

**Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences et
Techniques www.fst-usmba.ac.ma**

**Année Universitaire : 2012-2013
Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

*Evaluation de l'activité antibactérienne anti-oxydante
et insecticide des huiles essentielles : d'Origanum
Compactum ; Cedurs Atlantica et Citrus Aurantium.*

**Présenté par:
EL HAMDOUNI Btissam**

Encadré par:
- GRECHE Hassane (INPAM)
- MOUGHAMIR Khadija (FST)

**Soutenu Le 18 Juin 2013 à 10h30 devant le jury
composé de:**

- Mr. M. KH. Skalli
- Mr. S. Sabir
- Mr. H. Greche
- Mr. KH. Moughamir

**Stage effectué à : l'institut National des Plantes
Médicinales et Aromatiques Université Sidi Mohammed Ben
Abdellah Faculté des Sciences et Techniques www.fst-usmba.ac.ma**

Introduction générale

Les plantes aromatiques et médicinales sont accolées au développement des humanités. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des séjours montre que ces plantes ont toujours joué un rôle important en médecine, en parfumerie et dans les conceptions culinaires.

L'amélioration de ces ressources naturelles végétales passe principalement par l'extraction de leurs huiles essentielles qui sont considérés comme des produits à forte valeur ajoutée.

L'étude des activités biologiques et biotechnologique des extraits de plantes est d'un grand intérêt. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont été rapportées dans plusieurs travaux.

Des travaux sont achevés dans ce cadre et ont montré une action des extraits des plantes. En effet les plantes médicinales et aromatiques arrangent une source de substances naturelles importante.

Les antioxydants de synthèse ajoutés aux denrées alimentaires peuvent être nuisibles pour la santé humaine. Pour remédier au phénomène d'oxydation des corps gras, ses conséquences sur la santé et ses répercussions économiques ont fait l'objet de plusieurs recherches. De nombreux travaux sur les activités anti-oxydantes des huiles essentielles d'une grande variété de plantes aromatiques montrent que ces propriétés sont en relation avec la composition chimique.

D'autre part nous savons que la conservation des denrées entreposées est généralement assurée par des insecticides de synthèse. Cependant l'utilisation abusive des insecticides chimiques a des effets négatifs. En effet les plantes constituent une source de substances

naturelles qui présente un grand potentiel d'application contre les insectes et d'autres parasites des plantes et du monde animal.

L'objet du présent travail est d'évaluer les activités biologiques des quatre huiles essentielles ; *Origanum Compactum* ; *Cedrus Atlantica* ; *Citrus Aurantiumzeste* ; et *Citrus Aurantium* feuilles.

Partie

Bibliographique

I. Les plantes aromatiques et médicinales :

I-1- Généralités :

Les plantes médicinales sont des plantes qui sécrètent des essences ayant des propriétés bénéfiques pour la santé humaine.

Ils font partie de l'histoire de toutes les régions du monde : en Chine et en Inde, à travers les siècles, le savoir-faire de ces plantes s'est arrangé, documenté et transmis de génération en génération. Actuellement, en médecine, les plantes connaissent un intérêt important surtout en Europe, pour soigner les déséquilibres causés par le stress quotidien de la vie moderne.

En Afrique, les besoins varient, selon les habitudes des peuples, la médecine traditionnelle demeure la plus utilisée et la plus efficace pour des millions de personnes: on estime que 80% de la population mondiale y recourt pour ses premiers soins de santé.

Les plantes médicinales peuvent être des espèces cultivées mais dans la plupart des cas des espèces sauvages d'où la nécessité de l'identification précise des plantes employées. L'identification précise des plantes représente une nécessité concrète, car elle est la base de l'utilisation sécuritaire des produits de santé naturels à base de plante.

II. Les huiles essentielles :

II.1. Définition :

Une huile essentielle est un extrait volatile odorant, de composition chimique complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage (Bruneton, 2009).

En 1987 ; l'AFNOR (Association Française de la Normalisation) donne une définition officielle des huiles essentielles :

« Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par

distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par procédés physiques ».

II.2. Généralités :

1. - Stabilité des huiles essentielles

Les phénomènes d'altération bouleversent vivement la composition chimique des H.E. surtout qu'elles sont communément volatiles et très sensibles aux phénomènes d'oxydation. Elles sont souvent liées à d'autres substances, comme les gommes et les résines et tendent même à se modifier par une simple exposition à l'air. Les activités provoquées par la chaleur et l'oxygène (O₂) de l'air, sont des procédés qui amènent à l'altération naturelle et qui sont catalysées par l'ensoleillement et la présence de certains métaux (CHIRON, 1996).

2. Conservation des huiles essentielles :

Pour conserver une huile essentielle, elle doit être entreposée dans des flacons sombres bien fermé, à l'abri de l'air, lumière et variation de température, vue de sa nature fragile et volatile (ANTON et LOBSTEIN, 2005).

Si ces conditions sont parfaitement respectées, les H.E. peuvent être conservées jusqu'à 2 à 5 ans en maintenant les flacons en position verticale.

3. Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles disposent un grand nombre d'activités biologiques. En phytothérapie, elles se sont servies contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, comme les bactéries endocanaliaires.

Toutefois elles obsèdent autant des propriétés cytotoxiques (A. Sivropoulou, et al., 1996) qui les rendent des antiseptiques et désinfectants comme des agents antimicrobiens à large spectre.

En ce qui concerne les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs principes actifs peuvent aussi être utilisés au tant qu'agents de protection contre les champignons phytopathogènes, (A. Zambonelli, et al., 2004) et les microorganismes absorbant les produits alimentaires.

Les huiles essentielles présente un intérêt écologique, elles attirent les abeilles et les insectes responsables de la fertilisation, couvrent les végétaux contre les phytophages et

les rongeurs, disposent des spécifications antifongiques, antibactériennes, et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles. (R. Croteau, 1987).

De point de vue économique, traditionnellement, les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de plusieurs produits finis. Elles sont également utilisées dans l'agroalimentaire (soupe, chocolats, chips...) comme des arômes alimentaires. Elles se sont servies dans différentes industrie, la parfumerie, la cosmétique et la savonnerie, elles entrent aussi dans la production des adhésifs et des sprays insecticides, et dans les denrées alimentaires destinées aux animaux (F. Bakkali, 2007).

II.3. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des extraits qui présentent une très grande variabilité, soit au niveau de leur composition chimique, ou de leur rendement.

Ces facteurs comprennent les conditions environnementales : l'origine de la plante; le climat ; la nature du sol; la source botanique; période de récolte; et la technique d'extraction (VERRECK 2007).

Le stockage et le séchage des matières premières avant distillation peuvent aussi influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. La date de semis et de récolte, les traitements phytosanitaires, l'utilisation des différents engrais, ainsi que les techniques de récolte... sont des conditions culturales qui influencent aussi la composition chimique des plantes aromatiques (ANTON *et al.*, 2005).

Une même espèce peut avoir plusieurs chémotypes(1) de nature chimiques différentes vue que le paramètre principale agissant la composition chimique est sa biosynthèse et donc son côté génétique. Au titre d'exemple, l'huile essentielle d'écorce de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) sera riche en cinnamaldéhyde, alors que l'huile essentielle de feuille le sera en eugénol (BENINI, 2007).

(1): une même espèce de certaines plantes présente plusieurs variétés chimiques, ces variétés sont dénommées chémotypes.

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une H.E. est variable (jusqu'à 500 molécules différentes dans l' H.E. de Rose) (PIBIRI, 2006).

Le changement d'aspect et de la composition chimique, d'une plante, se déchiffre par un changement d'odeur et de couleur. C'est le cas, pour les racines de valériane

(*Valerianaofficinalis*) qui sont inodores à l'état frais et qui deviennent nauséabondes en séchant par dégagement d'acide valérianique.

II.4. Méthodes d'Extraction des huiles essentielles :

Les principales méthodes d'extraction sont basées sur l'entraînement à la vapeur d'eau, la volatilité et la solubilité. Le choix de la méthode la plus adéquate est basé sur la nature des plantes, ou des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle, et de son utilisation. (Samate, 2001).

II.4.1. L'entraînement à la vapeur d'eau :

Les procédures d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont fondées sur le fait que la plupart des constitués volatils enfermés dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, vu leur point d'ébullition assez bas et leur nature hydrophobe. Grâce à la vapeur d'eau qui se forme dans l'extracteur, l'essence est libérée du tissu végétal et amenée par la vapeur d'eau, le mélange de vapeurs se condense sur une surface froide et l'huile essentielle se désunis par décantation (Bruneton, 1993).

Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydro distillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydro diffusion.

a) L'hydro distillation :

Le principe de cette méthode d'extraction est tout simple on commence par introduire la plante dans un ballon si l'expérience est réalisé au laboratoire ou dans un alambic industriel; pour porter ensuite le tout à ébullition. La vapeur d'eau et l'essence se condensent dans un réfrigérant et l'HE se séparent de l'eau par différence de densité.

b) L'hydro diffusion :

L'hydro diffusion est une autre version de l'entraînement à la vapeur. Elle se distingue des autres techniques d'extraction par le fait qu'elle exploite l'action osmotique de la vapeur d'eau. La vapeur d'eau passe au travers la matrice végétale, à petite pression du haut vers le bas.

L'intérêt de ce moyen est d'être plus court ; moins attentatoire pour les composés volatils, et plus économique vu le temps réduit de la distillation et de la consommation de vapeur. (EL HAIB.A 2011)

II.4.2 Extraction par CO₂ super critique :

Cette méthode d'extraction est la plus récente des techniques d'extraction à froid elle se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂ et de son état physique. Grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Le gaz carbonique CO₂ se trouve dans un état "supercritique" Sous pression et à température supérieure à 31°C, est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour le conduire vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant. **(EL HAIB.A 2011)**

De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles **(M. C. Martini)**. Cette technique est utilisable pour les essences difficilement distillables.

II.4.3. L'expression à froid :

On utilise cette technique d'extraction à froid surtout pour récupérer les HE des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Le procédé consiste à briser mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. Afin d'éviter les altérations liées à l'action de l'eau certaines machines rompent les poches par dépression et récoltent directement l'huile essentielle. **(Basil et al 1998)**

II.4.4. Extraction assistée par micro-onde :

Cette méthode d'extraction a été enrichie récemment pour des objectifs analytiques **(Z.Wang, L et al 2006)**. Le principe réside dans l'irradiation par micro-ondes de la matière végétale malaxée à l'aide du méthanol (solvant qui absorbe parfaitement les micro-ondes) pour l'extraction de composés polaires ; ou bien en présence d'hexane (solvant n'absorbant pas les microondes) pour l'extraction de composés apolaires. Le tout est tempéré sans jamais atteindre l'ébullition pendant de brèves périodes interrompues par des pauses de refroidissement.

II.5. Caractères chimiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des composés terpéniques **(ALAOUI ISMAILI M.et al 1986)** parlons du point de vue chimique, les terpènes apparaissent comme des polymères d'un carbure d'hydrogène diéthylénique, l'isoprène **(2-méthylbuta-1,3-diène)**.

