Wendakoon, 1995). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse d'ADN, d'ARN, des protéines et des polysaccharides (Zani *et al.*, 1991).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes. En générale, les bactéries Gram- sont plus résistantes que les Gram+ grâce à la structure de leur membrane externe, plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram+ qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhère. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (Dorman et Deans, 2000).

### **III.2 Techniques d'étude d'activité antimicrobienne**

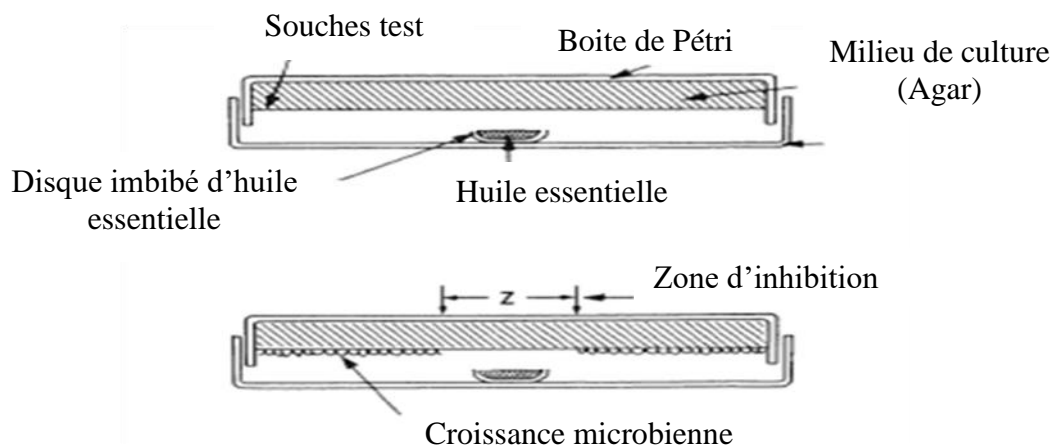
L'utilisation thérapeutique des HE, comme tous les antibiotiques et les fongicides, ne pourra être envisagée qu'après avoir subi un nombre de tests biologiques en particulier la détermination *in vitro* de leur spectre d'activité antimicrobienne. L'examen des données de la bibliographie fait apparaître la diversité des techniques utilisées. Elles se répartissent en trois principales catégories :

- ✓ Technique d'étude en phase vapeur : méthode de micro-atmosphère ;
- ✓ Technique de contact direct en milieu solide ;
- ✓ Technique de contact directe en milieu liquide.

#### **III.2.1 Technique de micro- atmosphère**

Cette technique consiste à poser un disque de papier filtre imprégné d'une quantité déterminée d'huile essentielle au centre du couvercle d'une boîte de pétri sans entrer en contact avec la géloseensemencée par les germes (Figure 4) ; de ce fait l'essence n'agit qu'à l'état de vapeur (Kellner et Kober, 1954).





**Figure 4 :** Schéma de la technique de micro-atmosphère

Cependant, cette technique ne permet d'évaluer qu'une partie de l'activité antimicrobienne éventuelle d'une essence, celle de la fraction la plus volatile. Les produits sont forcément à l'expérimentation.

### III.2.2 Technique de dilution en milieu de culture liquide ou gélosé

L'étude de l'activité antimicrobienne des essences par dilution directe en milieu liquide ou solide était toujours pour les chercheurs un problème complexe à aborder à cause de leur insolubilité dans l'eau. Ils ont tenté de solubiliser les huiles essentielles avant de les introduire dans le milieu de culture, mais les solvants par leur action bactéricide peuvent fausser aussi le résultat.

Pour éviter cet écueil, Raymond (1961) dans ses travaux, a déposé un disque du papier buvard imprégné d'une quantité déterminée d'huile essentielle au fond du tube à essai contenant un bouillon de cultureensemencée de bactéries.

Plus tard, Allegrini et ses collaborateurs (1972) ont dispersé les huiles essentielles dans une solution de détergent (Tween 80). Morris et ses collaborateurs(1978), ont solubilisé les HE dans l'éthanol avant de les introduire dans le bouillon de culture. En faisant varier les concentrations d'HE, on peut déterminer les concentrations minimales inhibitrices(CMI) et par repiquage, on peut déterminer les concentrations minimales bactéricides (CMB).

