

Licence Es-Sciences et Techniques (LST)

**TECHNIQUES D'ANALYSE CHIMIQUE ET
CONTROLE DE QUALITE
(TACCO)**

PROJET DE FIN D'ETUDES

**Valorisation des plantes médicinales et aromatiques par extraction des
huiles essentielles.**

Présenté par :

◆ M^{lle} Mouna EL KHABCHI

Encadré par :

◆ Pr Abdellah FARAH (INPMA)

◆ Pr Elhadi LAMCHARFI (FST)

Soutenu Le 11 Juin 2014 devant le jury composé de:

- Pr. Elhadi LAMCHARFI

- Pr. Bouchaib IHSSANE

- Pr. Hicham ZAITAN

Stage effectué à l'institut national des plantes médicinales et aromatiques

Année Universitaire 2013 / 2014

Sommaire

Introduction générale : 2

I. Présentation de l'institut :	4
<u>1.</u> Les missions de l'INPMA:.....	5
<u>2.</u> Les départements de l'INPMA :	5
II. Généralités sur les PMA :	6
<u>1.</u> Historique :	6
<u>2.</u> Les plantes médicinales et aromatiques au Maroc :	7
III. Généralités sur les huiles essentielles :	7
<u>1.</u> Définition des huiles essentielles :	7
<u>2.</u> Propriétés physiques :	8
<u>3.</u> Origine des huiles essentielles :	8
<u>4.</u> Composition chimique :	8
<u>a.</u> Les monoterpènes :	9
<u>b.</u> Les sesquiterpènes :	10
<u>5.</u> Techniques d'analyse des huiles essentielles :	10
<u>a.</u> Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :	10
<u>b.</u> Le Couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse (CPG/SM) :	12
IV. Techniques d'extraction des huiles essentielles :	12
<u>1.</u> Hydrodistillation :	12
<u>2.</u> Entraînement à la vapeur d'eau :	13
<u>3.</u> Hydrodiffusion :	14
<u>4.</u> Expression à froid :	15
<u>5.</u> Extraction assistée par micro-ondes :	15
V. Activité antioxydante :	16
<u>1.</u> Différents types des radicaux libres :	16
<u>2.</u> Les Antioxydants :	16
<u>a.</u> Antioxydants synthétiques:	17
<u>b.</u> Antioxydants d'origine végétale :	17

Partie expérimentale

I. Matériels et méthodes :	20
<u>1.</u> Matières végétales :	20
<u>a.</u> <i>Rosmarinus officinalis prostratus</i> (romarin) :	20
<u>b.</u> <i>Thymus Hyemalis</i> (thym) :	21
<u>c.</u> <i>Plectranthus Aromaticus</i> :	22
<u>2.</u> Méthode d'extraction :	23
<u>3.</u> Conservation des huiles essentielles :	24

<u>4.</u> Test au DPPH :	24
<i>Résultats et discussion</i>	
<u>I.</u> Rendement en huiles essentielles :	27
<u>1.</u> Détermination du taux d'humidité :	27
<u>2.</u> Détermination du rendement en huiles essentielles :	27
<u>II.</u> Activité antioxydante :	29
Conclusion :	34

Liste des figures :

Figure 1 : les monoterpènes.....	9
Figure 2 : les sesquiterpènes.....	10
Figure 3 : schéma d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse.....	11
Figure 4 : montage d'hydrodistillation des huiles essentielles (Clevenger).....	13
Figure 5 : schéma de l'entraînement à la vapeur d'eau.....	14
Figure 6 : schéma de l'hydrodiffusion.....	15
Figure 7 : schéma de l'extraction par micro-ondes.....	16
Figure 8 : courbe pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de la solution méthanolique de la BHT.....	29
Figure 9 : Evolution du PI en fonction de la concentration des solutions méthanoliques d'huile essentielles de Rosmarinus officinalis.....	30
Figure 10 : evolution de la PI en fonction de la concentration des solutions méthanoliques d'huiles essentielles du Plectranthus Aromaticus.....	31
Figure 11 : Evolution du PI en fonction de la concentration des solutions méthanoliques d'huile essentielles de Thymus Hyemalis.....	32
Figure 12 : CI50 (mg/ml) de BHT et des différentes huiles essentielles.....	33

Liste des photos :

Photo 1 : photo de l'INPMA.....	4
Photo 2 : photo de l'extraction par micro-ondes.....	16
Photo 3 : la plante Rosmarinus Officinalis.....	20
Photo 4 : photo de la plante Thymus Hyemalis.....	21
Photo 5 : la plante Plectranthus Aromaticus.....	22
Photo 6 : photo de l'appareil de l'hydrodistillation (Clevenger) au laboratoire.....	23
Photo 7 : photo des contenants pour conserver les huiles essentielles.....	24

Liste des tableaux :

Tableau 1 : tableau des résultats de l'humidité des trois plantes.....	28
Tableau 2 : calcul des rendements de l'hydrodistillation pour les trois plantes.....	28
Tableau 3 : pourcentage d'inhibition du BHT.....	29
Tableau 4 : pourcentage d'inhibition du Rosmarinus officinalis.....	30
Tableau 5 : pourcentage d'inhibition du Plectranthus aromaticus.....	31
Tableau 6 : pourcentage d'inhibition du Thymus hyemalis.....	32
Tableau 7 : CI50 du BHT et des trois plantes.....	32

Remerciements :

En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur pour nous avoir donné la force pour accomplir ce travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui ont contribués à notre formation.

Tout d'abord, je remercie sincèrement Mr Abdessalam EL khanchoufi, directeur de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques, de m'avoir accueillie dans son entreprise et de m'avoir prodigué toute son attention et son amabilité.

Nous désirons exprimer notre profonde et vive reconnaissance à notre Encadrant, Pr Elhadi LAMCHARFI, Qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ces directives et Conseils judicieux et pour son suivi régulier à l'élaboration de Ce modeste travail.

Nous voudrions aussi exprimer toute notre gratitude et nos remerciements à notre encadrant de stage Pr Abdellah FARAH pour l'aide précieuse, l'orientation, la grande compréhension, la disponibilité et le soutien durant la période du stage.

Nous remercions les membres du jury :Pr Chouaib Ihsanne et Pr Hicham ZAITAN d'avoir accepté de juger notre modeste travail.

Nous remercions également tous les membres de l'INPMA qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Dédicace :

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde mes chers parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

A la mémoire de ma grand-mère qui m'a toujours aimée et comblée par ses bénédictions, que dieu le tout puissant l'accueille en son vaste paradis.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

-mon très cher frère Khalil

-Mes très chères sœurs Wadha et Fatima

-Mes chers oncles, tantes, cousins et cousines.

- Ainsi que pour tous mes amis et mes collègues.

Liste d'abréviations :

AFNOR : Association Française de NORmalisation

AGPI	: acide gras polyinsaturé
CPG	: chromatographie en phase gazeuse
DIF	: Détecteur à Ionisation de Flamme
ERO	: Espèces Réactives Oxygénées
g	: gramme
HE	: huile essentielle
INPMA	: institut national des plantes médicinales et aromatiques
ISO	: organisation internationale de normalisation (International Organization of Standardization)
ml	: millilitre
PMA	: plantes médicinales et aromatiques
PME	: petite et moyenne entreprise
PMI	: petite et moyenne industrie
SM	: Spectrométrie de Masse
t	: tonne

Introduction générale :

Introduction générale :

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies.

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine.

Ces plantes représentent une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans l'industrie des parfums, agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. La plupart des végétaux renferment des huiles essentielles ; elles sont alors appelées «plantes aromatiques».

Ces huiles essentielles se trouvent dans de nombreuses parties de la plante : le bois, les feuilles, les fruits, les écorces, les graines et les racines. Ce sont des mélanges complexes constitués de plusieurs dizaines, voire de plus d'une centaine de composés, principalement des terpènes.

C'est après le développement de la chimie que les huiles essentielles extraites de plantes commencent à livrer leurs secrets et leurs composants principaux ont été identifiés. Actuellement, plus de 100 000 substances sont connues.

Des recherches récentes ont montré qu'un bon nombre d'entre elles ont un rôle défensif pour les plantes.