Selon le nombre de résidus isoprènes que groupent les composés terpéniques, on distingue:

- les terpènes simples, formés de deux isoprènes, $C_{10}H_{16}$;
- les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes, $C_{15}H_{24}$;
- les diterpènes, formés de quatre isoprènes, $C_{20}H_{32}$.

Ces trois premiers groupes sont à l'origine de très nombreuses essences :

- les triterpènes (six isoprènes) qui, par oxydation, conduisent à de nombreuses résines ;
- les tétraterpènes (huit isoprènes) qui conduisent aux caroténoïdes ;
- les polyterpènes (n isoprènes) qui comprennent, en particulier, lecaoutchouc et la gutta-percha.

Les huiles essentielles se composent essentiellement de deux ensembles de constituants odorants différents selon la voie métabolique employée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), dominants dans la majorité des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

II.5.1. Les monoterpènes :

Ce sont les plus ordinaires composants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). (L.S. Padua et al.1999) Ils contiennent deux unités isoprène (C_5H_8), Selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes s'associent un bon nombre de produits naturels à utilités chimiques particulières.

II.5.2. Les sesquiterpènes :

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (alliance de trois unités isoprènes).

C'est la classe la plus variée des terpènes qui se répartissent en divers catégories structurelles, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. On trouve les sesquiterpènes sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés dans la nature comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones

II.5.3. Les composés aromatiques :

Une autre catégorie de composés volatils qu'on rencontre assez souvent est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (V.A. Kurkin et al .2003) Elle contient des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragole et

bien d'autres. Ils sont davantage rencontrés dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc (**J. Bruneton 1993**)

II.6. Propriétés physiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont « des liquides d'odeur et de saveur généralement forte » (wichtk (M) et al 1999). Elles sont volatiles, liquides à température normale, exceptionnellement colorées, généralement assez soluble dans les solvants organiques et peu miscibles à l'eau.

De façon plus générale, le tableau 1 présente les caractéristiques principales de quelques terpènes :

Tableau 1:Principales caractéristiques biophysiques de quelques terpènes.

Terpène	Poids Moléculaire	Solubilité dans l'eau	Solubilité solvants
Cinéole	154,24	Quasi insoluble	<u>Miscible à :</u> Alcool Chloroforme Ether Acide acétique Huile
Limonéme	136,23	Quasi insoluble	<u>Miscible à l'alcool</u>
Menthol	156,26	Légèrement soluble	<u>Miscible à :</u> Alcool Chloroforme Ether
Thymol	150,21	Cf.tableau 1	Cf.tableau 1
Thuyone	152,23	Quasi insoluble	<u>Miscible à :</u> Alcool Solvants Organiques

II.7. Toxicité des huiles essentielles

Sous le terme de toxicité des données expérimentales accumulées sont décrites en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi des huiles essentielles.

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5g/kg. En ce qui concerne la lavande la toxicité est faible autour des 5g/kg (donnée observée chez l'animal).

Les substances naturelles peuvent aussi provoquer des effets indésirables chez l'homme au même titre que celles de synthèse. Les huiles essentielles riches en phénols et aldéhydes peuvent causer une irritation de la peau, des yeux et des muqueuses. Au titre d'exemple on peut citer :

Cannelle de Ceylan, Basilic exotique, Menthe, Clou de girofle, Niaouli, Thym à thymol, Marjolaine, Sarriette, Lemon-grass. Les inflammations cutanées sont centrées d'une manière privilégiée surtout sur les paupières, les aisselles et le périnée.

En outre, des réactions cutanées allergiques peuvent aussi être provoquer par certaines huiles essentielles (J.M. Meynadier, et al 1997).

Citons les HE contenant les terpènes généralement responsables des effets toxiques chez les animaux, sous forme d'un tableau, d'après (Wichtl(M), Anton(R) (1999) ; Lis-Balchin (M)1999)

Tableau 2 : les différents terpènes responsables des effets toxiques

Les terpènes responsables des effets toxiques	Les huiles essentielles
Pulegone	-huile essentielle de Buchu
	- huile essentielle de Pennyroyal
	- huile essentielle de Sauge
	-huile essentielle d'herbe Bolivienne
Thuyone	-huile essentielle de Sauge
	- huile essentielle d'Absinthe
	- huile essentielle d'Armoise
	- huile essentielle de Cèdre
Limonène	huile essentielle de Citron
	huile essentielle de Buchu
	huile essentielle de Lavande aspic
	huile essentielle de Thym
	huile essentielle de Melaleuca
Menthol	dans plus d'une centaine d'huiles essentielles de menthe

B. II.8. Les méthodes d'analyses des huiles essentielles :

Pour une bonne commercialisation des huiles essentielles, les industriels se trouvent dans l'obligation de connaître avec exactitude la composition chimique de leur produit. Chose qui n'est pas toujours aisée vu la délicatesse des méthodes de séparation et d'identification. Donc cet examen des huiles essentielles devient nécessaire et ce quel que soit le secteur concerné.

II.8.1. Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) :

La CPG se présente comme étant la méthode d'analyse par séparation la plus pratiquée et la plus adéquate qu'on peut appliquer aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Arpino P., et al 1995).

Cette technique est devenue inévitable pour l'analyse des huiles essentielles, particulièrement après le grand développement technologique qu'a connu le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs (FID),

Chaque un des constituants, des huiles essentielles, est défini par des indices calculés à l'aide d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à une température constante (indice de Kováts) (Kováts E., et al 1965) ou en programmation de température (indices de rétention) (Van Den Dool H., et al 1963).

L'identification des huiles essentielles est devenue une approche plus précise grâce aux techniques de couplage entre la CPG et les techniques spectroscopiques (SM, IRTF).

II.8.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

Cette méthode de couplage connaît toujours une grande évolution. C'est la raison pour laquelle elle est appliquée dans les domaines de l'agroalimentaire (aliments, eau), des produits pétroliers (carburants, matières synthétiques), des produits naturels (parfumerie, cosmétique, médecine), etc. (McLafferty F.W., 1992).

Le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique modèle dans le secteur particulier des huiles essentielles (Longevialle P, 1981 ; Constantin E 1996).

Grâce au couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) il est possible d'avoir au même temps la séparation et l'analyse des

différents constituants d'un mélange complexe. Il y'a deux modes d'ionisation : l'ionisation par impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC). Ce dernier, y compris l'ionisation chimique positive (ICP) et l'ionisation chimique négative (ICN)(**Julien. P 2005**).

III. Les activités biologiques des huiles essentielles :

Dans la pratique, les huiles essentielles les plus examinées pour leurs dispositions antibactériennes et antifongiques sont : Thym, Origan, Sarriette, Lavande, Menthe, Romarin, Sauge, Hysope.

L'essence de Thym est généralement citée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives du fait de la variété moléculaire des métabolites qu'elles comprennent ce qui explique la diversité leur caractéristiques biologiques(**BENJILALI B, et al 1996**).

Les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan, se sont présentées comme des agent à un pouvoir anti-oxydant(**Mantle et al., 1998 ; Karioti et al., 2006**).

Un effet anti-inflammatoire a été mentionné pour les huiles essentielles de Protiumstrumosum, Protiumlewellyni, Protiumgrandifolium, et pour l'huile essentielle des racines de Carlinaacanthifolia(**Dordevic et al., 2007**), qui inhibe, chez le rat, l'inflammation induite par une injection de carraghénane.

Les fonctions antifongiques de diverses huiles essentielles, y compris les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé ont été décrites par **Burt, 2004**.Egalement des huiles extraites des achilées, Achilleafragrantissima, A. setacea, A. teretifolia(**Unlu et al., 2002**)et A. milefolium(**Candan et al., 2003**),ont prouvé leur efficacité contre la levure pathogène Candida albicans.

Certaines huiles essentielles et grâce à leur activités anti-tumorales sont administrées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, dissociée des graines de Nigellasativa L., indique une activité cytotoxique in vitro contre de nombreuses lignées cellulaires tumorales. En limitant aussi l'accroissement de métastases hépatiques et décalant la mort des souris développant la tumeur P815 (**Mbarek et al., 2007**).

L'efficacité de l'huile essentielle de *Melissa officinalis* contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, et contre les cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa et al., 2004) a été également mise en évidence.

III.1. L'activité anti-oxydante :

Le phénomène d'oxydation consiste à rouiller les métaux, flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses, et modifier le goût et la couleur des aliments.

De point de vue chimique l'oxydation est générée par la présence des radicaux libres; espèces chimiques instable, neutres ou chargées qui cherchent toujours à récupérer un électron dans sa couche externe pour retrouver son état stable, très rapide et se propage en cascade.

Ils pointent surtout les corps gras comme les phospholipides des membranes cellulaires ainsi que les protéines. L'oxydation entraîne une modification ou une perte d'activité biologique de la molécule, en cas d'enzyme, ce qui conduit à des désorganisations cellulaires irréversibles qui provoque la mort cellulaire. Il en est de même quand l'oxydation touche l'ADN (Rolland Y, 2004)

Au titre d'exemple, des études ont montré que l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea* sur une huile végétale : L'huile de soja, présente un effet antioxydant et qu'elle a permis une stabilisation du saindoux. (N. Bouzouita et al 2008)

Les antioxydants sont des molécules qui fixent les radicaux libres et protègent les protéines essentielles et qui diminuent ou empêchent l'oxydation d'autres substances chimiques (Weber B 2009).

III.1.2. Les méthodes d'évaluation de l'activité anti-oxydante:

III.1.2.1 test par DPPH :

Le DPPH (1,1 Diphényl 2 PycrilHydrazil) est un radical libre stable de couleur violette intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne). (Rolland, 2004).

Le phénomène de donation d'électrons par les huiles essentielles est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette

d'une solution du radical libre DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) dilué en méthanol (Burits et Bucar, 2000).

Le piégeage des radicales libres activités de chaque solution a ensuite été calculé selon la relation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 100(A(\text{blank}) - A(\text{échantillon})) / A(\text{blank})$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol),

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

L'activité anti-oxydante des HE a été exprimée en CI50, définie comme la concentration de la substance d'essai nécessaire pour provoquer une diminution de 50% en DPPH initiale de concentration. Toutes les mesures ont été effectuées en triple.

III.1.2.2. Test de blanchissement du β-carotène :

- **Principe :**

L'activité anti-oxydante des échantillons est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β-carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (In Avlessiet al., 2004).

L'activité anti-oxydante relative des échantillons (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$AAR = \text{Abs } t=48h (\text{échantillon}) / \text{Abs } t=0 (\text{échantillon})$$

AAR : activité anti-oxydante relative

Abs t=48h : absorbance lue à 490nm après 48h.

IV. Les pesticides :

Le terme "**pesticides**" est une nomination générique contenant toutes les molécules ou produits (formulations) qui éliminent ou diminue la croissance des organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés dans le secteur agricole ou dans d'autres domaine d'applications D'une manière plus précise, les pesticides ou produits phytosanitaires, sont définis comme des substances dont les propriétés chimiques contribuent à la protection et la conservation des plantes cultivées et des produits récoltés. (ACTA, 2005).