Cette technique de détermination de la CMI et la CMB en milieu gélosée ou liquide a été mise au point par Tantaoui et ses collaborateurs (1992), et modifiée par Remmal et ses collaborateurs (1993). C'est une méthode inspirée d'une technique d'étude de l'effet de certains antibiotiques sur les bactéries et d'une méthode d'étude des propriétés antiseptiques

des HE (Beylier et Maurel, 1976), modifiée par Benjilali et ses collaborateurs(1986) en raison de l'insolubilité des HE dans les milieux de culture pour microorganismes.

Elle consiste à disperser l'agent antimicrobien à des concentrations variables de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié (Dugeon et *al.*, 1991) ; et compte tenu de la non miscibilité des composés des HE à l'eau et donc aux milieux de culture, l'utilisation des solvants comme l'éthanol et des détergents comme le tween 20 et letween 80, permet d'avoir une dispersion homogène des HE dans le milieu liquide et une bonne diffusion dans les milieux gélosés.

Dans le but d'exclure l'influence de tout agent étranger sur les résultats, Remmal et ses collaborateurs (1993), ont mis au point la méthode de dispersion des HE dans les milieux de culture bactérienne sans détergent ni solvant. Il s'agit de la dispersion des HE dans l'agar agar à 0,2%.

## **MATERIEL ET METHODES**

## I Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est sous forme de rameaux de *Cupressus arizonica* (Figure 5). Les échantillons ont été récoltés au mois de mars 2018 dans la région d'Azrou.



Figure 5 : Rameaux de *Cupressus arizonica*

## II Extraction des huiles essentielles

La technique utilisée dans l'extraction des huiles essentielles est l'Hydrodistillation. Celle-ci a été effectuée, au laboratoire de chimie du Centre de Recherche Forestière de Rabat, à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Clevenger, 1928). Ainsi, 200g de matériel végétal frais sont additionnés d'un litre d'eau dans un ballon de deux litres, surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur, reliée à un réfrigérant. Trois distillations ont été réalisées par ébullition pendant deux heures.

Le protocole expérimental consiste à porter à ébullition, l'échantillon étudié composé d'un mélange du matériel végétal et d'eau. Sous l'action de la chaleur, les cellules éclatent et libèrent des composés organiques odorants et volatils. La vapeur d'eau formée entraîne les composés organiques à l'état gazeux vers le réfrigérant. La condensation de ce mélange

gazeux, provoque sa séparation en deux phases liquides (Figure 6) : une phase organique huileuse et une phase aqueuse.



**Figure 6** : Montage de l'appareil d'Hydrodistillation de type Clevenger

## II.1 Détermination du taux d'humidité de la plante

Pour déterminer le taux d'humidité de *Cupressus arizonica*, nous avons pesé 20g de la matière fraîche de la plante étudiée que nous avons mis à l'étuve à une température de 40C° pendant 72h. Trois répétitions ont été réalisées.

La détermination du taux d'humidité a été effectuée, jusqu'à l'obtention d'un poids constant. Après refroidissement dans un dessiccateur, la moyenne des pertes en poids est calculée et le taux d'humidité est déterminé par la relation suivante :

$$H(\%) = \frac{m_f - m_s}{m_f} \times 100$$

Avec  $m_f$  et  $m_s$  sont respectivement, les masses de la plante à l'état fraîche et sec. Trois pesées par échantillon sont séchées à l'étuve jusqu'au poids constant.

## II.2 Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement est exprimé en % de distillat par 200g de matière sèche, en utilisant la relation suivante :

$$Rdt (\%) = \left[ \frac{V}{m_s} \times 100 \right] \pm \left[ \frac{\Delta V}{m_s} \times 100 \right]$$

Rdt (%) : Rendement en HE (ml/g)

V: Volume d'HE recueilli (ml)

$\Delta V$  : Erreur sur la lecture

ms: Masse végétale sèche (g)

### **III Analyses des huiles essentielles**

#### **III.1 Chromatographie en phase gazeuse**

Les analyses chromatographiques des HE de *Cupressus Arizonica* ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse, à régulation électronique de pression de type Hewlett-Packard (série HP 6890), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (5 % diphényl, 95 % diméthylpolysiloxane) de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du film. La détection est assurée par un détecteur à ionisation de flamme (FID) alimenté par un mélange de gaz  $\text{H}_2$ /air.