L'institut national des plantes médicinales et aromatiques de Taounate est un établissement de recherche qui s'intéresse par ces plantes, à développer en particulier des nouvelles techniques scientifiques d'extractions des huiles essentielles et à étudier les activités de ces dernières.

Dans ce travail, nous allons comparer les rendements obtenus par extraction par hydrodistillation des huiles essentielles des trois plantes : *Rosmarinus Officinalis*, *Thymus Hyemalis*, *Plectranthus Aromaticus* par la suite nous allons mesurer et comparé leur activité antioxydante par le test du DPPH décrit par Braca et al.

Partie bibliographique :

I. Présentation de l'institut :

L'INPMA est un des établissements universitaires, de recherche appliquée, d'appui technique et d'information, spécialisé dans les PMA. Dont les missions s'inscrivent dans le cadre de la charte et la loi 01-00. (Décret de création du 4 juin 2002, Bulletin officiel du 27 juin 2002). Il s'inscrit dans le cadre :

- Des recommandations de la Charte Nationale de l'Education et de la Formation ;
- Des missions fixées à l'INPMA (décret du 4 juin 2002) ;
- Des dispositions législatives et réglementaires ;
- Des mesures et objectifs envisagés pour la mise en place de la réforme ;
- De l'ouverture de l'Université sur l'environnement socio-économique.

L'INPMA est l'unique institut Marocain de recherche et de développement spécialisé dans le domaine des Plantes Médicinales et Aromatiques et matières premières végétales pour la pharmacie, la cosmétique, l'aromatique alimentaire, la parfumerie et la parachimie. [1]



Photo 1 : photo de l'INPMA

1) Les missions de l'INPMA:

Le domaine d'activité de l'INPMA concerne toute la filière des Plantes Médicinales et Aromatiques et les substances naturelles » et Il permet de :

- Créer des zones pilotes expérimentales des plantes au niveau national, dans le cadre des PME / PMI et des exploitations moyennes ;
- Assurer une formation continue spécialisée et organiser des cycles d'études, des séminaires, des conférences, des rencontres et des expositions dans le secteur des plantes ainsi qu'aux autres secteurs utilisant les produits naturels ;
- Promouvoir la conservation, la valorisation, l'utilisation et l'intégration des produits naturels par la création de pépinières dans le cadre des projets de développement régional et / ou national relatif aux différents secteurs socioéconomiques ;
- Entreprendre, élaborer et conduire des projets de recherche et de développement dans le secteur des PMA et des produits naturels ;
- Mettre en place des partenariats avec les sociétés privées et les organismes nationaux et internationaux ;
- Assurer la coordination des activités qui touchent aux PMA au niveau national. [1]

2) Les départements de l'INPMA :

-Département de Phytologie :

-unité de Phytobiotechnologies

-Département de Valorisation et Application Industriel :

Chef de Département : Hassan GRECHE

-Unité de Pharmacologie et Toxicologie (D. Bousta)

-Unité Neuropsychopharmacologie (A. Dahchour)

-Unité de Chimie Génie Chimique (A. Farah)

-Unité d'Application Industrielle (H. Greche)

Laboratoire Analyse (M. Boudkhili)

Atelier Extraction en Milieu Aqueux (A. Daquoune)

Atelier Extraction en Milieu non Aqueux (H. Aaziz)

Atelier Séchage (A. Daquoune)

Atelier Formulation (H. Greche).[1]

II. Généralités sur les PMA :

1) Historique :

La connaissance des plantes médicinales et aromatiques se transmet de génération en génération au fil des siècles par un apprentissage ou une initiation dans toutes les sociétés et traditions orales, notamment chez certains peuples de l'Afrique, de l'Amérique et du Pacifique. Dans d'autres régions du monde, au fur et à mesure du développement des civilisations, l'écriture véhicule ces savoirs thérapeutiques et c'est ainsi que prennent naissance les grands médecins savants grecs, indienne, chinoise et arabo-persane. [2]

Les Grecs furent les héritiers des connaissances médicinales de l'Égypte pharaonique et de la Mésopotamie. Hippocrate, appelé le père de la médecine, a établi les bases d'une médecine scientifique dénuée d'une pratique magico-religieuse dès le 4^{ème} siècle avant J.C. Deux cent trente plantes médicinales sont décrites dans le corpus Hippocraticum d'Hippocrate. [3]

Les Arabes qui disposaient au 7^{ème} siècle d'une médecine nomade de tradition orale, rencontreront les pratiques médicales des civilisations qui les ont précédés. De nombreux médecins célèbres rédigent des centaines de traités. Les plus célèbres d'entre eux sont le traité rédigé par Rhazès et le canon d'Avicenne (Ibn Sîna). À partir du 12^{ème} siècle, les foyers culturels et scientifiques se déplacent vers le Maghreb et l'Espagne andalouse. Ibn al Baytar rédigea le Traité des simples en décrivant 1500 drogues d'origines végétales, ouvrage référence sur la pharmacopée arabo-persane du 13^{ème} siècle. [3]

De nos jours, entre 20.000 et 25.000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une molécule active d'origine végétale. [4]

La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'ont pas réduit l'importance de l'utilisation des plantes médicinales. Au contraire, la croissance démographique dans le monde en développement et l'intérêt croissant manifesté au niveau des nations industrialisées a considérablement augmenté la demande spécifique au PMA et à leurs produits dérivés. [4]

2) Les plantes médicinales et aromatiques au Maroc :

Le Maroc est un producteur traditionnel de PMA, il est l'un des principaux fournisseurs à l'échelle mondiale (de romarin, de verveine, de rose, de coriandre, de menthe pouliot, etc.) et un fournisseur exclusif de plusieurs huiles essentielles comme l'armoise, la camomille sauvage et la tanaïse annuelle. [4]

Par ses contrastes géographiques, le Maroc offre une gamme variée de bioclimats permettant l'installation d'une flore riche (plus de 4200 espèces) et une diversité de ressources phylogénétiques en PMA (600 espèces). A côté de ce contexte naturel prometteur, le Maroc dispose d'un savoir-faire ancestral : la médication par les plantes, leur utilisation pour l'aromatisation et la conservation d'aliments, ainsi que pour l'extraction des principes aromatiques destinés à la parfumerie familiale ou au marché. [4]

Selon Abdessalam El Khanchoufi, directeur de l'Institut national des plantes médicinales et aromatiques de Taounate, le marché des plantes médicinales et aromatiques à l'échelle mondiale pèse près de 64 milliards de \$ US selon le rapport de France Agrimer du 19 juin 2012, avec 35 000 plantes utilisées dans l'industrie comme la pharmacie, la phytothérapie, l'herboristerie, l'hygiène. [5]

Cette demande est appelée à augmenter en raison du développement des produits à base de plantes, en cosmétique, en formulations thérapeutiques et compléments alimentaires. [5]
Notre pays reste un fournisseur important de ce marché mondial surtout en certaines plantes : menthe, verveine, thym, romarin, origan, serpolet, graines de coriandres, fenugrec..., [5]

Les recettes à l'export des PMA sont estimées à 550 millions DH, avec une forte fluctuation du marché international et une forte concurrence de la part de l'Inde, la Chine, la Pologne, l'Espagne... Si nous prenons comme exemple le thym, le volume des exportations du Maroc vers la France est passé de 251 t à 99 t entre 1988 et 2011. [5]

III. Généralités sur les huiles essentielles :

1) Définition des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des liquides visqueux de couleur jaune pâle à orange et d'une odeur aromatique, épicée au fond avec une odeur aldéhydée montante de tête. Ce sont des

produits de composition généralement complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et qui sont plus au moins modifiés au cours de la préparation. [6]

L'association Française de Normalisation (AFNOR) définit les huiles essentielles comme "produit" obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques. [7]

Selon la norme ISO 9235 *Matières premières aromatiques d'origine naturelle – vocabulaire*, une huile essentielle est définie comme un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. [8]

2) Propriétés physiques :

Liquides à température ambiante, les HE sont volatiles, ce qui les différencie des huiles « fixes ». Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles. [9]

Entraînables à la vapeur d'eau, elles sont très peu solubles dans l'eau ; elles le sont toutefois suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette. Cette eau est une « eau distillée florale ». Une préparation voisine est obtenue par mise en solution d'arômes dans de l'eau purifiée : on parle « d'eau aromatisée florale ». [9]

3) Origine des huiles essentielles :

Elles sont synthétisées et stockées au niveau du cytoplasme des cellules sécrétrices qui sont soit éparpillées dans la plante soit organisées en éléments sécréteurs tels des poils, des poches ou des canaux sécréteurs. On rencontre ces éléments au sein de divers organes végétaux : les feuilles eucalyptus), les fleurs (roses jasmains), le bois (santal, cèdre), l'écorce (cassis). [10]

4) Composition chimique :

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences.

a) Les monoterpènes :

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). Ils comportent deux unités isoprène (C₅H₈), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales.