La première utilisation des pesticides en agriculture date de l'ancienneté. Leur développement a ensuite suivi celui de la chimie minérale. Les composés alors employés étaient des dérivés de composés minéraux ou de plantes comme par exemple, ceux à base d'arsenic, de cuivre, de zinc, de manganèse ou de sulfate de nicotine. Puis, à partir de la seconde guerre mondiale, les pesticides ont bénéficié du développement de la chimie organique. Les composés synthétiques majoritaires ont d'ailleurs été à l'origine de l'expansion rapide des produits phytosanitaires à partir des années 1940. (**Miquel La qualité de l'eau et l'assainissement en France**).

Les produits phytosanitaires permettent la régulation de la croissance des plantes et la conservation des récoltes. Ils améliorent ainsi à la fois la quantité et la qualité des denrées alimentaires.

Ils englobent tout un large spectre de composés et peuvent être classés suivant leur origine, leur structure chimique et leur usage. Suivant ce dernier critère,

Les pesticides regroupent les insecticides, les herbicides et les fongicides utilisés pour la protection des cultures. (**Matthews, 1981**).

IV.1. Les insecticides et activité insecticides :

La plupart des insecticides sont des substances neurotoxiques (**Scotti, 1978**), elles conduisent à une hyperactivité générale, perturbant les mouvements, l'alimentation et entraînent des tremblements et ou des convulsions, aboutissant à la paralysie et à la mort de la cible (**Regnault-Roger, 2002**). D'autres par contre agissent sur les mécanismes respiratoires et pénètrent dans la cible soit par contact, soit par ingestion ou encore par inhalation (**Regnault-Roger, 2002**).

Les huiles essentielles extraites par hydro distillation de deux plantes aromatiques de l'Afrique occidentale *Melaleucaquinquenervia* (L) et *Ocimumgratissimum* (L) ont été testées par fumigation à différentes concentrations à une température de $27,5 \pm 0,2^{\circ} \text{C}$ et à une humidité relative de $80,3 \pm 1,6 \%$.

Ces analyses montrent que ces huiles présentent une activité insecticide et entraînent, chez les femelles de *C. maculatus*, une réduction très significative de la ponte par rapport à celle dans le témoin. L'huile essentielle de *M. qinquenervia* (L) avec une $CL_{50} = 3,09 \mu\text{l l}^{-1}$, semble plus efficace que celle de *O. gratissimum* (L) (**Badama Philomène et al 2004**).

VI.2.L'activité antibactérienne:

Les qualités antimicrobiennes des HE sont reconnues et appliquées depuis longtemps, mais cette application s'établissait sur des pratiques traditionnelles (**Hala G.M., et al 2000**) et des utilisations sans bases scientifiques précises. On citera comme exemple l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle (**Beylier-Maurel M.F 1976**) et qu'en 1919 Gatte Fosse a montré qu'une émulsion à 1% d'huile de pin avait anéanti en 5 minutes le bacille de Koch.

A présent, leur utilisation est fondée sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de multiples travaux de recherche s'appuient sur les caractéristiques antimicrobiennes des HE des plantes aromatiques (**Cox S.D., et al 2000, Dorman H.J. & Deans S.G 2000**)

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles n'est pas probablement dû à un seul mécanisme mais plutôt à différents sites d'action au niveau cellulaire, du fait de leur variabilité des quantités et des profils de ses composants, (**Carson et al., 2002**).

Il convient de rappeler, qu'une variété d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries a été constatée comme le trouble de la membrane cytoplasmique, Le dérèglement de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Davidson, 1997**).

Le mode d'action des huiles essentielles relève en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur facilite la pénétration dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Ce qui peut dégager une altération de l'aspect de la membrane (**Cox et al., 2000; Carson et al., 2002**).

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été clairement décrite (**Wendakoon et Sakaguchi, 1995**). Les HES peuvent aussi bloquer la synthèse de DNA, ARN, des protéines et des polysaccharides (**Cox et al., 1991**).

D'autres utilisations médicales sont analysées. Les travaux de (**Jafri et al., 2001**) ont confirmé la disposition de l'huile essentielle de cardamome à borner la formation d'ulcères gastriques dégagés par l'éthanol. Il a également été confirmé que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'oestradiol (**Monti et al., 2002**). Des études essaient également d'examiner les effets des

huiles essentielles sur le comportement ou d'estimer leur efficacité dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues, comme la nicotine (Zhao et al. 2005).

IV.2.1. les méthodes utilisées :

○ **Méthode des disques :**

Cette méthode est nommée aussi technique de l'antibioaromatogramme a été pratiqué pour tester et mettre en évidence l'activité antimicrobienne (Jacob M., et al 1979).

Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures de chaque souche microbienne est préparée avec le bouillon nutritif dilué

Des boîtes de pétri contenant la gélose sont inoculées par la suspension bactérienne. Les boîtes sont ensuite séchées sous hotte à flux laminaire.

Un disque de papier filtre de 6 mm de diamètre (WhatmannOI, England) est arrosé de l'huile essentielle puis conservé sur une boîte de pétri et le tout est entreteu pendant 18 à 24 heures à 30°C pour les bactéries Gram négatif et 37°C pour les bactéries Gram positif.

Après 18 à 24 heures d'incubation, on remarque la constitution d'une zone ou un halo clair autour du disque si l'huile essentielle entrave le développement microbien. Plus la zone d'inhibition est importante, plus le germe est sensible.

○ **Méthodes des puits :**

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'H.E. à l'aide d'un puits contenant l'huile essentielle à étudier en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. La méthode consiste à créer un trou circulaire vertical dans le milieu gélosé. Chaque puits est rempli l'huile solubilisé dans un solvant spécifique. (Chah K.F et al 2006).

○ **Méthode de dilution :**

Le milieu de culture se mélangedirectementà l'huile essentielle en concentration connue, qu'il soit solide ou liquide avec une dispersion bien homogène. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes et, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique, car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (BOUSBIA, 2004).

○ **Méthode de microatmosphère :**

Cette méthode constitue une approche pour l'étude de l'activité antimicrobienne des vapeurs de produits volatils (BILLERBECK, 2007).

Selon BOUSBIA (2004), cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imbibé d'H.E. sur le couvercle d'une boîte de Pétri, sans que l'H.E. entre en contact avec la

gélose ensemencée par les micro-organismes. Une fois La boîte est fermée, il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées.

Cette méthode n'évalue pas l'activité antimicrobienne réelle mais elle montre uniquement la sensibilité du microorganisme présent aux constituants volatils à la température d'incubation(BOUSBIA, 2004).

IV.3. Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants :

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas encore clarifié (Burt, 2004).Et ce à cause de la variété de leurs molécules, l'activité antibactérienne paraît être le résultat d'une composition de plusieurs modes d'action, incluant différentes cibles cellulaires.

L'hydrophobicité se présente comme étant la principale caractéristique des molécules composant les huiles essentielles. Elle facilite leur solubilisation dans les membranes, ce qui déclenche une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema et al. 1994).Ces variations déclenchent la fuite d'ions et de composés intracellulaires (Carson et al. 2002).Si la perte de matériel est vraiment forte ou si les éléments cytoplasmiques relégués sont nécessaires à la survie de la bactérie, cela cause la mort cellulaire.

La manière d'agir de certaines molécules antibactériennes a été suffisamment détaillée dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent avoir la capacité d'accentuer la perméabilité membranaire (Lambert et al., 2001).En abîmant la membrane extérieur des bactéries Gram négatives, ils accroîtraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (Helander et al., 1998).Le mode d'action du carvacrol a été aussi bien examiné sur B Creus. Ce composé pénètre dans la bicouche lipidique et se place entre les chaînes d'acides gras.

Cette dénaturation de la structure augmente la fluidité membranaire, engendrant une modification de la perméabilité passive. Lorsqu'on expose les bactéries au carvacrol, on enregistre une diminution de l'ATP intracellulaire, mais aussi une baisse du potentiel membranaire.

Cet examen est démontré par la mesure du gradient de pH à travers la membrane plasmique. Le carvacrol en créant des canaux dans la membrane il permet la fugue des ions (Ultee et al., 2002). En plus de limiter la croissance, le carvacrol a la capacité de bloquer la production de toxines chez *B. cereus*. Deux probabilités ont été citées : soit l'exportation active des toxines hors de la cellule est devenue impossible à cause du manque d'ATP ou de la diminution de la force protomotrice, soit le faible taux d'ATP restant dans la cellule est utilisé par la bactérie pour survivre (Ultee et Smid, 2001).

L'action du thymol a été examinée sur des membranes artificielles (Trombetta et al., 2005). Son efficacité résulte de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il s'infiltré dans la membrane plasmique, il semble abîmer sa perméabilité et conduire à une perte du matériel intracellulaire. De plus, après avoir franchi la membrane, il peut interagir avec des sites intracellulaires. Des cellules de *L. monocytogenes*, exposées à des huiles essentielles de thym, ont été constatées à l'aide du microscope électronique à transmission (Rasooli et al., 2006).

IV.4. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques :

La résistance des bactéries aux antibiotiques n'a pas cessé de susciter des problèmes depuis des années, la seule possibilité qui semble pouvoir remplacer l'usage des antibiotiques semble être celle des huiles essentielles. Découverte de façon expérimental depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse a été scientifiquement démontrée "in vitro" et "in vivo" (CAREL, 2006).

Des chercheurs de l'université de Manchester (Royaume-Uni) ont affirmé que ces produits sont actifs contre des germes pathogènes résistants aux antibiotiques tels que :

S. aureus, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans* et *Herpes simplex* sont résistants à la méthicilline (MRSA), la pénicilline, la vancomycine, l'azolé, et à l'acyclovir respectivement.

Ceci est dû au mécanisme original des H.E. (BOUAOUN et al., 2007). Selon INOUYE et ABE (2007), l'efficacité des antibiotiques dépend de la dose et du temps de contact. Des expériences sur des animaux de laboratoire ont montré que l'efficacité des antibiotiques reste toujours limitée. Les H.E., contrairement aux antibiotiques, sont conçues de si nombreuses molécules que les bactéries même en mutant ne peuvent y résister. (ENRICO et al., 2004).

Certaines d'entre ces plantes ont fait leurs preuves au laboratoire, d'autres par contre, restent dans les déclarations des utilisateurs, sans aucune vérifications scientifiques.

V. Les huiles essentielles à étudier :

V.1. *Origanum compactum* :

Cette plante aromatique est originaire d'Afrique du Nord .Ses feuilles vert foncé au goût piquant sont ovales et pointues, ses fleurs sont groupées en inflorescences compactes, odorantes, de couleur rose pourpre.

Origanum huile, qui est utilisé comme un agent aromatisant alimentaire, possède un large spectre d'activité antimicrobienne in vitro dans attribués à la haute teneur en dérivés phénoliques tels que le carvacrol et le thymol(VijayaManohar, et al 2001).