L'injecteur de type split-splitless est chauffé à une température de 250 °C. Le volume injecté est de 1  $\mu\text{l}$ . Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/50, débit : 66 ml/min). Le gaz vecteur utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml/min. La température de la colonne est programmée à raison d'une montée de 4 °C/min, de 50 à 200 °C et un palier de 5 mn à la température finale. La limite de détection est inférieure à 1 ppm. L'appareil est piloté par un système informatique de type "HP ChemStation" gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leur indice de Kováts (IK) (Adams, 2007) et sur leur spectre de masse obtenu par chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse à impact électronique (CPG-SMIE).

#### **III.2 Identification des constituants des huiles essentielle**

##### **- Indices Kováts**

C'est un système d'indice basé sur la notion de rétention relative. Il compare la rétention d'un produit quelconque à celle d'un alcane linéaire. Ce système est applicable en chromatographie en phase gazeuse à tout composé sur toute colonne. Par définition, il attribue un indice de 800 à l'alcane linéaire en  $\text{C}_8$  (n-octane), 1 000 à l'alcane linéaire en  $\text{C}_{10}$  (n-décane), et ce, quels que soient a phase stationnaire, la longueur de la colonne, la température ou le débit. Les IK sont déterminés en injectant un mélange des alcanes de  $\text{C}_9$  à  $\text{C}_{24}$  dans les mêmes conditions opératoires (Kovats, 1965). Ils sont calculés à partir de la relation suivante :

$$Ik = \left[ \frac{TR_x - TR_n}{TR_{n+1} - TR_n} + n \right] \times 100$$

n : nombre d'atomes de carbone de l'alcane qui sortant juste avant le composé A,

(n+1) : nombre d'atomes de carbone de l'alcane qui sortant juste après le composé A,

TR<sub>x</sub> : temps de rétention réduit du composé A,

TR<sub>n</sub> : temps de rétention réduit de l'alcane à n atomes de carbone qui sort justant avant le composé A,

TR<sub>n+1</sub> : temps de rétention réduit de l'alcane à (n+1) atomes de carbone qui sortant juste avant le composé A.

## IV Méthode d'étude de la bioactivité

### IV.1 Microorganismes étudiés

Dans le présent travail, nous avons étudié onze souches microbiennes qui appartiennent à la banque de souches du Laboratoire du Microbiologie Forestière du Centre de Recherche Forestière (Rabat, Maroc). Ces microorganismes sont des bactéries, des moisissures et des champignons de pourriture de bois d'œuvre.

- des bactéries : *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.
- des moisissures : *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.
- des champignons de pourriture de bois d'œuvre : *Gloeophyllum trabeum*, *Poria placenta*, *Coniophora puteana* et *Coriolus versicolor*.

Les quatre bactéries utilisées dans la présente étude sont pathogènes et caractérisées par leur forte antibiorésistances et leur pouvoir invasif et toxique chez l'Homme. Elles sont fréquemment rencontrées dans de nombreuses infections au Maroc et posent un problème clinique et thérapeutique.

En outre, les trois moisissures étudiées sont des agents de pourriture fréquente des denrées alimentaires et des fruits, elles peuvent être toxiques et pathogènes pour l'Homme. Cependant, Les quatre champignons utilisés dans ce travail, sont des espèces fongiques responsables de pourriture brune (*Poria placenta*, *Coniophora puteana* et *Gloeophyllum trabeum*) et blanche du bois (*Coriolus versicolor*). Ils ont été choisis sur des dégâts considérables qu'ils causent au bois d'œuvre et aux produits dérivés.

Généralement, les souches bactériennes sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elles sont entretenues, par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur

croissance, pendant 24 heures, à l'obscurité à 37°C. Elles sont cultivées sur le milieu nutritif PDA (*Potato Dextrose Agar*) pendant sept jours à 25°C à l'obscurité.