[11]

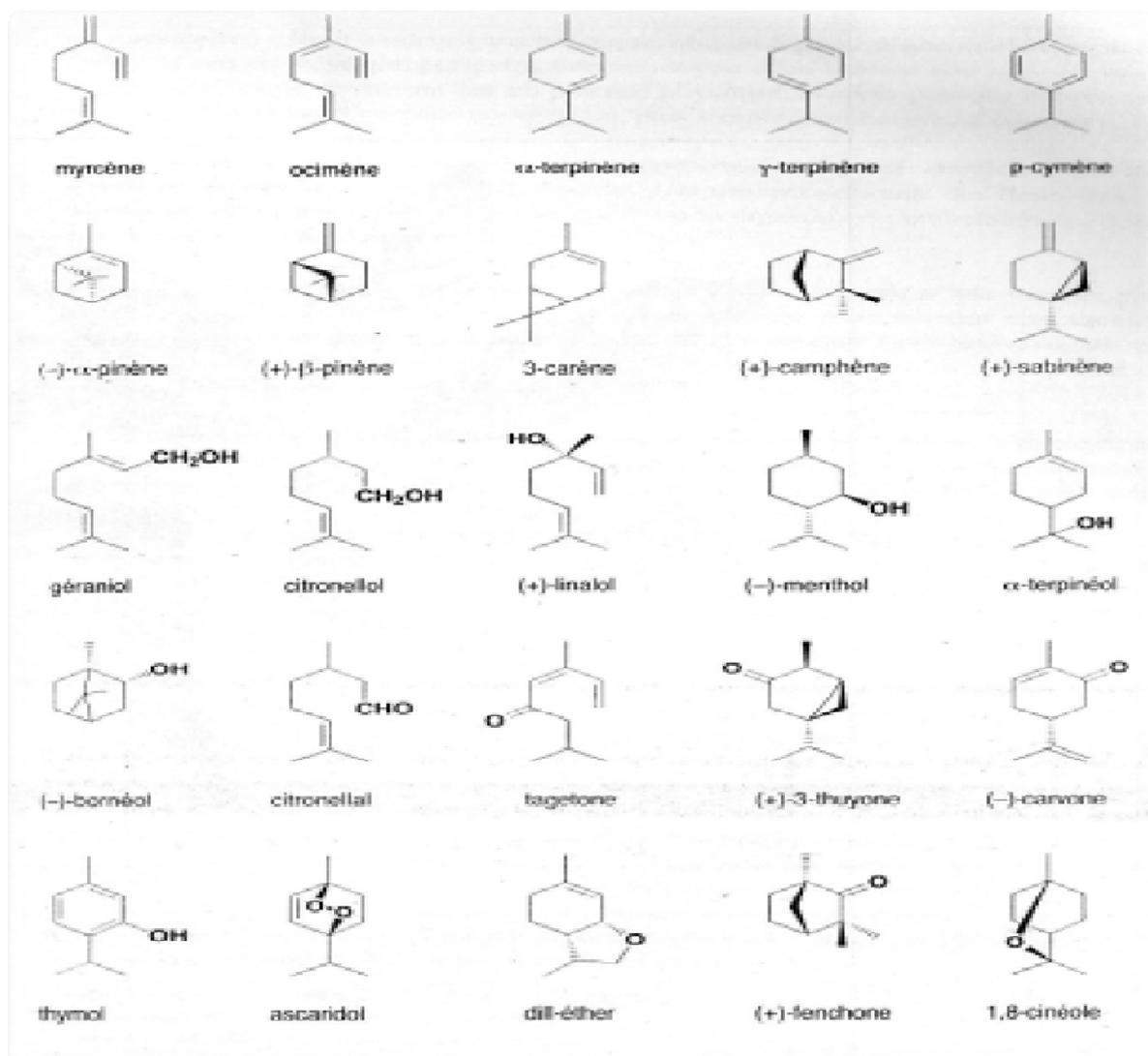


Figure 1 : les monoterpènes

b) Les sesquiterpènes :

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. [11]

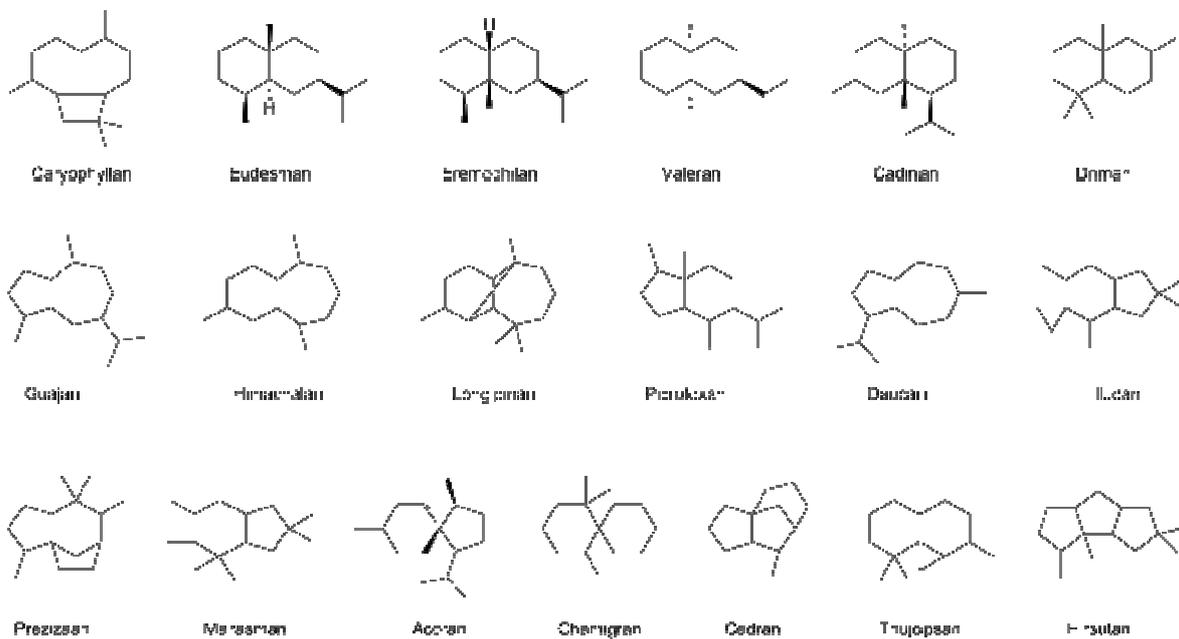


Figure 2 : les sesquiterpènes

5) Techniques d'analyse des huiles essentielles :

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire pour contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation [12]. Parmi les méthodes d'analyse on peut citer :

a) 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. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. 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.

Il s'agit d'une chromatographie en colonne, mais ici le fluide est un gaz. La substance à analyser est vaporisée. Le fluide gazeux va l'entraîner jusqu'à la colonne qui va retarder les différents constituants du gaz. En sortie de colonne ces constituants vont pouvoir être détectés par plusieurs techniques, spectrométrie de masse, ionisation, etc. son principal intérêt et qu'elle peut détecter des substances à l'état de traces. Etant surtout utilisée en chimie des substances naturelles.