V.1.2. *La composition chimique :*

L'analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) de l'huile essentielle, montre la présence de 32 constituants. Le carvacrol (30,53%), le thymol (27,50%) et son précurseur γ -terpinène (18,20%) sont les principaux composants. (Bouhdid, S.et al.. 2008).

Les résultats de Ben Hammou et al.2011 ont aussi montré que le composé le plus abondant dans la composition chimique de cette huile essentielle est le carvacrol (36.31%), suivi par le le thymol (16.88%),p-cymene (9.21%). Autre composés aussi présents avec un faible pourcentage tel que α - terpinene (2.33%), isocaryophyllene (2.01%), and linalool (1.35%) werefound in minor percent.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans les études précédentes. Les monoterpènes aromatiques principalement présentés dans le genre *Origanum* sont: p-cymène, le thymol, carvacrol et leur précurseur, γ -terpinène(Skoula et al, 1999.).

L'analyse des huiles essentielles de *O. compactum* de différentes régions marocaines a révélé la présence de trois principales composantes présentant les taux variables; thymol (0 à 43,4%), le carvacrol (3,8 à 71%) et le p-cymène (0 à 25,4%) (Van Den Broucke et Lemli, 1980). Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs (Bouchra et al, 2003, Lahlou et Berrada, 2001).

V.1.3. Les activités biologiques de l'huile essentielle

Cette huile essentielle présente une activité antibactérienne contre des différentes souches de référence en milieu liquide. Elle présente une activité plus importante en milieu solide, elle inhibe la croissance de toutes les souches testées, sauf les *Pseudomonas* qui manifestent une résistance.

En milieu liquide les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et minimale bactéricide

Concentration (CMB) sont entre de 0,0078 à 0,25% (v / v).

L'activité anti-oxydante a été étudiée par deux méthodes différentes: 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) test de balayage radical, β -carotène blanchiment.

Les résultats de cette étude ont révélé des preuves que l'huile essentielle d'*O. compactum* possède un effet antioxydant avec tous les essais, l'activité anti-oxydante est fonction de la concentration en huile et peut être attribuée à des composés phénoliques présents dans l'huile. (Bouhdid, S. et al., 2008)

L'importante action antibactérienne démontrée par l'huile essentielle d'*Origanum compactum* est en relation avec sa forte teneur en carvacrol et en thymol. Ces composés phénoliques sont réputés avoir une grande action antibactérienne (A. Ultee et al 2000).

Tableau 3 : L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* en milieu solide et liquide.

Bactéries	sources	Diamètre d'inhibition	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i>	MBLA	27	0.0078	0.0078
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT976	12	0.0312	0.1250
<i>Bacillus subtilis</i>	DCM 6633	25	0.0312	0.0312
<i>Enterococcus faecium</i>	CECT 410	22	0.0312	0.0312
<i>Escherichia coli K12</i>	MBLA	20	0.0625	0.0625
<i>Escherichia coli serovar</i>	CECT 4076	20	0.1250	0.2500
<i>Listeria monocytogenes serovar</i>	CECT 4032	15,5	0.0625	0.1250
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CECT 378	0	0.2500	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IH	2	>1	>1

CMB : concentration minimale bactéricide CMI : concentration minimale d'inhibition

V.2. *Cedrus atlantica* :

Le genre *Cedrus*, nom d'origine grec « kedros », est classé parmi les plantes à graines (spermatophytes) et plus précisément les plantes à ovules nus (gymnospermes). Il porte des cônes (*Coniferophyta*) constitués d'écaillés disposées en spirale. (**L. Emberger, 1998**)

V.2.1 *Composition chimique* :

L'huile essentielle est constituée en majeure partie de produits sesquiterpéniques bicycliques de jonction cis.

L'hydro-distillation du bois de *Cedrus atlantica* se fait avec un rendement de 2,78% en huiles essentielles, dont la E- α -atlantone (28,75%), le β -himachalène (14,62%), l'himachalol (7,11%), l'a-himachalène (5,72%), la Z- α -atlantone (5,16%), le γ -himachalène (4,82%), la déodarone (4,42%), l'isocédranol (3,52%) et le 1-épibénéol (2,71%). La distillation fractionnée a donné quatre fractions, la première riche en alcools (26,40%) et cétones (32,74%), la seconde caractérisée par l'abondance des cétones (38,73%), des sesquiterpènes (25,79%) et des alcools terpéniques (15,01%), la troisième et la quatrième dominées par les cétones (42,16% et 44,38%) et les sesquiterpènes (27,75% et 27,97%). Le biotest, réalisé avec cette huile essentielle brute et ses fractions, a montré une activité antimicrobienne principalement chez les fractions riches en terpénols. Ces huiles essentielles peuvent être considérées comme une source naturelle de produits antimicrobiens et insecticides. (**SATRANI Badr 2006**)

V.3. *Citrus Aurantium*

Citrus aurantium L. (Rutaceae), communément appelé orange amer (nom local: laranja-amarga, laranja-Azeda, laranjacavalo), est utilisé dans la médecine populaire brésilienne et d'autres pays pour traiter l'anxiété, l'insomnie, et l'épilepsie. (Sanguinetti E. E., 1989) (Gruenwald J., 2000). Les extraits de *Citrus aurantium* sont commercialisés comme étant une alternative d'éphédra dans les produits de perte de poids à base des plantes, mais *C. aurantium* peut également entraîner des effets néfastes sur la santé.

V.3.1. *composition chimique de l'huile essentielle du zeste* :

Des résultats de l'Italie ont montré que le limonène présente 94,3% de la composition chimique, suivie par le myrcène (1,88%), le linalol (0,78%) et l' α -pinène (0,4%) (Caccioni et al., 1998). Un peu plus récemment, Moraes et al. (2009) ont étudié la composition de l'huile de zeste de *C. aurantium* brésilien et trouvé que le limonène (97,5 à 98%), myrcène (1,2 à 1,45%) et l'octanol (0,34 à 0,54%).

V.4. *Citrus Aurantium* feuilles :

V.4.1. *composition chimique* :

Caractérisation chimique par chromatographie gazeuse / spectrométrie de masse de gaz et GC / détection par ionisation de flamme permis l'identification de 46 composés, et une notable différence quantitatives et qualitatives entre les différents échantillons de Petitgrain selon le moment de la récolte. Linalool (43,2% à 65,97%), l'acétate de linalyle (0,77% à 24,77%), et α -terpinéol (9,29% à 12,12%) ont été les principaux composants. Le nombre le plus important de composants a été enregistré pour l'été OE (Juillet et Septembre) (In`es Ellouze, et al 2012).

V.4.2. *Activités biologiques* :

Cette huile essentielle citrus feuilles présente une faible activité anti-oxydante cela peut s'expliquer, du point de vue chimique, par l'absence des produits phénoliques. (In`es Ellouze, et al 2012)

Les activités antibactériennes (12 micro-organismes) ont été enregistrées contre les bactéries Gram-positives [*Bacillus subtilis* (CMI = 2,7 mg / mL), *Staphylococcus aureus* (4,8 mg / ml)], et et les levures [*Saccharomyces cerevisiae* (9,2 mg / ml)] et les champignons [*Mucor ramannianus* (5 mg / ml)].

Des corrélations positives entre les composés identifiés et les activités antimicrobiennes ont été notés. De nombreux composés ont été corrélés à l'activité antimicrobienne principalement de l'oxyde de caryophyllène contre *Escherichia coli* ($R^2 = 0,99$), *S. cerevisiae* ($R^2 = 0,99$), et *Fusarium culmorum* ($R^2 = 0,99$).

VI. Plan d'expérience:

Les plans d'expériences aident de classer au mieux les essais au cours d'une recherche scientifique ou des études industrielles (GOPY 2001). On obtient alors le

maximum de renseignements avec le minimum d'expériences. Pour cela, il faut suivre des règles mathématiques et adopter une démarche rigoureuse (BOX George.E. P et al 2005)

En ce qui concerne les plans d'expériences ordinaires (plans factoriels, plans pour surfaces de réponse) les facteurs sont toujours indépendants, cela nous permet de choisir le niveau d'un facteur quels que soient les niveaux déjà attribués aux autres facteurs. au titre d'exemple, si, pour un plan 2⁴, on a choisi les niveaux des trois premiers facteurs, on pourra encore choisir librement les niveaux du quatrième facteur. Cette liberté n'existe pas lorsque l'on étudie des mélanges car, en général, on étudie les réponses en fonction des proportions des constituants du mélange.

Dans ce cas les facteurs d'étude sont les proportions des constituants du mélange. Les facteurs d'étude des plans de mélanges sont les proportions des constituants du mélange (GOUPY Jacques 2000). Or, ces constituants ne sont pas indépendants les uns des autres. La somme des proportions d'un mélange est toujours égale à 100%. Le pourcentage du dernier constituant est imposé par la somme des pourcentages des premiers composés.

La teneur de chaque constituant reste comprise entre 0 et 100 %. Lorsqu'on augmente la teneur de l'un des constituants, la teneur des autres est automatiquement diminuée pour que la somme de toutes les teneurs reste égale à 100 %.

Le pourcentage du dernier constituant est imposé par la somme des pourcentages des premiers composés. C'est la raison pour laquelle les plans de mélanges sont traités à part.

Les plans de mélanges sont aussi caractérisés par de nombreuses contraintes qui peuvent peser sur le choix des proportions des constituants. Par exemple, la concentration d'un produit doit être au moins de x pour-cent ou cette concentration ne peut excéder une valeur donnée. En fonction de ces contraintes la planification de l'étude est modifiée et elle doit être adaptée à chaque cas.

Partie Pratique

VII. Matériels et méthodes

A. *Matériels :*

1. *Les huiles essentielles :*

Le choix des plantes est basé sur une recherche bibliographique visant les plantes médicinales et aromatiques ayant la composition chimique différentes et de leur disponibilité au Maroc.

Les plantes retenues ont subis une hydro-distillation sont :

- **L'origanumcompactum**
- **Cedrusatlantica**
- **Citrus Aurantium(Zeste)**
- **Citrus Aurantium (feuilles)**

2. *Les souches bactériennes :*

Pour le criblage des huiles on a travaillé sur 10 souches bactériennes :

Tableau 4 les noms des bactéries testés :

Bactéries	Coloration de gram	source
Euterococusintestinals	Gram Positif	ATCC 3065
Escherichia coli	Gram négatif	ATCC 25922
Staphylococcus aureus	Gram Positif	ATCC 29213
Pseudomonas aeruginosa	Gram Négatif	ATCC 27853
Bacillus sustilis	Gram Positif	ATCC 3366
Staphylococusepidermidis	Gram Positif	ATCC 12228
Enterococusficalis	Gram Positif	ATCC 29212
SalnouellaSp	Gram Négatif	ATCC 29215
Enterobacteraerogenes	Gram Négatif	ATCC 13048
Staphylococcus aureus (R)	Gram Positif	ATCC 29214

3. *Les insectes :*

Le puceron vert du pêcher (*myzuspersicae*)est un insecte nuisible majeur du pêcher, par lui se fait la transmission de nombreux virus dont la Sharka. Son action provoque généralement le flétrissement des feuilles et une nécrose des tissus.