## IV.2 Activité antimicrobienne

Nous avons utilisé la technique de dispersion des HE dans l'agar agar à 0,2% qui a été mise en évidence par Tantaoui-Elaraki et *coll.* (1992); modifiée par Remmal et ses collaborateurs (1993).

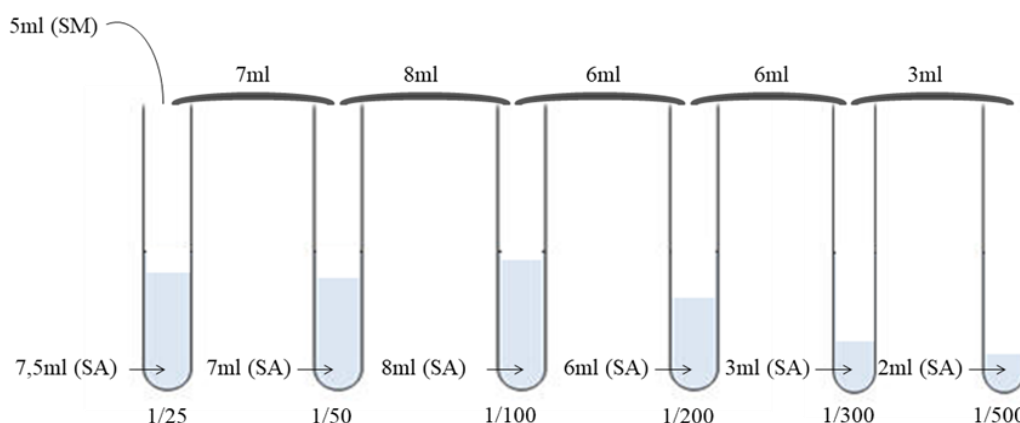
Cette technique présente l'avantage de favoriser l'incorporation du composé dans les milieux de culture solides ou liquides et augmente le contact germe/composé, tout en excluant l'apport d'un agent étranger. En outre l'agar-agar choisi est couramment utilisé en microbiologie et surtout ne présente pas d'effets secondaires connus (Remmal et *al.*, 1993).

### IV.2.1 Préparation de la solution mère

La solution mère (SM) est préparée au 1/10<sup>ème</sup> et qui correspond à la première concentration de la gamme des dilutions. Elle est préparée de la façon suivante : un volume de 1 ml de l'HE est ajouté aseptiquement à 9 ml d'eau gélosée à 0,2% (SA) stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Ensuite, une agitation vigoureusement au vortex pendant quelques minutes a été effectuée pour bien disperser l'huile essentielle dans la solution (SA).

### IV.2.2 Préparation des dilutions successives de l'huile essentielle

A partir de la SM, nous avons procédé à des dilutions successives en utilisant la solution d'agar à 0.2% (SA) pour obtenir les concentrations suivantes : 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000 et 1/5000 v/v (Figure 7). Celles-ci sont préparées de la façon suivante :



**Figure 7 :** Préparation des dilutions de l'huile essentielle



#### **IV.2.3 Préparation des milieux de culture avec les concentrations finales en huile essentielle**

Nous avons préparé des tubes à essai contenant chacun 13,5 ml du milieu solide TSA (Tryptic Soya Agar) pour les bactéries et le PDA (Potato Dextrose Agar) pour les moisissures et les champignons de pourriture du bois, stérilisées à l'autoclave pendant 20 mn à 121°C et refroidis à 45°C. Auxquels nous avons ajouté aseptiquement, 1 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de : 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000 et 1/5000 (v/v).

À l'aide du vortex, nous avons agité convenablement les tubes préparés afin de bien disperser les HE dans le milieu de culture avant de couler dans les boîtes de Pétri, préalablement stérilisées.

Des témoins, constitués du milieu de culture plus la solution d'agar agar à 0,2% seule, sont également préparés.