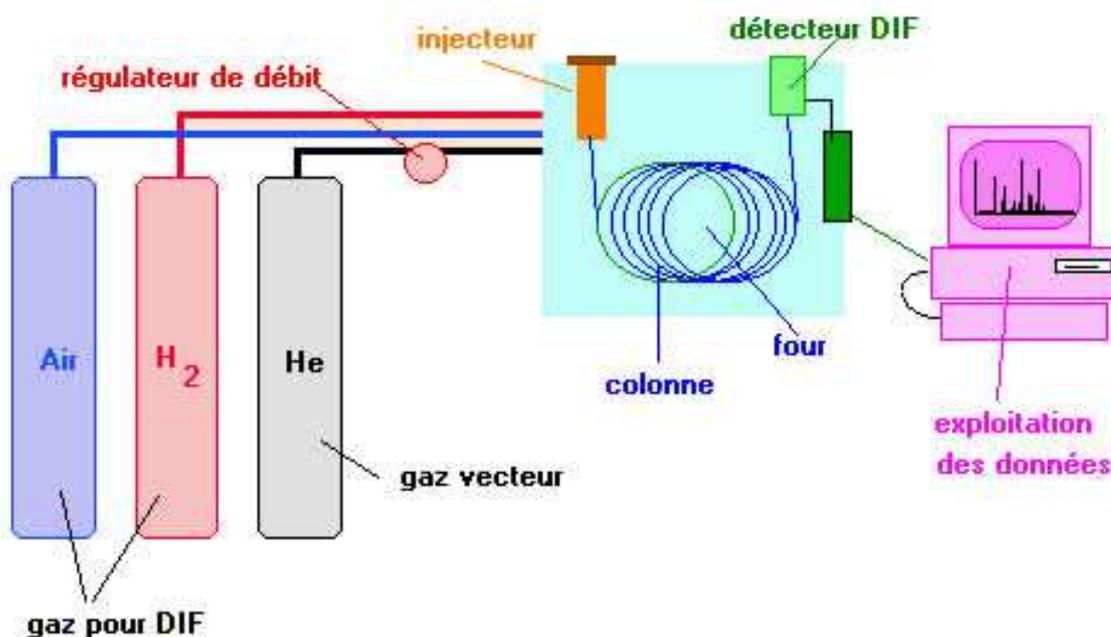


Figure 3 : Schéma d'un appareil de chromatographie en phase gazeuse

Après avoir choisi le type de colonne appropriée et un programme de température adéquat, la détection des composés élués est obtenue par un détecteur DIF (détecteur à ionisation de flamme- flamme ionisation detector). Dans le cas des huiles essentielles, le DIF est le détecteur le plus cité dans la littérature.

b) Le Couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse (CPG/SM) :

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. [12]

Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le piège à ions ou « ion trap ». Tous deux utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge m/z . Les analyseurs quadripolaires sont constitués de quatre barres cylindriques. Un cation pénétrant entre les barres sera attiré vers une barre négative. Si le potentiel change de signe avant qu'il ne soit déchargé sur cette barre, il changera de direction. Dans les appareils à quadripôle, les potentiels sont réglés de manière telle que seuls les ions d'une fourchette de masses déterminées traversent les barres. Par la suite, le faisceau d'ions ayant traversé l'analyseur de masse, doit être détecté et transformé en un signal utilisable. Les détecteurs les plus courants sont les chalcotrons (multiplicateurs d'électrons) et les photomultiplicateurs ; ils convertissent les impacts ioniques en signaux. L'ordinateur enregistre les signaux visualisés sous forme de pics d'intensités variables, rangés sur une échelle de masses. Le multiplicateur de photons permet la détection des ions positifs et dans certains cas des ions négatifs. [12]

IV. Techniques d'extraction des huiles essentielles :

Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. La distillation à la vapeur d'eau est la plus utilisée. De part ce procédé, sont séparées les molécules aromatiques volatiles, de l'hydrolat généralement plus lourd.

1) Hydrodistillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult). Le procédé consiste à immerger la matière

première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. la chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. [11]

Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le clevenger. [11]

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influence non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait. [11]

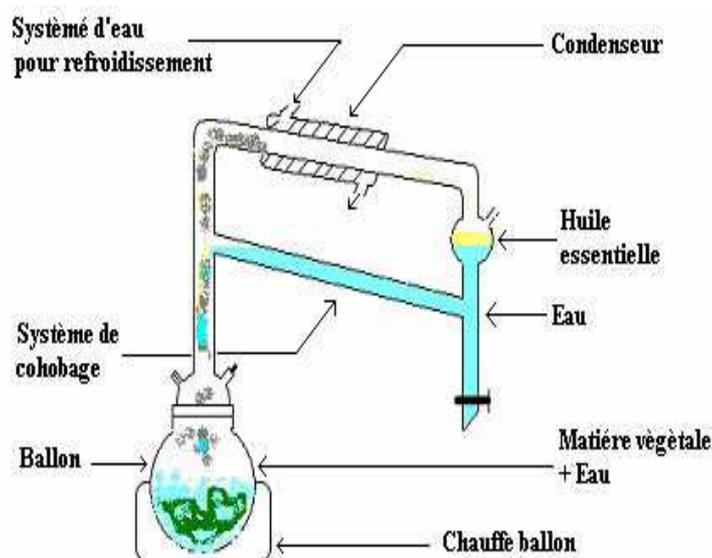


Figure 4 : montage d'hydrodistillation des huiles essentielles (Clevenger)

2) *Entraînement à la vapeur d'eau* :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. 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 ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. [11]

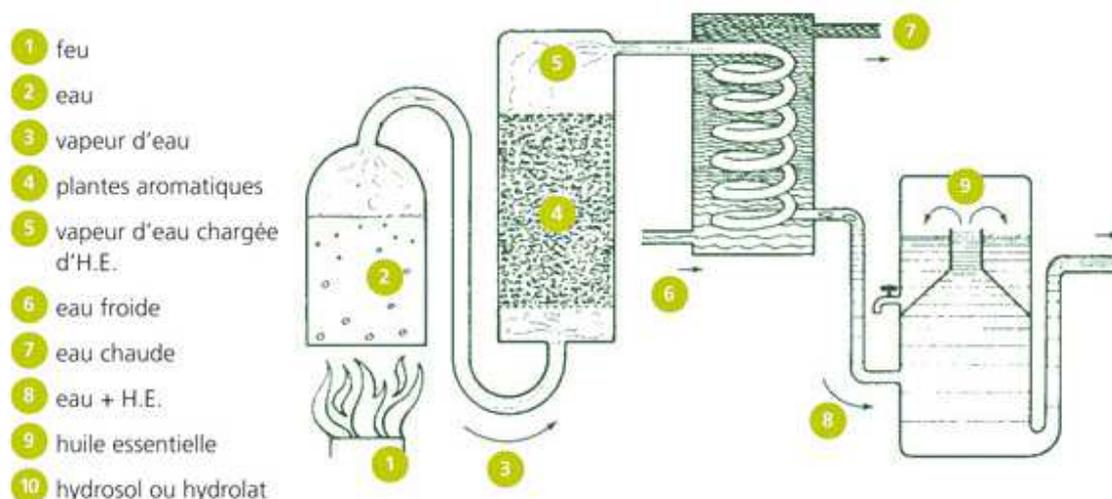


Figure 5 : schéma de l'entraînement à la vapeur d'eau

3) *Hydrodiffusion* :

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure 6). Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. [11]

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur. [11]

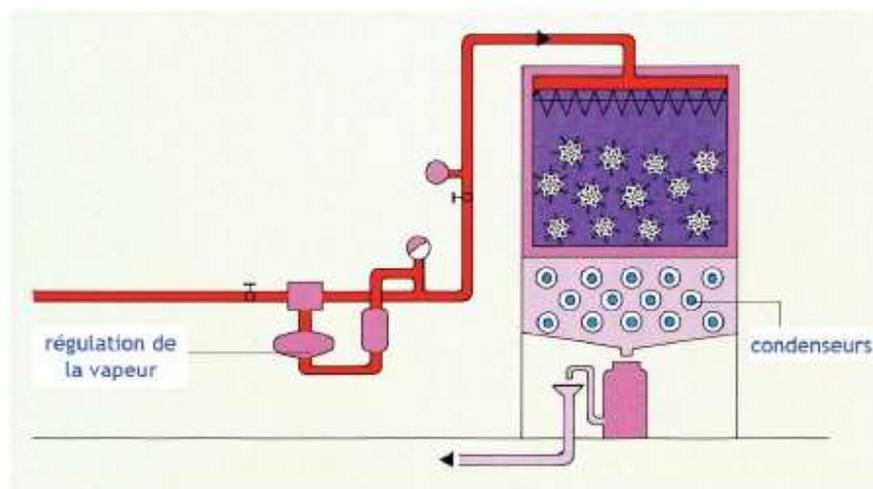


Figure 6 : schéma de l'hydrodiffusion

4) Expression à froid :