B. *Les méthodes utilisées :*

1. *Extraction de l'huile essentielle par hydro-distillation :*

L'appareil utilisé pour l'hydro-distillation est de type Clevenger, il est constitué d'un chauffe-ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place la matière végétale avec 100 ml d'eau distillée, un réfrigérant et un collecteur qui reçoit les extraits de la distillation. L'huile essentielle est conservée à 4°C dans un flacon hermétiquement fermé.

2. *Protocole du test antibactérien :*

a) Préparation de milieu de culture :

Pour des bactéries non exigeantes, on utilise la gélose nutritive comme milieu de culture.

Pour un milieu nutritif agar : On dissout 8g de bouillon Nutritif et 15g d'agar dans un litre d'eau distillée par agitation tout en chauffant pendant 30min. puis on stérilise par autoclavage (121°C /4bar/15mn).

Après stérilisation du matériel et du milieu de culture on fait couler le milieu de culture dans des boîtes Pétri, et on les met à l'étuve de 37°C pendant 18h.

Avant chaque test on s'assure de l'absence de contamination à l'œil nu.

b) Les dilutions des huiles essentielles :

Pour avoir des dilutions aqueuses des huiles essentielles on fait solubiliser 10% de l'huile essentielle dans 2% de DMSO diméthylsulfoxyde (émulsifiant).

c) Préparation de l'inoculum :

Pour procéder aux tests antibactériens on commence par la préparation de l'inoculum en suspension.

Dans les conditions aseptiques (20 cm du bec benzène ou sous hotte à flux laminaire)

On effectue un ensemencement, d'une goutte de la souche bactérienne conservée dans le glycérol 20% à -20°C, sur Nutritif agar, après 24h à l'aide d'une anse on dissout la bactérie dans de l'eau physiologique 9% de NaCl et on compare la turbidité de l'inoculum avec une solution de BaCl₂. (Soussy C. J 2011)

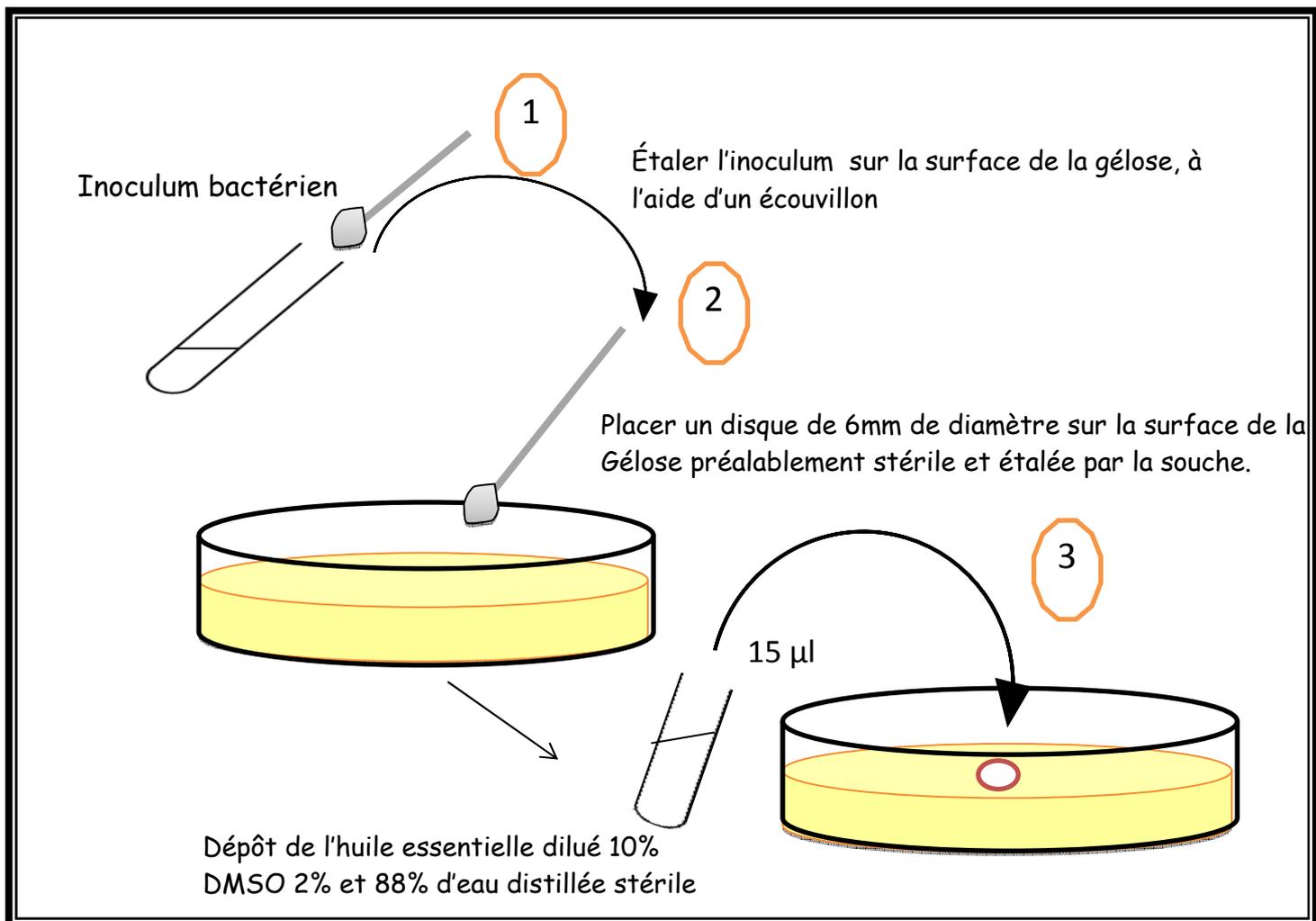
d) Préparation de l'étalon BaCl₂ :

Pour préparer l'étalon 0,5 Mc Farland on verse 0,5 ml d'une solution de BaCl₂ dihydraté à 1% (10g/l), dans une éprouvette de 100ml. Et on ajuste jusqu'à 100ml avec du H₂SO₄ à 1% (10ml/l) une fois préparé, il doit avoir une densité optique de 0,08 à 0,1 lue à 625nm. (Standardisation de l'antibiogramme en médecine vétérinaire 2005).

Après avoir la suspension bactérienne le protocole antibactérien se résume comme le suivant : **(Deshpande et al 2011)**

- Ecouvillonnage de la souche sur la gélose.
- Après le séchage de la surface gélifiée, on place un disque stérile.
- Et on finit par le dépôt de 15 μ l de l'huile essentielle diluée

Schéma représentatif des étapes d'écouvillonnage et de dépôt de l'huile essentielle



Après le dépôt de l'huile essentielle les boîtes Pétri sont mises à une température de 4°C pendant 2h, avant qu'elles aient incubées 37°C, 24h. La lecture des résultats se fait le lendemain par la mesure de la zone d'inhibition en mm.

3. *Evaluation de l'activité anti-oxydante :*

L'activité anti-oxydante a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH. Le test de DPPH est réalisé selon la méthode décrite par (Mighri et al, 2010); où chacune des solutions méthanoliques des HE testées à différentes concentrations (20mg/ml, 10mg/ml, 5mg/ml, 2mg/ml et 1g/ml et 0,5mg/ml) sont mélangées avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%). Les solutions préparées sont conservés à l'obscurité pendant 30 min, puis l'absorbance est lue à 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH par le BHT (un antioxydant de référence) a été également analysée.

4. *Activité insecticide :*

a) *Protocole :*

Selon (Tozlu, E et al 2011) on fait piéger 20 insectes par boîte Pétri, on colle un papier filtre de 9cm de diamètre sur le couvercle de boîte Pétri et on dépose l'huile essentielle sur le papier à différentes quantités 30 μ l 20 μ l 10 μ l 5 μ l et 2,5 μ l.

On ferme hermétiquement les boîtes et on note les résultats après 6h, 12h et 24h. Une boîte témoin est isolée avec de l'eau distillée au lieu de l'huile essentielle.

VIII. *Résultats et discussion :*

A. *La composition chimique :*

1. *L'Origanumcompactum :*

La composition chimique de l'huile essentielle extraite des feuilles séchées de L'origanumcompactum récoltées de la région de Taounata été étudiée par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CPG et CPG/SM). Vingt constituants, de l'huile essentielle ont été identifiés. Les composés majoritaires sont : le carvacrol (47.85%) suivit du thymole (15.74%) et Gamma terpinene en 17,25%. Nos résultats confirment ce qu'est déjà trouvé dans des travaux précédents.

Le tableau suivant présente la composition chimique

Tableau 5 la composition chimique de l'HE d'origanumcompactum

<i>Temps de rétention</i>	<i>Indice Kovats DB-5</i>	<i>Air de Pic</i>	<i>Nom de composé</i>
5.2806	924	1.0614	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, didehydro deriv.
5.4844	931	0.6103	1S-.alpha.-Pinene
6.6833	977	0.2157	.beta.-Pinene
6.9595	987	1.4174	.beta.-Myrcene
7.5361	1007	0.2405	.alpha.-Phellandrene
7.8740	1016	2.1893	α -Terpinene
8.1369	1023	8.4457	P-cymene
8.2844	1028	0.2478	D-Limonene
8.3541	1030	0.2129	β -Thujene
9.3035	1056	17.2504	Gamma-terpinene
9.7541	1069	0.1560	Cyclohexane, 1-methylene-4-(1-methylethenyl)-
10.2878	1084	0.1168	2-Carene
10.8484	1099	1.3580	β -linalool
13.7851	1171	0.1528	Borneol
14.1257	1179	0.4292	(-)-4-Terpineol
14.7453	1195	0.1651	α -Terpinol
16.5341	1237	0.1594	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)-
18.8782	1292	15.7499	thymol
19.2563	1301	47.8524	carvacrol
24.0544	1415	1.4410	Caryophyllene

2. *Citrus Aurantium* :

Le citrus Aurantiuma été récolté du jardin de l'institut national des plantes aromatiques et médicinales, les huiles essentielles obtenues à partir du zeste et des feuilles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CPG et CPG/SM), et donne les résultats suivantes :

a) *L'huile essentielle de feuilles* :

La composition chimique de cette huile essentielle montre la présence de l'acétate de linalyle comme constituant majoritaire avec une teneur de 41,87%, linalool en 32,99%, l'alpha terpinene en 10,53% et Geranylisobutyrate en 5,67%.