#### **IV.2.4 Ensemencement et incubation des boîtes de Pétri**

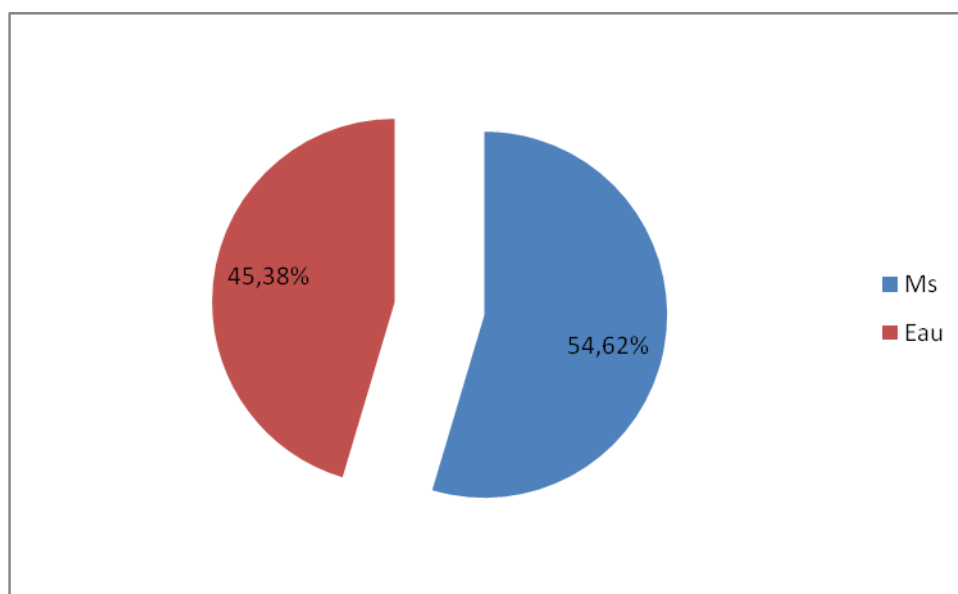
L'ensemencement du bouillon de culture se fait par stries, à l'aide d'une anse de platine calibrée, afin de prélever le même volume d'inoculum. Ce dernier se présente, sous forme de bouillon de culture de 24 heures, pour les bactéries et, sous forme d'une suspension dans l'eau physiologique de spores, provenant d'une culture de sept jours dans le PDA, pour les moisissures. Pour les champignons de pourriture du bois, l'ensemencement se fait par dépôt de fragments de 1cm<sup>2</sup> de diamètre, prélevés à partir de la périphérie d'un tapis mycélien et provenant d'une culture de 7 jours dans le PDA.

La température d'incubation est de l'ordre 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et de 25°C pendant 7 jours pour les champignons. Chaque essai est répété trois, fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

## **RESULTATS & DISCUSSION**

## I Teneur en humidité

Le résultat trouvé concernant le taux moyen d'humidité des rameaux de *Cupressus arizonica* est de 54,62% (Figure 8).



**Figure 8 :** Teneur en eau des rameaux de la plante de *Cupressus arizonica*

## II Rendements en huiles essentielles

Le rendement moyen en HE a été exprimé en ml par rapport à 100g de la matière végétale sèche de la plante. Le rendement en huile essentielle des rameaux de *Cyprès arizona* est  $0,55\pm 0,01$ . Ce rendement est plus faible que celui de la Tunisie qui est de 0,85% (Chéraïf et *al.*, 2007).

## III composition chimique

Les analyses chromatographiques des huiles essentielles ont permis d'identifier 54 composés représentant un total de 99,01%.

Les principaux constituants de l'huile essentielle de *Cyprès arizona* d'Azrou sont le composé illustrés dans le tableau 1 et ont été répartis comme suit : Terpinen-4-ol (18,34%), suivi du  $\alpha$ -Acoradiene (15,38%), accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement faibles:  $\alpha$ -Pinene (8,08%), Z- $\beta$ -Farnesene (5,39%), cis- $\beta$ -Guaiene (5,24%),  $\sigma$ -Eudesmol (5,95%), Cubebol (4,03%), meta-Cymen-8-ol (3,93), limonene (2,73%), et  $\sigma$ -Terpinene (0,89).