Le procédé d'extraction par expression à froid est assurément le plus simple mais aussi le plus limité. Il est réservé à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridés ou encore d'agrumes qui ont une très grande importance pour l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau, d'où la dénomination d'huile essentielle. [11]

5) Extraction assistée par micro-ondes :

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les microondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. L'ensemble est chauffé sans ne jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'obtenir un bon rendement d'extrait. [11]

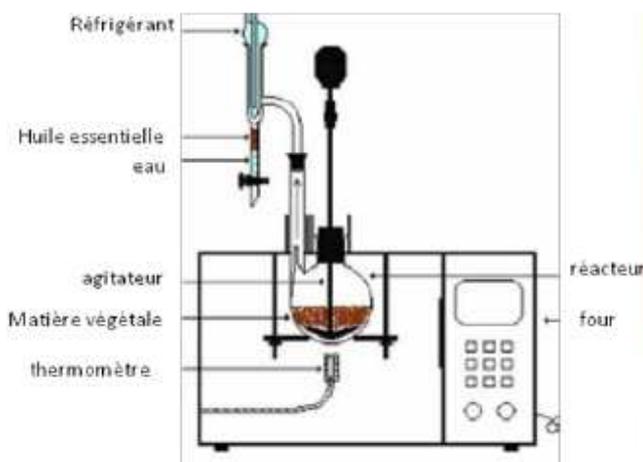


Figure 7 : schéma de l'extraction par micro-ondes



Photo 2 : photo de l'extraction par micro-ondes

V. Activité antioxydante :

1) *Différents types des radicaux libres* :

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe. Parmi toutes les espèces réactives oxygénées (ERO), on distingue un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appelons les radicaux primaires à savoir : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le monoxyde d'azote ($NO\cdot$), le radical peroxyde ($ROO\cdot$) et le radical alkoxyde ($RO\cdot$). Les autres radicaux libres, dits **radicaux secondaires** telles que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. [13]

2) *Les Antioxydants* :

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive. Ils agissent en formant des produits finis

non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur. En même temps, les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable. [14]

a) Antioxydants synthétiques:

Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments : le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole), sont l'un et l'autre soluble dans les lipides et résistent bien à la chaleur. Ils ont une action synergique, ils présentent l'inconvénient d'avoir une odeur désagréable et s'évapore rapidement. Le TBHQ (tertiobutyl-hydroxyquinone) est moins soluble dans les graisses et le PG (gallate de propyle) à l'avantage d'être relativement soluble dans l'eau, mais l'inconvénient d'être peu soluble dans les lipides, peu résistant à la chaleur et de donner avec le fer des sels de couleur foncée. Le nitrite présente des propriétés anti oxydantes, il peut aussi former des nitrosamines cancérigènes. Les chélateurs de métaux utilisés et plus efficaces sont les polyphosphates et les dérivés d'acide citrique. [15]

b) Antioxydants d'origine végétale :

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols. [15]

- Tocophérols :

La grande stabilité des huiles végétales, dans les conditions d'oxydation, est due à la présence d'un taux élevé d'antioxydants naturels dont les plus importants sont les tocophérols qui se présentent sous quatre formes isométriques : α , β , δ et γ . Les tocophérols protègent contre l'oxydation naturelle des acides gras, en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI). Ont signalé qu'une molécule de tocophérol peut protéger 103 à 106 molécules d'AGPI. [15]

Exemple de tocophérol : La vitamine E.

La vitamine E est un antioxydant majeur liposoluble. C'est un composé amphiphile, capable de s'insérer dans les membranes cellulaires : globules rouges, cellules endothéliales, cellules musculaires, neurones (c'est le seul antioxydant du système nerveux central). Il existe dans la nature plusieurs dérivés de la vitamine E à activités différentes (α -, β -, γ -, δ - tocophérol, tocotriénols, ...). Ils sont différenciés par les substituants du noyau chromanol (noyau benzyle associé à un hétérocycle à six carbones substitués par un hydroxyle et par une chaîne latérale ramifiée saturée s'il s'agit de tocophérol ou insaturée s'il s'agit de tocotriénols). [15]

- Caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont, avec la chlorophylle et les anthocyanes, les pigments les plus répandus dans la nature. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seule une quarantaine est retrouvée régulièrement dans l'alimentation humaine. Une trentaine de caroténoïdes et de leurs métabolites a été identifiée dans le plasma et les tissus humains, mais 6 caroténoïdes sont majoritaires : le β -carotène, le lycopène, la lutéine, la β -cryptoxanthine, l' α -Carotène, et la zéaxanthine. Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A. [15]

Partie expérimentale

I. Matériels et méthodes :

1) *Matières végétales :*

a) *Rosmarinus officinalis prostratus (romarin) :*



Photo 3 : la

plante Rosmarinus

Officinalis

- **Classification :**

Embranchement	: Spermaphytes
Sous embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédones
Sous classe	: Astéridés
Ordre	: Tubiflorales
Sous ordre	: Lamiales
Familles	: Labiatea
Genre	: <i>Rosmarinus</i>
Espèce	: <i>R. officinalis</i>

- **Description :**

Le Romarin (*Rosmarinus officinalis* L., family Labiatae), est une plante originaire des régions méditerranéennes. Cette plante est largement utilisée pour l'extraction d'huile essentielle. L'Espagne est le premier producteur d'huile essentielle de romarin.

Le genre *Rosmarinus* renferme plusieurs espèces et plusieurs variétés. Le rendement en huile

essentielle est plus important en été qu'en hiver. Les propriétés d'huile essentielle de romarin varient en fonction de plusieurs facteurs environnementaux (la région de production, le sol, la saison de récolte, etc.). Les propriétés antioxydantes varient en fonction de position géographique et du procédé d'extraction.

L'huile aromatique est largement utilisée en industrie de parfumerie. Le romarin est aussi utilisé en industrie alimentaire pour ses propriétés conservatrices. Son huile essentielle est capable d'inhiber le développement de plusieurs bactéries gram positif et gram négatif. Généralement les bactéries gram positif sont plus sensibles au romarin que les bactéries gram négatif.

b) Thymus Hyemalis (thym) :

- Description :

Les thyms (*Thymus*) sont des plantes basses sous-ligneuses, pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. Les calices et Les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple Contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose.

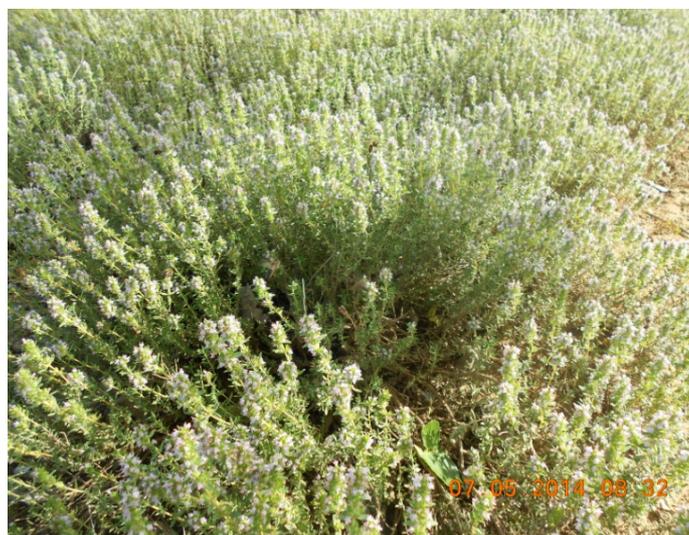


Photo 4 : photo de la plante *Thymus hyemalis*

- **Classification :**

Embranchement	: Spermaphytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Règne	: Plantae
Sous-règne	: Tracheobionta
Division	: Magnoliophyta
Classe	: Dicotylédones
Sous-classe	: Métachlamydées
Ordre	: Tubiflorales
Famille	: Labiacées
Genre	: <i>Thymus</i>
Espèce	: <i>T. hyemalis</i>

c) *Plectranthus Aromaticus* :