Le tableau suivant présente la composition chimique

Tableau 6 : La composition chimique de l'HE Citrus Aurantium feuilles

Temps de rétention	Indice Kovats DB-5	Air de Pic	Nom de composé
6.5251	971	0.1226	Sabinene
6.9596	987	1.2269	.beta.-Pinene
8.2872	1028	0.3614	Limonene
8.4723	1033	0.3390	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-
8.8477	1043	0.7267	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-
10.8726	1100	32.9918	linalool
14.1258	1179	0.1166	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-
14.7534	1195	10.5356	Alpha-terpinene
15.9442	1223	1.5577	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-
17.0224	1248	41.8797	Acétate de linalyle
17.7814	1266	0.1489	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (E)-
19.2189	1300	0.4648	3-Methyl-4-isopropylphenol
21.6246	1357	2.8847	Geranyl butyrate
22.4560	1376	5.6753	Geranylisobutyrate
24.0518	1415	0.1744	Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-

b) L'huile essentielle du zeste :

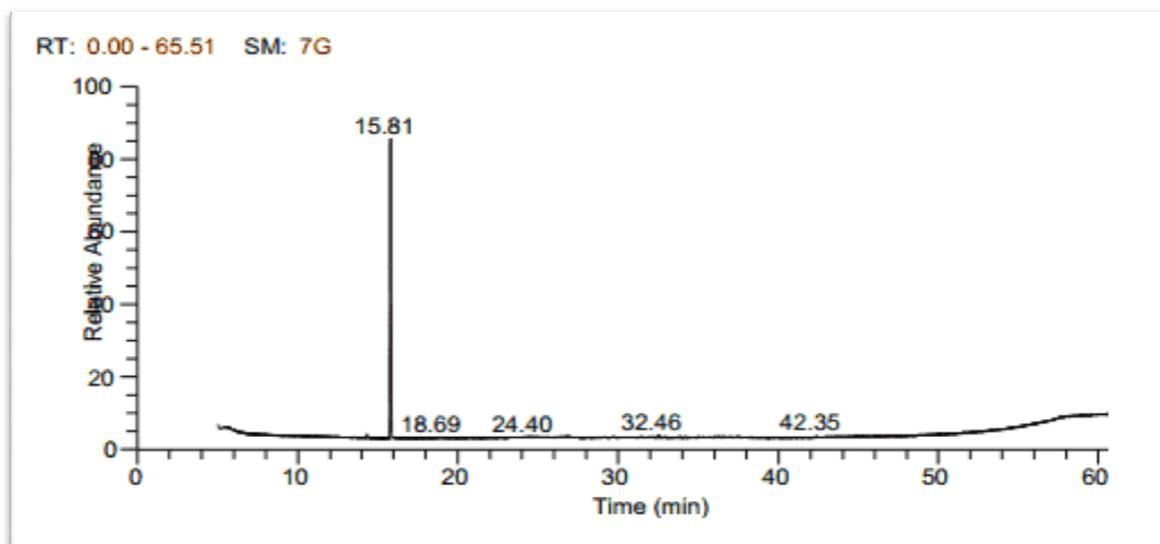


Figure 1: Profile chromatographie de l'HE de Citrus.A zeste

Ce spectre montre la forte teneur de linalool dans la composition chimique de Citrus Aurantium zeste, avec un temps de rétention de 15,81.

Tableau 7 la composition chimique de l'HE Citrus Aurantium zeste

<i>Temps de rétention</i>	<i>L'indice de Kovats</i>	<i>L'aire de pic</i>	<i>Nom de composé</i>
13,53	1165	0,45	sabinène
14,35	1185	1,43	Delta 3-carène
15,81	1220	96,23	Limonène

Cette huile essentielle est riche généralement en Limonène, il présente 96,23% de sa composition chimique.

B. L'activité antibactérienne :

Les huiles essentielles et leurs composants ont une grande importance comme agents antimicrobiens, antioxydants, et insecticides. Ce travail porte sur l'étude de ces activités des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques et médicinales de la flore marocaine vis-à-vis de deux souches bactériennes, dans le but de rechercher de nouveaux produits bioactifs naturels.

On s'intéresse dans cette étude surtout sur l'activité des mélanges des huiles essentielles, quatre huiles donnent quatre combinaisons possibles :

Tableau 8 : Les combinaisons possibles des huiles essentielles

	HE1	HE2	HE3
Le mélange N° 1	Origanum Compactum	Cedrus Atlantica	Citrus Aurantium Zeste
Le mélange N° 2	Origanum Compactum	Cedrus Atlantica	Citrus Aurantium Feuilles
Le mélange N° 3	Origanum Compactum	Citrus Aurantium Zeste	Citrus Aurantium Feuilles
Le mélange N° 4	Cedrus Atlantica	Citrus Aurantium Zeste	Citrus Aurantium Feuilles

1. Résultats de criblage :

Les quatre huiles essentielles étudiées sont testées sur dix souches bactériennes, le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Tableau 9 : L'activité antibactérienne des quatre HE sur les souches à testées

	Origanum Compactum	Cedrus Atlantica	Citrus Aurantium Z	Citrus Aurantium F
EC	14	0	0	0
PA	0	0	0	0
Bs	15	0	0	0
Ef	10	0	0	0
Sep	13	0	0	0
Sa	10	0	0	0
Ei	8	0	0	0
Ea	10	0	0	0
Sal	10	0	0	0
Sa (R)	9	0	0	0

La forte activité antibactérienne est généralement due à la présence des composés ayant un pouvoir antibactérien, Phénols› Alcools› Aldéhydes› Cétones› Ethers› Hydrocarbures. L'HE d'Origanumcompactumcontient lecarvacrol et le thymol, qui appartiennent à la famille des phénols, avec despourcentages de47,85% et de15.74% respectivement, cela explique son forte activité sur les neuf souches bactériennes testées.

L'HE du cèdre,à qui on n'a pas pu analyser sa composition chimique par faute de temps, la bibliographie révèle que les composés majoritaires sont : E- α -atlantone (28,75%), le β -himachalène (14,62%), l'himachalol (7,11%). Ils sont tous des composés terpéniques, qui ne présentent aucun pouvoir antibactérien.

Pour la deuxième huile essentielle, Citrus.A zeste on note la présence de limonène (96%), un hydrocarbure terpénique caractéristique des agrumes, cela explique l'absence de l'activité antibactérienne.

Les composés majoritaires de l'huile essentielle de Citrus Aurantium Feuille sont : l'acétate de linalyle 41,87% et l'Alpha-terpinene 10.53% qui sont des hydrocarbures.La présence d'un composé de la famille alcool linalool est marqué avec un pourcentage important va jusqu'au les 32,99%, cependant l'huile ne présente aucune activité antibactérien.

L'absence de l'activité de cette huile peut s'expliquer par un effet d'antagonisme entre les deux composés l'acétate de linalyle et l'Alpha-terpinene sur le linalool.

2. Résultats des mélanges :

On se basant sur la recommandation du logiciel plan d'expérience, qui donne les proportions suivantes :

Tableau 10 : Les proportions des HE données par le logiciel plan d'expérience

N°Exp	HE1	HE2	HE3
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,3333	0,3333	0,3333
8	0,6667	0,1667	0,1667
9	0,1667	0,6667	0,1667
10	0,1667	0,1667	0,6667

On mélange les huiles toute en respectant les fractions présentéesci-dessus.

Les quatre mélange sont testés sur deux souches bactériennes : **Bacillus subtilis (Bs)** et **Staphylococusepidermidis (sep)**

Mélange 1:Origanum.Compactum ;CedrusAtlantica ; Citrus A Zest.

Tableau 11: Constituants du mélange 1

	HE N° 1	HE N°2	HE N°3
Mélange N° 1	O.compactum	Le cèdre	C.Aurantium Zeste

Tableau 12: Résultats du mélange 1 sur les deux souches bactériennes Bs et Sep

N° des fractions	Bacillus subtilis	Staphylococusepidermidis
1	13	12
2	0	0
3	0	0
4	10	8
5	0	0
6	0	0
7	12	0
8	8	7
9	0	0
10	7	0

Le résultat du premier mélange confirme les résultats du criblage. L'origan a une activité alors que les deux autres huiles sont non actives sur les deux souches bactériennes. Le mélange de (1/3 ; 1/3 ; 1/3) donne une activité sur la souche Bs (*Bacillus subtilis*).

Mélange N° 2 : *Origanum compactum* ; *Cedrus Atlantica* ; *Citrus Aurantium* feuilles.

Tableau 13: Constituants du mélange 2

	HE N° 1	HE N° 2	HE N° 3
Mélange N° 2	<i>O. compactum</i>	Le cèdre	<i>C. Aurantium</i> feuilles

Tableau 14: Résultats du mélange 2 sur les deux souches bactériennes Bs et Sep

N° des fractions	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
1	14	12
2	0	0
3	0	0
4	11	10
5	10	9
6	8	7
7	9	8
8	10	8
9	10	9
10	8	0

Lorsqu'on change l'huile N°3 qui est l'huile essentielle de *Citrus A* zeste par celle des feuilles dans Le mélange N°2, on remarque une augmentation d'activité sur les deux souches bactériennes.

Cela peut s'expliquer par la composition chimique de *Citrus A* feuilles qui contient du linalool (alcool) qui représente les 32,99%.

Mélange N° 3 : *Origanum compactum* ; *Citrus Aurantium* Zeste; *Citrus Aurantium* Feuilles.

Tableau 15: Constituants du mélange 3

	HE N° 1	HE N°2	HE N°3
Mélange N° 3	O.compactum	C. Aurantium Zeste	C. Aurantium Feuilles

Tableau 16: Résultats du mélange 3 sur les deux souches bactériennes Bs et Sep

N° des fractions	Bacillus subtilis	Staphylococusepidermidis
1	14	12
2	0	0
3	0	0
4	12	9
5	7	0
6	0	0
7	7	7
8	14	9
9	10	9
10	9	8

Par une simple comparaison entre les résultats du mélange N°2 et N°3(tableau14) et (tableau16)

On note que l'activité antibactérienne augmente. Ce résultat est expliqué par la présence des composés minoritaire dans HE de Citrus.A zeste qui seront peut-être actives dans le mélange.

Mélange 4 : CedrusAtlantica ; Citrus Aurtium Zeste; Citrus Aurtium Feuilles.

Tableau 17: Constituants du mélange 4

	HE N° 1	HE N°2	HE N°3
Mélange 3	O.compactum	C. Aurantium Zeste	C. Aurantium Feuilles

Tableau 18: Résultats du mélange 4 sur les deux souches bactériennes Bs et Sep

M4	Bacillus subtilis	Staphylococusepidermidis
1	0	0

2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

Le mélange des trois huiles essentielles non activesne présente aucune activité. Toujours l'absence de l'activité antibactérienne s'explique par l'absence des composés phénoliques.

C. *Activité anti-oxydante :*

On remarque expérimentalement, le changement de couleur de la solution du DPPH de la coloration violet intense à une coloration jaune pâle, cela montre déjà la présence d'une activité anti-oxydante.