**Tableau 1 :** Composition chimique des huiles essentielles des rameaux du *Cupressus arizona*

N°	IK		%
1	919	$\alpha$ -Thujene	0,22
<b>2</b>	<b>927</b>	<b><math>\alpha</math>-Pinene</b>	<b>8,08</b>
3	941	Camphene	0,13
4	964	Sabinene	0,98
5	968	$\beta$ -pinene	0,5
6	979	Myrcene	0,9
7	994	$\delta$ -2-Carene	0,09
8	1000	$\alpha$ -Phellandrene	0,2
9	1005	$\delta$ -3-Carene	0,6
10	1013	p-Cymene	0,52
11	1019	Limonene	2,73
12	1022	1,8-Cineole	1,15
13	1034	E- $\beta$ -Ocimene	0,14
14	1047	$\sigma$ -Terpinene	0,69
15	1076	Meta-Cymenene	0,84
16	1085	p-Cymenene	0,27
17	1104	6-Camphenone	0,06
18	1110	dehydrosabinacetone	0,19
19	1129	trans-dihydro- $\beta$ -Terpineol	0,59
20	1136	Camphor	1,39
21	1152	trans- $\beta$ -Terpineol	0,2
<b>22</b>	<b>1168</b>	<b>Terpinen-4-ol</b>	<b>18,34</b>
23	1171	meta-Cymen-8-ol	3,93
24	1181	$\alpha$ -Terpineol	0,89
25	1189	cis-Piperitol	0,25
26	1228	E-Ocimenone	0,67
27	1244	Piperitone	0,41
28	1257	o-acetateGuaiacol	0,8
29	1274	cis-acetateVerbenyl	0,99
30	1285	$\alpha$ -Terpinen-7-al	1,65
31	1334	Piperitenone	2,3
32	1341	$\alpha$ -acetateTerpinyl	0,23
33	1408	4,8- $\alpha$ -epoxyCaryophyllane	0,65
34	1418	4,8- $\beta$ -epoxyCaryophyllane	0,83
35	1439	Z- $\beta$ -Farnesene	5,39
<b>36</b>	<b>1460</b>	<b><math>\alpha</math>-Acoradiene</b>	<b>15,38</b>
37	1474	$\sigma$ -Muurolene	0,23
38	1487	cis- $\beta$ -Guaiene	5,24
39	1503	Germacrene A	0,51
40	1513	Cubebol	4,03
41	1527	10-epi-Cubebol	2,14
42	1534	$\alpha$ -Cadinene	0,39
43	1541	$\alpha$ -Calacorene	0,47
45	1573	oxide de Caryophyllene	0,32

46	1590	Cubeban-11-ol	0,22
47	1604	Humuleneepoxide II	2,18
48	1617	10-epi- $\sigma$ -Eudesmol	0,41
49	1628	$\sigma$ -Eudesmol	5,95
50	1637	Cubenol	0,25
51	1647	$\alpha$ -Cadinol	0,87
52	1653	dihydro-Eudesmol	0,35
53	1666	epi- $\beta$ -Bisabolol	0,76
54	1768	14-oxy- $\alpha$ -Muuroolene	1,51

Cette composition chimique est différente de celle de la Tunisie dont l'huile essentielle est riche en  $\alpha$ -pinène (20%), umbellulone (18,4%), limonene (5,8%), terpinen-4-ol (1,4%) (Chéraïf et *al.*, 2007). Par ailleurs, celle de la région de Téhéran (Iran) est caractérisée par la présence de limonene (14,44%), umbellulone (13,25%),  $\alpha$ -pinene (11%), terpinen-4-ol (7,29%), sabinene (4,04%),  $\sigma$ -Terpinene (2,15%) (Sedaghate et *al.*, 2011).

On conclue donc que les différences constatées entre les principaux constituants des huiles de *C. arizonica* d'Azrou et celles d'autres pays pourraient être liées à des facteurs abiotiques tels que le climat spécifique des régions d'origine des échantillons, des facteurs géographiques comme l'altitude, le type de sol et la saison de la cueillette.

#### IV Activité antibactérienne

Le tableau 2 ci-dessous montre les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique de l'HE de *Cyprès arizona*.