Photo 5 : la plante *Plectranthus Aromaticus*

- **Classification :**

Règne	: plantae
Sous-règne	: tracheobionta
Division	: magnoliophyta
Classe	: magnoliopsida
Sous-classe	: asteridae
Ordre	: lamiales
Famille	: lamiaceae
Genre	: <i>Plectranthus</i>
Espèce	: <i>aromaticus</i>

2) Méthode d'extraction :

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger (photo 6), il est constitué d'un Chauffe-ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place une quantité de la plante fraîche à distiller et une quantité suffisante d'eau (environ 2/3 du volume du ballon), une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et un collecteur qui reçoit les extraits de la distillation. Le mélange, de matériel végétal à extraire et d'eau, mis dans un ballon, est porté à ébullition pendant 3 heures. La distillation commence après l'apparition de la première goutte du distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur

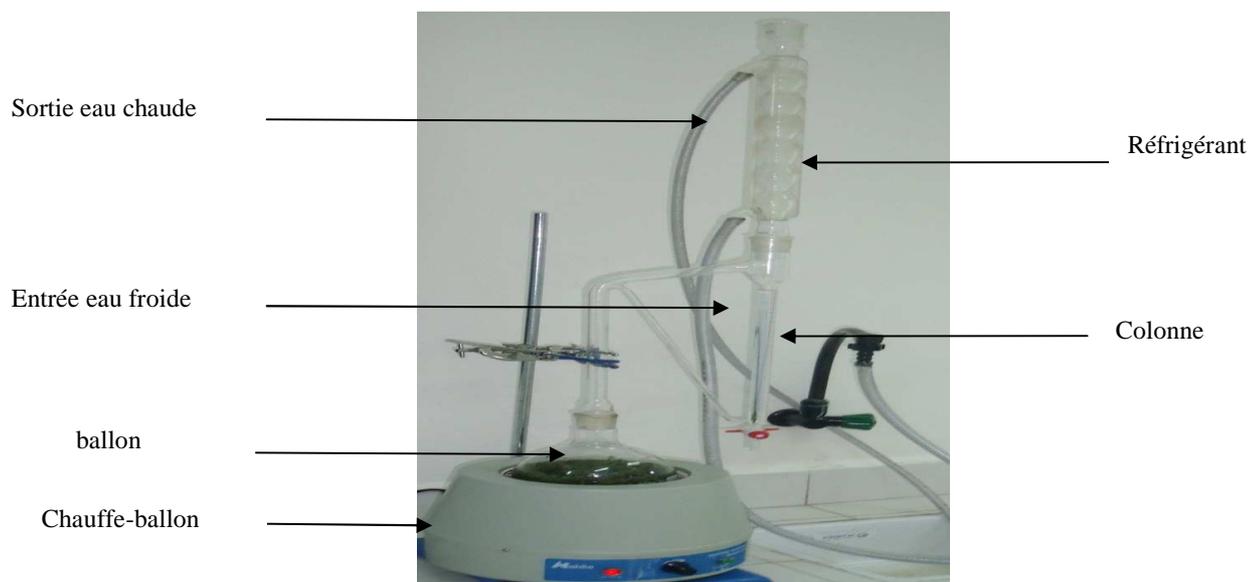


Photo 6 : photo de l'appareil de l'hydrodistillation (Clevenger) au laboratoire

La vapeur chargée d'huile essentielle arrive dans le condenseur. La durée totale de l'extraction est estimée à trois heures (jusqu'à ce qu'on obtienne plus d'huile essentielle). L'huile essentielle se distingue de l'hydrolat (eau aromatique) par sa différence de densité et de couleur. On la sépare de celui-ci par décantation. Elle est récupérée et conservée dans les conditions adéquates.

3) Conservation des huiles essentielles :

Une fois extraites, les huiles essentielles sont des produits fragiles à leur environnement. Il est préférable de les garder dans des contenants de verre teinté, entreposés dans un endroit froid (4°C). Ces contenants devraient aussi être le plus petits possibles de manière à réduire la quantité d'oxygène contenue avec l'huile étant donné que ce dernier permet l'oxydation, donc la détérioration de l'huile et de ses caractéristiques. Puisque les huiles sont volatiles et qu'elles perdent facilement leur odeur et leurs propriétés, le temps maximal de conservation est d'environ 3 mois dans les conditions nommées ci-haut.

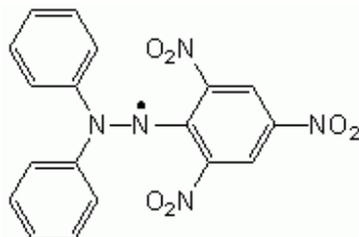


Photo 7 : photo des contenants pour conserver les huiles essentielles

4) Test au DPPH :

Le composé chimique 2,2- diphenyl -1-picrylhydrazyle (DPPH) possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et restent dans leur forme monomère relativement stable à température

ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue violette bien caractéristique de la solution de DPPH.



Pour mesurer l'activité antioxydante on utilise la méthode décrite par Braca et al. Avec légères modifications. Les solutions d'huiles essentielles diluées (0,5, 1, 2, 5, 10 et 20 mg / ml) ont été préparées dans du méthanol. Le BHT a été utilisé comme standard dans des solutions allant de 2 à 20 mg / ml. Nous avons préparé 0,004 % DPPH en méthanol. Puis 1 ml de cette solution a été mélangée avec 1 ml de la solution échantillon et la solution étalon à être testé séparément. Ces mélanges ont été maintenus en solution dans l'obscurité pendant 30 min et la densité optique a été mesurée à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre contre méthanol. le blanc a été utilisé comme 1 ml de méthanol avec 1 ml de DPPH solution (0,004 %). Toutes les déterminations ont été effectuées en triple. La densité optique a été enregistrée et le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculée comme suit : $PI \% = [(A_0 - A) / A_0] * 100$, où A_0 est la densité optique du blanc et A est la densité optique en la présence de l'huile essentielle.[16]

Résultats et discussions

I. Rendement en huiles essentielles :

1) Détermination du taux d'humidité :

La détermination du pourcentage d'humidité est habituellement réalisée par étuvage à 103°C d'une prise d'essai de la matière végétale. L'expérience est poursuivie jusqu'à l'obtention d'une masse constante. Le taux d'humidité est déterminé par la relation :

$$\mathbf{H(\%)} = \left[\frac{\mathbf{mf - ms}}{\mathbf{mf}} \right] \times \mathbf{100}$$

Avec mf et ms sont respectivement des masses de la matière végétale à l'état frais et à l'état anhydre.

2) Détermination du rendement en huiles essentielles :

Le rendement en huiles essentielles est exprimé, en ml de distillat pour 100g de matière sèche, comme suit :

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

Avec :

Rdt(%) : rendement en huiles essentielles

V : volume d'huiles essentielles recueilli

$\Delta V = 0.03$ ml : erreur sur la lecture

ms : masse végétale sèche

Nous avons obtenu les résultats suivants :

	mf (g)	ms (g)	H (%)	Moyenne d'H (%)
Plectranthus aromaticus	10	7,90	21	H=21
Rosmarinus officinalis	10	m₁=4,31 m₂=4,53 m₃=4,46	H₁=56,90 H₂=54,70 H₃=55,40	H=55,6
Thymus hyemalis	10	m₁=4,90 m₂=4,86 m₃=4,73	H₁=51,00 H₂=51,40 H₃=52,70	H=51,7

Tableau 1 : tableau des résultats de l'humidité des trois plantes.

Pour une masse de la plante a distillée on obtient les resultats du rendement dans le tableau si dessous :

	mf(g)	ms(g)	V (ml)	Rendement(%) (g/100g MS)	Moyenne des Rdt (%) (g/100g MS)
Plectranthus aromaticus	80	63,2	1,3	2,06±0,05	2,06±0,05
Rosmarinus officinalis	150	m₁=64,6 m₂=67,9 m₃=66,9	V₁=1.0 V₂=1.1 V₃=1.3	Rdt₁=1,55±0,05 Rdt₂=1,62±0,04 Rdt₃=1,94±0,04	1.7±0,05
Thymus hyemalis	80	m₁=39,20 m₂=38,88 m₃=37,84	V₁=1,5 V₂=1,7 V₃=1,7	Rdt₁=3,83±0,08 Rdt₂=4,37±0,08 Rdt₃=4,49±0,08	4,2±0,08

Tableau 2 : Calcul des rendements de l'hydrodistillation pour les trois plantes

Le rendement diffère d'une plante a autre, parce que chaque plante a ses propriétés.ce rendement d'une manière générale est très faible.