1. *l'Origanumcompactum :*

Notre série de dilution est analysé par un spectrophotomètreà une longueur d'onde de 517nm, les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 19: L'activité anti-oxydante de l'HE d'origanumcomapctum

Concentration (mg/l)	L'absorbance en 517,0nm	% d'inhibition
20	0,0485	95,99585257
10	0,048	95,69239017
5	0,0355	96,57583023
2	0,043	95,4577662
1	0,1611	85,00558451
0,5	0,2539	76,36820551

On calcule le pourcentage d'inhibition par la relation suivante :

$$\% \text{ inhibition} = 100(A(\text{blanc}) - A(\text{échantillon}))/A(\text{blanc})$$

Le blanc représente l'absorbance du radical DPPH avec le méthanol (teste négatif)

$$\text{Abs (DPPH+ MeOH)} = 1,0744 \text{ nm}$$

Nous avons tracés les courbes représentant la variation du pouvoir antioxydant, l'inverse de l'absorbance en fonction de l'inverse de la concentration.

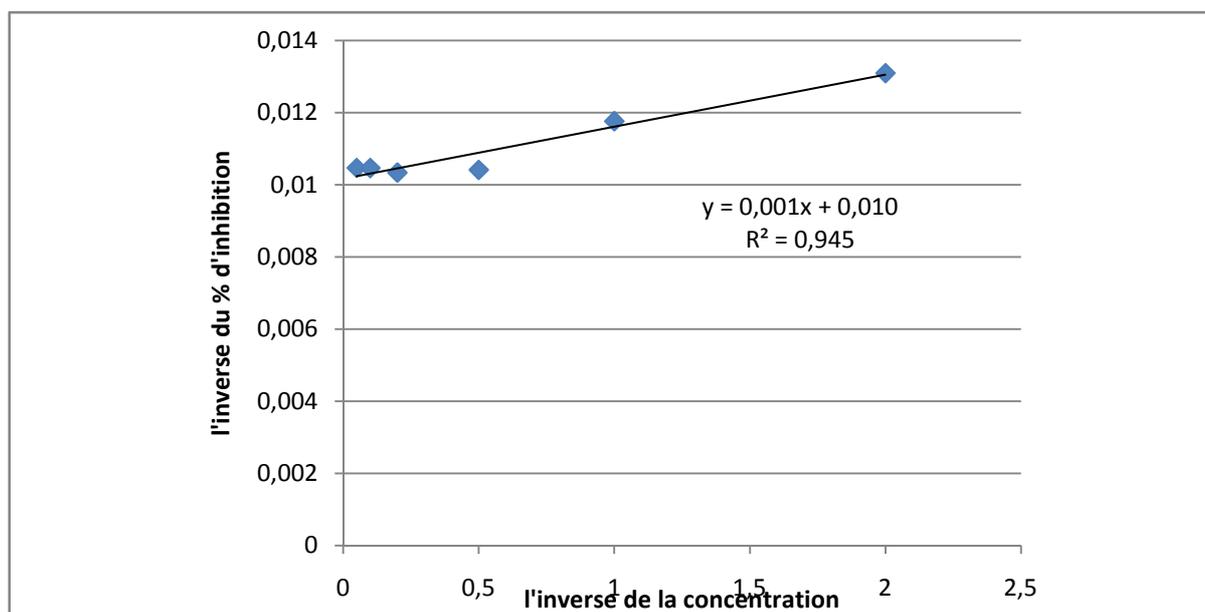


Figure 2: Courbe représentante le pouvoir antioxydant de l'HE d'Origanumcompactum

L'origanumcompactum exprime une forte activité anti-oxydante, pour les concentrations de 20 ; 10 ; 5 ; et 2mg/ml en huile essentielle l'inhibition dépasse les 95% d'inhibition.

2. CedrusAtlantica :

Tableau 20: L'activité anti-oxydante de l'HE deCedrusatlantica

concentration	L'absorbance	%d'inhibition
20	0,404	62,39761727
10	0,4707	61,18950112
5	0,5124	61,50826508
2	0,5507	55,74348474
1	0,5656	52,35666418
0,5	0,5649	47,42181683

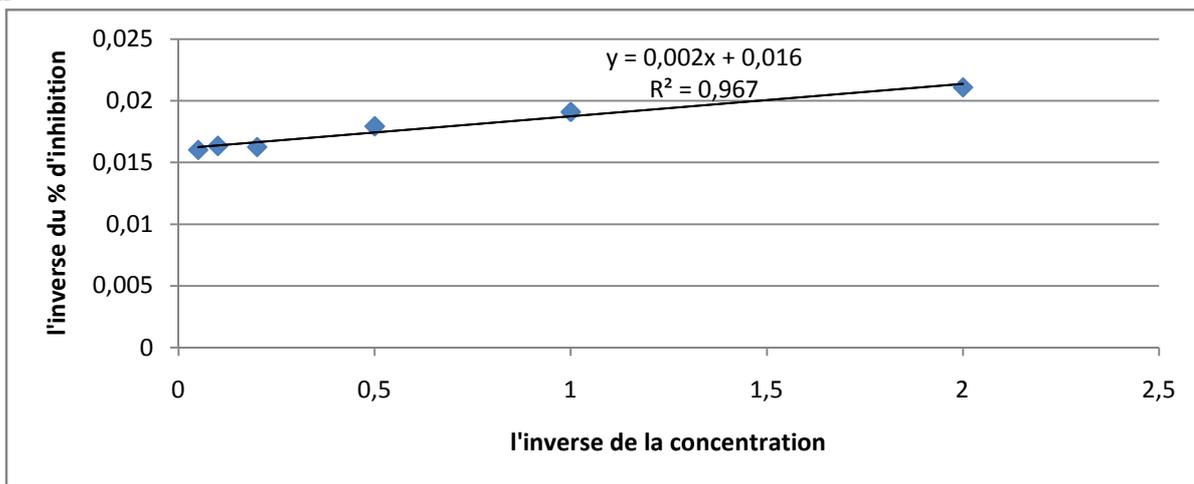


Figure 3: Courbe représentatif du pouvoir antioxydant de l'HE de cèdre d'atlas

3. *Citrus.A Zeste :*

Tableau 21: L'activité anti-oxydante de l'HE de Citrus.A zeste

concentration	L'absorbance	%d'inhibition
20	0,5387	48,8603872
10	0,55	48,8086374
5	0,57	47,9471333
2	0,5671	47,2170514
1	0,568	46,1332837
0,5	0,5688	44,0588235

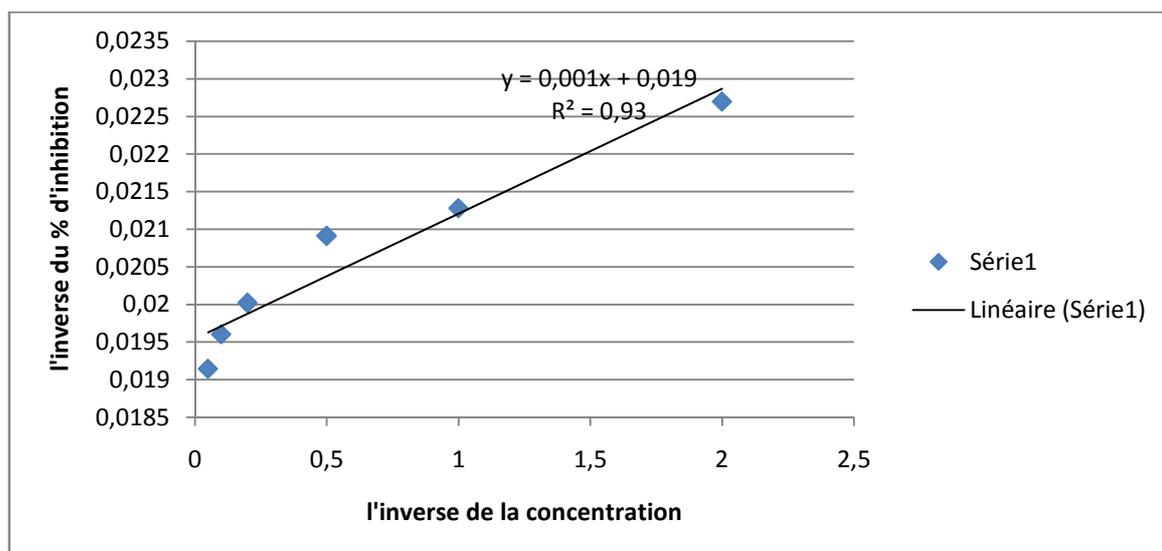


Figure 4: Courbe représentatif du pouvoir antioxydant de l'HE Citrus.A zeste

Cette huile essentielle citrus zetse présente une faible activité anti-oxydante cela peut s'expliquer, du point de vue chimique, par l'absence des produits phénoliques.

4. *Citrus. A Feuilles :*

Tableau 22: l'activité anti-oxydante de l'HE de Citrus.A Feuilles

Concentration mg /ml	L'absorbance nm	%d'inhibition
20	0,1509	85,9549516
10	0,249	76,824274
5	0,394	63,3283693
2	0,4877	57,6072226
1	0,5127	51,2803425
0,5	0,5319	42,4932986

Cette huile essentielle présente une activité anti-oxydante, à la concentration 20 mg/ml le pourcentage d'inhibition atteint les 85%, en diminuant la concentration l'activité diminue jusqu'à 42% d'inhibition à 0,5mg/ml. La courbe représente l'inverse de la concentration en fonction de l'inverse du pourcentage d'inhibition.

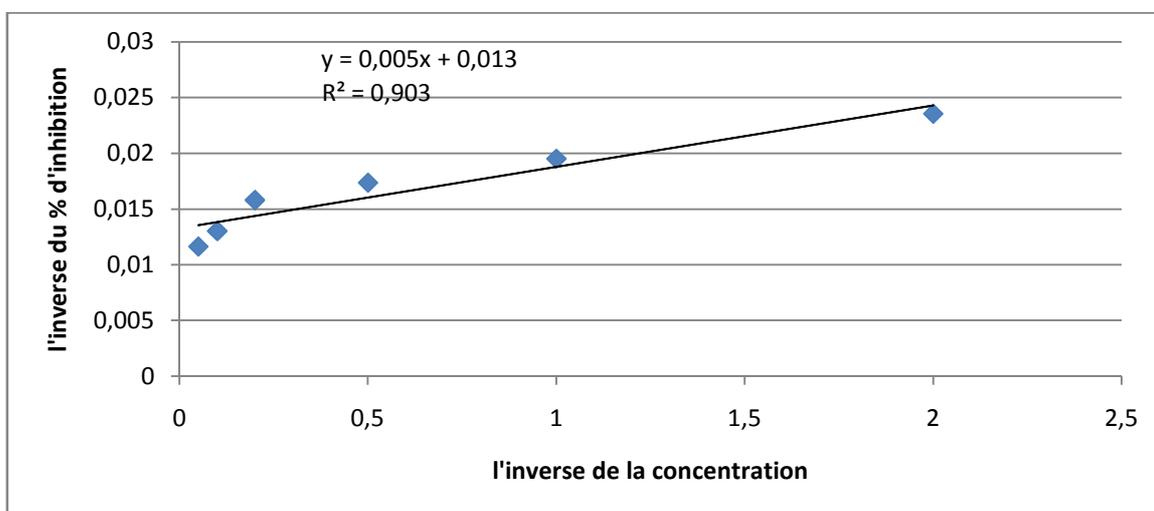


Figure 5: Courbe représentatif du pouvoir antioxydant de l'HE Citrus.A feuilles

5. *L'antioxydant BHT :*

Pour le cas du BHT Butyl-hydroxytoluène, antioxydant synthétique de référence, il exprime une bonne activité insecticide même à très faible concentration.