La concentration de 1/250 v/v était suffisante pour inhiber la croissance de *M. luteus*, *P. digitatum* et *C. versicolor* alors que *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *A. niger*, *P. expansum*, *P. digitatum*, *C. puteana*, *P. placenta*, *G. trabeum* étaient plus sensibles avec une concentration d'inhibition de 1/500 v/v.

Les résultats des activités antimicrobiennes observées pourraient être expliqués par la composition de l'huile essentielle des rameaux de *Cupressus arizonica* riche en alcools terpéniques tel que le Terpinen-4-ol (18%). En effet, plusieurs études ont montré l'efficacité des alcools terpéniques contre les agents microbiens. Cela n'empêche que la bioactivité constatée pourrait être due à la synergie entre les composés majoritaires et aussi minoritaires de l'huile essentielle étudiée.

En Tunisie, Chéraïf et *al.*, (2007) ont effectué une étude sur les huiles essentielles des feuilles, des branches et des cônes femelles de *Cupressus arizonica*; montre que les huiles

essentielles des trois organes ont exercé une activité modeste contre la plupart des bactéries testées (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* ATCC 19430, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, et *Streptococcus pneumoniae*).

**Tableau 2** : Activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles des rameaux de la plante étudiée

Concentrations v/v	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/5000	T
<b>Bactéries</b>								
<i>E.coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>B.subtilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>M.luteus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S.aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<b>Moisissures</b>								
<i>A.niger</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P.expansum</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P.digitatum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Champignons de pourritures du bois</b>								
<i>C.versicolor</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C.puteana</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>P.placenta</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>G.trabeum</i>	-	-	-	+	+	+	+	+

(-) : Inhibition ; (+) : Croissance ; T : Témoin

## CONCLUSION GENERALE

Dans le but de contribuer à la valorisation des plantes aromatiques et médicinales et leurs dérivés, nous avons contribué à la détermination de la composition chimique et à l'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles des rameaux du *Cupressus arizonica*.

Les résultats trouvés ont montré que le rendement en huile essentielle des rameaux de *Cyprès arizona* est de l'ordre de 0,55%. Cette huile essentielle est composée d'un nombre important de constituants identifiés (54 composés) dont trois constituants sont majoritaire *Terpinen-4-ol*(18,34%),  *$\alpha$ -Acoradiene*(15,38%),  *$\alpha$ -Pinène*(8,08%). Nous avons trouvé également que cette huile essentielle a manifesté un pouvoir antimicrobien vis-à-vis de l'ensemble des souches étudiées. Cette bioactivité constatée pourrait être due à ces constituants majoritaires ou bien la synergie entre les composés majoritaires et minoritaires de l'huile essentielle étudiée. Tous ces constituants sont un mélange indissociable de vertus thérapeutiques intéressantes.

D'un point de vue perspectif, il serait intéressant de :

- Etudier plus en détail la composition chimique et le rendement des autres parties de la plante (bois, cônes) ;
- Réaliser différents types d'extraction (au CO<sub>2</sub> supercritique, procédé assisté par Micro-ondes, ultrason...) pour optimiser le rendement en huiles essentielles.
- Il faut mener une étude détaillée sur les activités biologiques de cette huile pour montrer son importance et la possibilité de son exploitation dans certains domaines: pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, insecticides, industriels, etc.