II. Activité antioxydante :

- **Pourcentage d'inhibition du BHT :**

Le BHT est un antioxydant synthétique on mesure son activité pour la prendre comme référence.

Concentration en mg/ml	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625
Pourcentage d'inhibition	50,32	26,32	17,14	3,11	0,68	0,34

Les résultats de pourcentage d'inhibition obtenus pour les différentes dilutions de solution méthanolique de BHT, sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : pourcentage d'inhibition du BHT

Ces valeurs ont été aussi présentées dans la figure suivante :

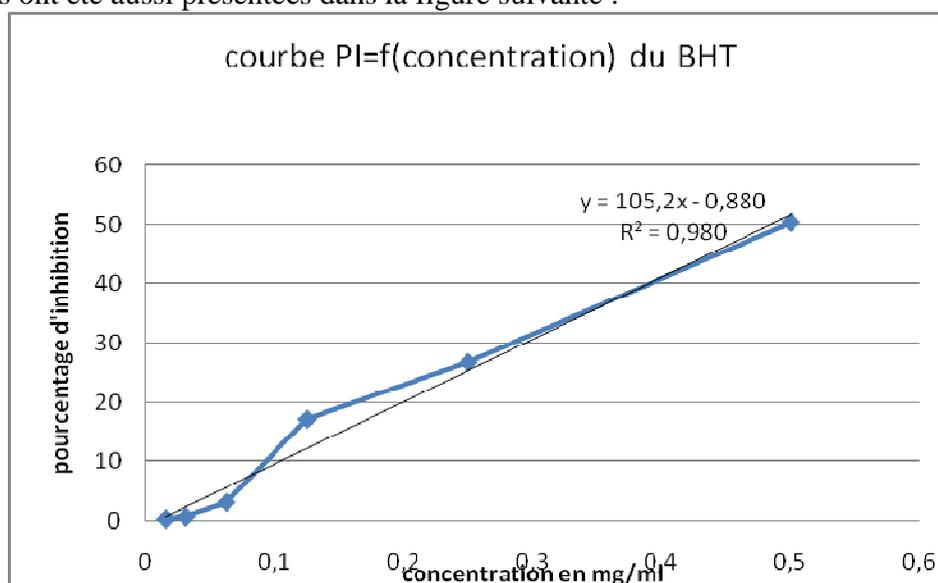


Figure 8 : courbe pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de la solution méthanolique du BHT

L'établissement de la courbe de tendance, nous a permis de trouver l'équation traduisant l'évolution du pourcentage d'inhibition de l'effet oxydant du DPPH (PI) en fonction de la concentration de la solution méthanolique de l'antioxydant synthétique (BHT). Cette équation est la suivante : $PI (\%) = 105,25 * C (mg/ml) - 0,8801 (1)$

- **Pourcentage d'inhibition du Rosmarinus officinalis :**

Nous avons effectué une série de dilutions (6 dilutions) et nous avons obtenu les résultats présentés dans le tableau et la figure ci-dessous :

Concentration en mg/ml	60	45	36	27	13,5	6,75
Pourcentage d'inhibition(%)	17,02	9,44	34,56	23,30	2,16	1,85

Tableau4 : pourcentage d'inhibition du *Rosmarinus officinalis*

Les résultats du tableau sont présentés sous forme d'une courbe dans la figure si dessous :

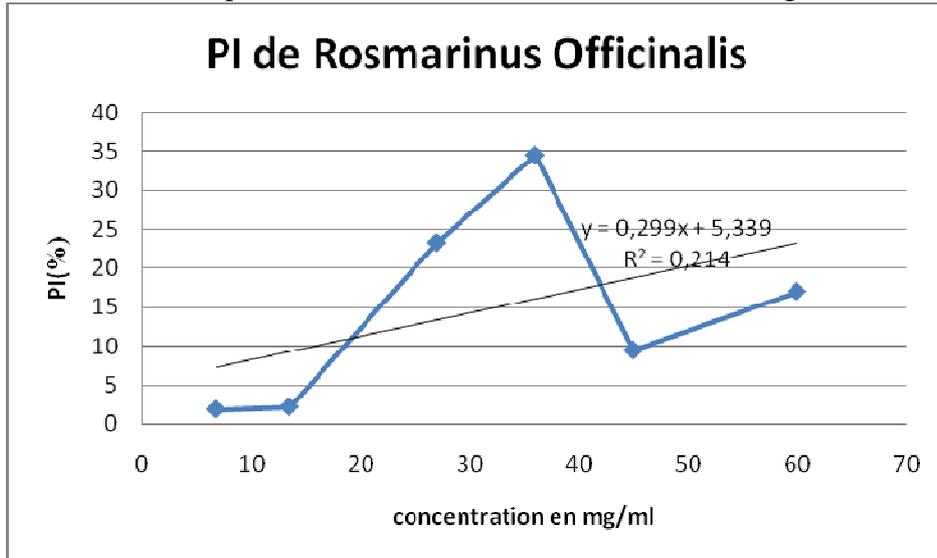


Figure 9 : Evolution du PI en fonction de la concentration des solutions méthanoliques d'huile essentielles de *Rosmarinus officinalis*

L'équation qui traduit l'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est la suivante : $PI (\%) = 0,299 * C (\text{mg/ml}) - 5,3392$ (2)

• **Pourcentage d'inhibition du *Plectranthus aromaticus* :**

Le tableau 5 et la figure 10 illustrent les valeurs de PI obtenues pour les différentes concentrations de solutions méthanoliques d'huile essentielle de *Plectranthus aromaticus*.

Concentration en mg/ml	20	10	5	2	1	0.5
Pourcentage d'inhibition	61,06	60,24	44,19	28,18	11,58	2,75

Tableau 5 : pourcentage d'inhibition du *Plectranthus aromaticus*

Les résultats du tableau sont transformés en graphe :

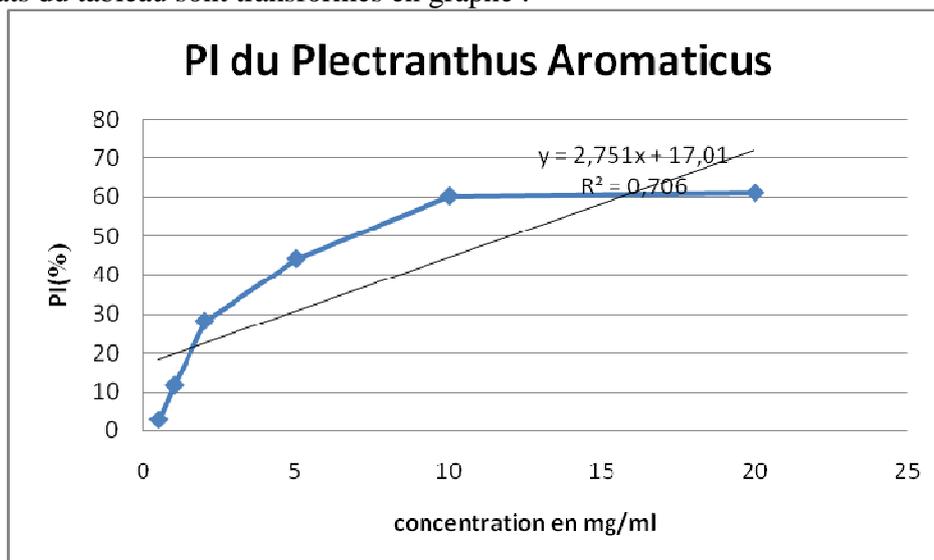


Figure 10: Evolution du PI en fonction de la concentration des solutions méthanoliques d'huile essentielles de *Plectranthus aromaticus*

L'équation qui traduit l'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est la suivante :

$$PI (\%) = 2,7513 * C (\text{mg/ml}) - 17,012 \quad (3)$$

- **Pourcentage d'inhibition du Thymus Hyemalis :**

concentration en mg/ml	20	10	5	2	1	0,5
Pourcentage d'inhibition	73,03	71,73	71,52	71,15	48,38	26,41