Tableau 23: L'activité anti-oxydante du BHT

Concentration (mg/l)	Absorbance nm	% d'inhibition
20	0,0294	97,263589
10	0,0316	97,0588235
5	0,0306	97,1518987
2	0,0309	97,1239762
1	0,0289	97,3101266
0,5	0,0327	96,9564408
0,25	0,0297	97,2356664
0,125	0,0324	96,9843634
0,0625	0,0417	96,118764
0,03125	0,0926	91,381236
0,015625	0,1961	81,7479523

Le BHT présente la meilleure activité anti-oxydante, il inhibe 81% du radical DPPH à une très faible concentration de 0,015 mg/ml

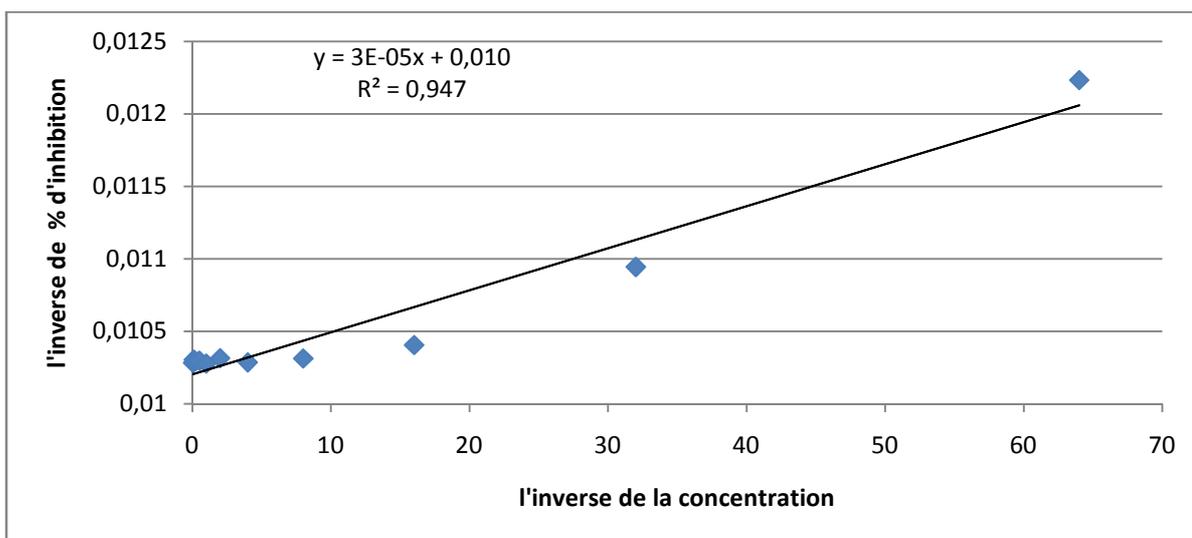


Figure 6: Courbe représentatif du pouvoir antioxydant du BHT

6. Les paramètres CI_{50} :

Le paramètre CI_{50} présente la concentration inhibitrice de l'huile essentielle qui inhibe 50% du radical DPPH, il est inversement lié au pouvoir antioxydant.

Le tableau suivant présente les valeurs de la CI_{50} des quatre HE et du BHT :

Tableau 24: le paramètre CI_{50} des quatre huiles essentielles et du BHT

HE	CI_{50} (mg /ml)
Origanumcompactum	0,14
CedrusAtlatica	0,67
Citrus Aurantium zeste	5,26
Citrus Aurantium feuilles	0,82
BHT	0,003

On note une forte activité anti-radicalaire dont la CI_{50} est de 0,14mg/ml il s'agit de l'origanumcompactum présente la plus forte activité anti-oxydante, l'HE Citrus.A zeste est le moins antioxydant son CI_{50} va jusqu'à 5,26mg/ml. Le BHT reste le meilleur antioxydant son CI_{50} est de 0,003mg/ml.

Selon des références bibliographiques (Bouhdid, Samira 2009) les huiles essentielles composées majoritairement de phénols ou d'aldéhydes montrent la meilleure action anti-oxydante, les groupements fonctionnels présents dans les composés phénoliques en général peuvent céder facilement un électron ou un proton pour neutraliser les radicaux libres. La forte activité anti-oxydante d'origan sera donc liée à sa forte teneur en phénol.

D. L'activité insecticide :

Les quatre HE ont été évalués, à différentes dilutions, pour leur effet insecticide sur l'insecte myzuspersicae de pêche, le tableau suivant résume les résultats notés après 6h, 12h et 24h.

Tableau 25: l'activité insecticide des quatre huiles essentielles

volume de l'HE en μ l	L'Origan	cèdre	Citrus.A Zeste	Citrus.A feuille
taux de mortalité après 6h				
30	100	95	100	100
20	100	95	100	100
10	100	90	100	95
5	100	70	96	92
2,5	97%	60	80	90
taux de mortalité après 12h				
30	100	100	100	100
20	100	100	100	100
10	100	100	100	100
5	100	90	100	100
2,5	100	80	90	100
taux de mortalité après 24h				

100% pour les cinq volumes de l'HE

D'après les résultats obtenus, il ressort que :

Après 6h :

Sur *myzuspersicae*, on constate que les quatre huiles ont un effet insecticide. L'huile essentielle d'*origanumcompactum* est plus efficace avec un taux de mortalité de 97% même à la plus faible concentration utilisée les deux HE de Citrus ont une activité insecticide plus grande que celle du cèdre, qui ne présente que 60% de mortalité à 2,5 μ l de l'HE.

Après 12h :

Le taux de la mortalité atteint son maximum pour les trois huiles essentielles, *O.compactum* ; Citrus.A zeste et Citrus.A feuilles. On note que l'HE du cèdre est le moins active.

Après 24h :

100% de mortalité pour les quatre huiles essentielles.

En se basant toujours sur la composition chimique on note que les produits phénoliques ont un pouvoir insecticide important. En revanche, les huiles essentielles Citrus.A feuilles et zeste expriment ce pouvoir insecticide malgré qu'ils sont constitués de composés uniquement terpéniques.

Conclusion Générale

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique.

Les huiles essentielles et leurs constituants ont une longue histoire comme agents antimicrobiens. Ce travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne, anti-oxydante, et insecticide des huiles essentielles de deux plantes aromatiques et médicinales de la flore marocaine.

Cette présente étude et des travaux réalisés sur les huiles essentielles, nous a permis de mettre l'accent sur l'activité antibactérienne du mélange des huiles essentielles : *Origanum compactum*, *Cedrus Atlantica*, *Citrus Aurantium zeste*, *Citrus Aurantium* feuilles. Nous avons l'intérêt de travailler sous les recommandations du logiciel de plan d'expérience pour avoir le mélange optimum en précisant les proportions du mélange, et pour que nos résultats soient traduits en modèle mathématique. En revanche pour procéder à cette étude par le logiciel, les quatre huiles doivent avoir une activité antibactérienne sur les souches à tester. En suite cette étude révèle que le mélange contenant l'huile essentielle de *Citrus A* feuille est plus active que celui contenant l'huile essentielle du zeste.

Les quatre huiles essentielles sont également traitées pour leur pouvoir antioxydant, et insecticide. Les résultats obtenus ont révélé que les huiles essentielles composées majoritairement de phénols montrent les meilleures activités biologiques.

Table des matières

Introduction générale	1
Partie Bibliographique	5
I. Les plantes aromatiques et médicinales :	6
I-1- Généralités :	6
II. Les huiles essentielles :	6
II.1. Définition :	6
II.2. Généralités :	7
1. - Stabilité des huiles essentielles.....	7
2. Conservation des huiles essentielles :	7
3. Intérêt thérapeutique, écologique et économique des huiles essentielles :.....	7
II.3. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles :.....	8
II.4. Méthodes d'Extraction des huiles essentielles :	9
II.4.1. L'entraînement à la vapeur d'eau :	9
II.4.2 Extraction par CO ₂ super critique :	10
II.4.3. L'expression à froid :	10
II.4.4. Extraction assistée par micro-onde :	10
II.5. Caractères chimiques des huiles essentielles :	10
II.5.1. Les monoterpènes :	11
II.5.2. Les sesquiterpènes :	11
II.5.3. Les composés aromatiques :	11
II.6. Propriétés physiques des huiles essentielles :	12
II.7. Toxicité des huiles essentielles	12
B. II.8. Les méthodes d'analyses des huiles essentielles :	14
II.8.1.Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) :	14
II.8.2.Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM)	14
III. Les activités biologiques des huiles essentielles :	15
III.1. L'activité anti-oxydante :	16
III.1.2. Les méthodes d'évaluation de l'activité anti-oxydante:	16
III.1.2.1 test par DPPH :	16
III.1.2.2. Test de blanchissement du β-carotène :	17

IV.	Les pesticides :.....	17
IV.1.	Les insecticides et activité insecticides :	18
VI.2.	L'activité antibactérienne :	19
IV.2.1.	les méthodes utilisées :.....	20
IV.3.	Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants :	21
IV.4.	Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques :.....	22
V.	Les huiles essentielles à étudier :.....	23
V.1.	Origanum compactum :	23
V.1.2.	La composition chimique :.....	23
V.1.3.	Les activités biologiques de l'huile essentielle	24
V.2.	Cedrus atlantica :	25
V.2.1	Composition chimique :	25
V.3.	Citrus Aurantium.....	25
V.3.1.	composition chimique de l'huile essentielle du zeste :	25
V.4.	Citrus Aurantium feuilles :	26
V.4.1.	composition chimique :	26
V.4.2.	Activités biologiques :	26
VI.	Plan d'expérience:.....	26
	Partie Pratique	28
VII.	Matériels et méthodes.....	29
A.	Matériels :	29
1.	Les huiles essentielles :	29
2.	Les souches bactériennes :.....	29
3.	Les insectes :.....	29
B.	Les méthodes utilisées :.....	29
1.	Extraction de l'huile essentielle par hydro-distillation :.....	29
2.	Protocole du test antibactérien :	30
3.	Evaluation de l'activité anti-oxydante :.....	32
4.	Activité insecticide :	32
VIII.	Résultats et discussion :.....	32
A.	La composition chimique :	32
1.	L'Origanum compactum :.....	32
2.	Citrus Aurantium :.....	33
B.	L'activité antibactérienne :.....	35
1.	Résultats de criblage :	35

2. Résultats des mélanges :	37
C. Activité anti-oxydante :	40
1. l'Origanum compactum :	40
2. Cedrus Atlantica :	41
3. Citrus.A Zeste :	42
4. Citrus. A Feuilles :	43
5. L'antioxydant BHT :	43
6. Les paramètres Cl_{50} :	44
D. L'activité insecticide :	45
Conclusion Générale	47