## Référence bibliographiques

- Adams R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas chromatography/Mass Spectrometry, 4th edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Allegrini J., Simeon De Buochberg M., Maillois H. 1972. Emulsions d'huiles essentielles. Travaux de la société de pharmacie de Montpellier, 33, 73-85.
- Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., 2008. Review MI-Biological effects of essential oils- A review Food and Chemical Toxicology; Vol. 46; pp 446-475.
- Baudoux D., Breda M., Zhiri A., 2012. Aromathérapie scientifique : Huiles essentielles chémotypées. 1<sup>ed</sup>. Belgique : J.O.M, 2012. 88 p.
- Belaiche P., 1979. Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome I. Ed. Maloine S.A. Paris.
- Benjilali B., Tantaoui-ElAraki A., Ismaili-Alaoui M., Ayadi A., 1986. Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Med. Phytother.*, 20, 155-167.
- Beylier-Maurel M.R., 1976. Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.*, 58, 283-286.
- Bruneton J., 1999. "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes; Tec & Doc, 3<sup>eme</sup> édition, pp 484-497. Lavoisier. Paris.
- Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Tec. Et Doc. Lavoisier, Paris, pp 915.
- Bruneton J., 2009. Pharmacognosie : Phytochimie : Plantes médicinales. 4<sup>e</sup> éd. Paris : Tec & Doc, 2009. 1269 p.
- Carson C.F., Mee B.J, and Riley T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 46:1914-1920.
- Chéraïf, I., Jannet, H. Ben, Hammami, M., Khouja, M. L., & Mighri, Z. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonica* Greene. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 813-820.
- Clevenger J. F., 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 17 : 341-346.
- Davidson P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doly M.P., Beuchat L.R., and Montville T.J., (eds.) *Food Microbiology*. P 520-556. ASM, Washinton.
- Dorman, H.J.D. and Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbio.*, 88: 308-316.
- Drugeon H., Legallou F., Caillon J., 1991. Méthodes d'étude de l'activité bactéricide, p113-126. Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques. Edité par: Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J.P et Goldstein F., Editions Maloines, Paris.
- Garnero J., 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France, pp. 2-20.
- Joulian D., 1994. Modern methodologies applied to the analysis of oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Parfumer & Flavorist*, 19, 5-7.
- Hamilton, A. C. (2003). Medicinal plants and conservation : issues and. *Medicinal Plants and Conservation : Issues and Approaches*. Surrey (Royaume Uni) : International Plants Conservation Unit.
- Hillal Z., 2010. contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magi en Biologie et Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 78p.



- Kellner W., Kober W., 1954. Möglichkeiten der verwendung ätherischer Öle zur Raumdesinfektion. *Arzeimittelforsch*, 4, 319-325.
- Kováts E., 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advances in Chromatography*, Chap. 7, 229-247.
- Kurt B.G., Torrsell., 1983. *Natural Products Chemistry*. John Willy and Sons Limited.401.
- Longevialle P., 1981. *Spectrométrie de masse des substances organiques*. Masson, Paris, pp 3-14 et 83-98.
- Morris J.A., Khettry A., Seitz E.W., 1978. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J. Amer. Oil. Chem.*, 56, 595-603.
- Ngkegni Limbili A.C., 2012. Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale. Doctorat de l'Université de Toulouse.60p.
- Oussla M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of *Pseudomonas putida* strain isolated from meat- *Meat Science* ; Vol .73 ; pp 236-244.
- Raymond S., 1961. Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmosphères. Thèse de doctorat de l'université de RENNES, France.
- Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T., 1993. Improved methode for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J.Essent. Oil. Res.* 1993a, 5: 179-184.
- Richard H., 1992. *Épices et Aromates*. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris. 339.
- Sedaghat, M. M., Dehkordi, A. S., Khanavi, M., & Abai, M. R. (2011). Chemical composition and larvicidal activity of essential oil of *Cupressus arizonica* E . L . Greene against malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera : Culicidae). *Pharmacognosy Research*, 3(2), 135–140.
- Sikkema J., De Bont J.A.M. and Poolman B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59: 201-222.
- Tantaoui-Elaraki. A., Lattoui N., Benjilali B., Errifi A., 1992. Antimicrobial activity of four chemically different essential oils. *Rivista Italiana.E.P.P.O.S.*, 6, 13-22.
- Van Den Dool H., Kratz P.D., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatog.*, 11, 463-471.
- Wendakoon C.N., and Sakaguchi M., 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of enterobacter aerogenes by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58: 280-283.
- Zani, F., Massimo G., Benvenuti S., Bianchi A., Albasini A., Melegari M., Vampa G., Bellotti A. and Mazza P., 1991. Studies on the Genotoxic Properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and *Salmonella*/Microsome. Reversion assay. *Planta Medica* 57:237-241.
- Zollo, P. H. A., Biyiti, L., Tchoumboungang, F., Menut, C., Lamaty, G., & Bouchet, P. (1998). Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(2), 107–114.