Tableau 6 : pourcentage d'inhibition du *Thymus hyemalis*

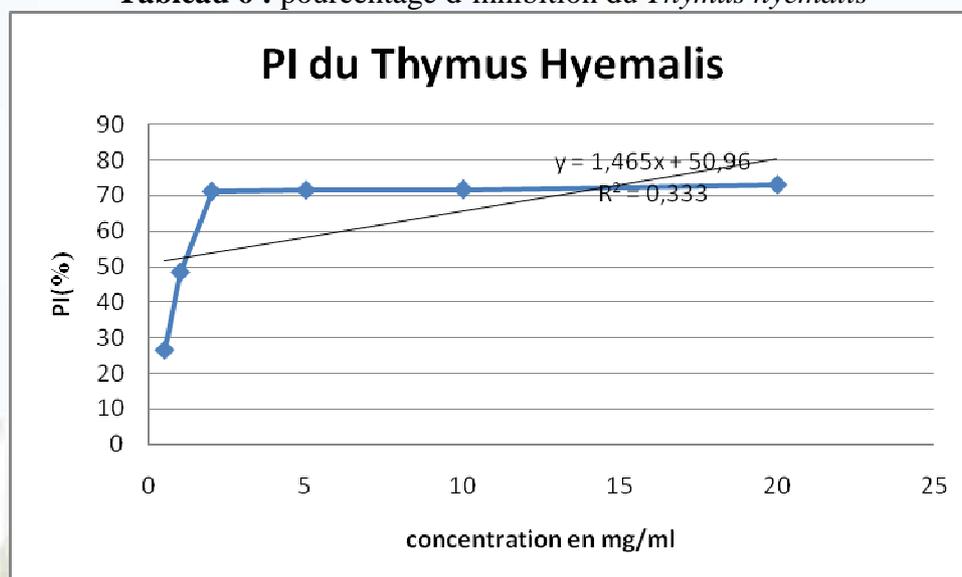


Figure 11 : Evolution du PI en fonction de la concentration des solutions méthanoliques d'huile essentielles de *Thymus hyemalis*

La courbe représente une droite pour les trois premières concentrations. Au-delà des trois concentrations on obtient une courbe constante.

L'équation qui traduit l'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* est la suivante : $PI (\%) = 1,4658 * C (mg/ml) + 50,964$ (4)

3) Calcul de CI50 :

✓ Définition de CI50 :

la CI50 est la concentration d'antioxydant qui a réagit avec 50% du DPPH.

Les CI50 sont calculées à partir des équations (1), (2), (3) et (4), en remplaçant le pourcentage d'inhibition (PI) par 50 %.

	BHT	Rosmarinus officinalis	Thymus hyemalis	Plectranthus aromaticus
CI50	0,47	149,40	-0,66	11,98

Tableau 7 : CI50 du BHT et des trois plantes

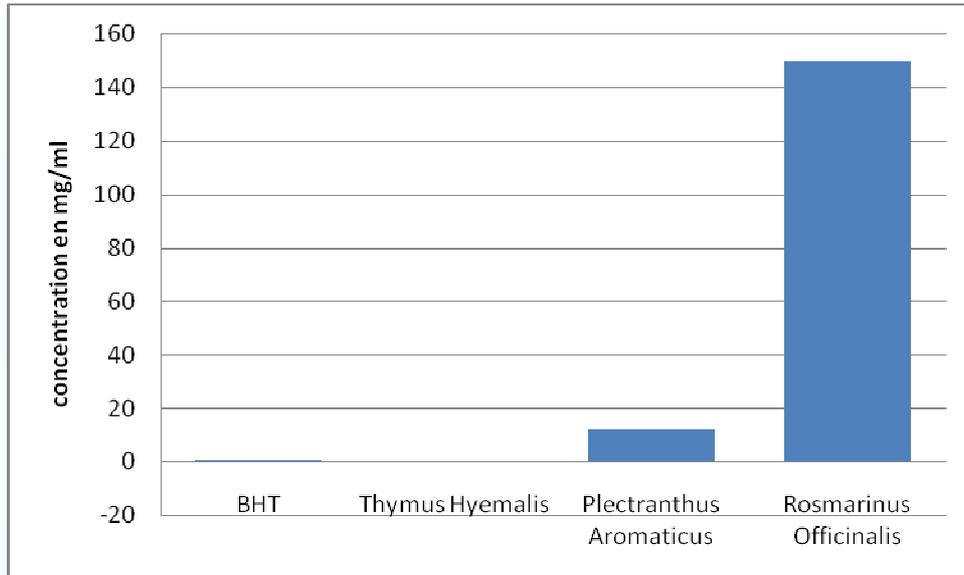


Figure 12 : CI50 (mg/ml) de BHT et des différentes huiles essentielles

Le graphique ci-dessus montre que le BHT possède la CI50 la plus faible. Il est ainsi doté du pouvoir antioxydant le plus puissant. Une concentration de 0,47 mg/ml est capable d'inhiber 50% de DPPH. Cependant, dans le cas de *Rosmarinus*, la CI50 est de l'ordre de 149.40 mg/ml. Parmi les trois plantes, le *Plectranthus Aromaticus* est doté du pouvoir antioxydant le plus important. Pour le *Thymus Hyemalis* on a obtenu une valeur négative de CI50 ce résultat est inexplicable.

Conclusion :

Les plantes médicinales et aromatiques restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques, ce qui nous amène à la conservation et la valorisation de la biodiversité végétale locale pour améliorer la santé humaine et la qualité de vie

Dans un premier temps nous avons récupérés un volume des huiles essentielles par hydrodistillation des trois plantes aromatiques le rendement en huiles essentielles est de l'ordre de 2.06% pour le Plectranthus, de 1.7% pour le Rosmarinus et de l'ordre de 4.2% pour le Thymus.

Dans un deuxième temps nous avons déterminés l'activité antioxydante de ces huiles par le test du DPPH qui nous a montré une activité importante pour le Plectranthus et faible dans le cas du Rosmarinus, pour le Thymus nous avons obtenu un résultat inexplicable.

Ces résultats sont liés directement à la diversité quantitative et/ou qualitative des composés présents dans ces huiles essentielles.

Références bibliographiques :

[1] : <http://www.usmba.ac.ma/inpma/>

[2] : Iserin P. 2001 : Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème édition Larousse, ISBN: 2-03-560252-1. Pp 8.

[3] : Fleurentin. J. 2008: Plantes médicinales traditions et thérapeutiques, éditions Ouest-France. Pp.8.

[4] : la coopérative féminine de Ben Karrich Tetouan. 2012 : les plantes aromatiques et médicinales un exemple de développement humain au Maroc. Pp 6-7.

[5] : le matin weekend.2012 : l'Atlas, le Rif et l'Oriental sont les régions les plus riches en PAM. Pp 15.

[6] : Farah A. huiles essentielles : extraction, analyse et contrôle de qualité. Cours DESS assurance qualité et contrôle analytique. Pp 15.

[7] : Association Française de Normalisation, 1986, Recueil de normes Françaises "Huiles essentielles", AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006.

[8] : organisation internationale de normalisation, 1997, matières premières aromatiques d'origine naturelle, ISO TC/54.

[9] : Amarti F. 2007 : activité antibactérienne des huiles essentielles. Mémoire de DESA physiopathologie pharmacologie. Pp 3.

[10]: Singh A., Singh S.P., Duel R.N., Vithalbai C.L., DrYsdlaw P.1977: the distillation properties of Eucalyptus Citriodora oil. Agric J 39. Pp 33-38.

[11]: El Haib A.2011: valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse de Doctorat de chimie organique et catalyse. Pp 6-13.

[12]: 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 Cannabinums Subsp. Corsicum et Doronicum Corsicum. Thèse de Doctorat de chimie Organique et Analytique. Pp 5-10.

[13]: Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

[14]: Penchev P.I. 2010 : Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat de Génie des procédés et de l'environnement. Pp 6

[15]: Bouras F. Z., Houchi A. 2013 : Etude de l'Activité Antioxydante de la Plante Rumex Vesicarius L. mémoire de Master d'Analyse et Contrôle de Qualité. Pp 16-17.

[16]: A. Braca, C. Sortino, M. Politi, I. Morelli, J. Mendez, J. Ethnopharmacol 79 (2002) 379.

