



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah



Année universitaire 2010-2011

Master Sciences et Techniques : BM

Biotechnologie Microbienne

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de
trois extraits de Plantes Médicinales et Aromatiques
cultivées dans le jardin de l'institut national des plantes
médicinales et aromatiques -Taounate**

Présenté par:

BALOUIRI Mounyr

Encadré par:

Pr. S.IBNSOUDA KORAICHI

Pr. A. FARAH

Mme. S. EL ABED

Soutenu le 27 Juin 2011 devant le jury composé de:

Pr. Saad IBNSOUDA KORAICHI : Encadrant

Pr. Abdellah FARAH : Encadrant

Pr. Abdellah HOUARI : Examineur

Pr. Naima ELGHACHTOULI : Examineur

Faculté des Sciences et Techniques - Fès

B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES

☎ 212 (0) 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 35 60 82 14



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: BALOUIRI Mounyr

Année Universitaire : 2010/2011

Titre: Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de trois extraits de Plantes Médicinales et Aromatiques cultivées dans le jardin de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques-Taounate

Résumé

Le travail que nous avons réalisé a été consacré à l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits aromatiques de trois plantes aromatiques et médicinales de la région de taounate : Saugue officinale (*Salvia officinalis*), Romarin (*Rosmarinus officinalis*), et Lavande stéchine (*Lavandula stoechas*)

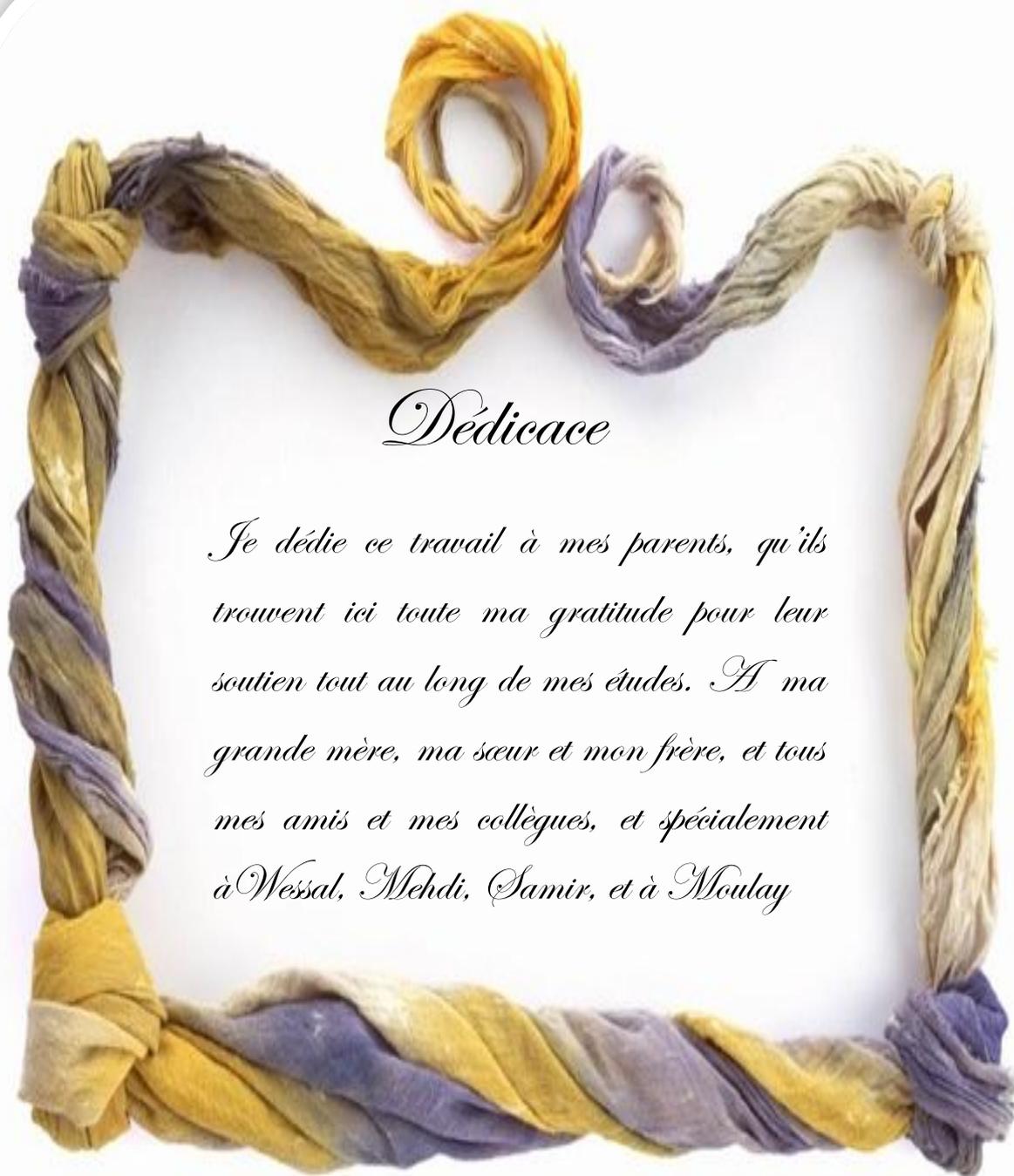
Dans l'ensemble, les huiles essentielles des trois plantes obtenues par hydrodistillation présentent des activités inhibitrices vis-à-vis des souches *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Une forte résistance de *Pseudomonas aeruginosa* a été notée.

Les analyses chromatographiques (CPG/FID) montrent que Le camphor et le 1.8 cinéole semblent être des composés majoritaires des trois plantes. L' α et β -pinène, le borneol, et le camphène se trouvent avec des pourcentages relativement élevés dans le romarin et la saugue officinale.

L'activité inhibitrice des extraits aromatiques obtenus par macération à froid et par sonication est enregistrée sur les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*). Cette activité est inférieure à celle des huiles essentielles.

Nous avons étudié l'influence de la méthode d'extraction sur le rendement et sur la teneur en polyphénols totaux des extraits méthanoliques. Les résultats montrent que la sonication est la plus reproductible et la plus économique.

Mots clés : Huile essentielle, extrait méthanolique, CPG/FID, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula stoechas*, sonication



Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études. À ma grande mère, ma sœur et mon frère, et tous mes amis et mes collègues, et spécialement à Wessal, Mehdi, Samir, et à Moulay

Remerciements

Le travail présenté a été effectué au sein du laboratoire d'extraction et de synthèse chimique de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate et au sein du laboratoire de Biotechnologie Microbienne à la faculté des sciences et techniques Fès, sous l'encadrement des professeurs : **Pr. Saad IBNSOUDA KORAICHI**, **Pr. Abdellah FARAH** et l'Ingénieure **Soumya EL ABED**. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements d'avoir accepté de m'encadrer durant ce travail. Leur soutien scientifique, leurs remarques et critiques, leur modestie m'ont aidé à mener à bien ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Messieurs **Abderrahim SAIDI** l'Ingénieur en Technologie des matières organiques, l'Ingénieur **Aziz**, le Botaniste de l'INPMA **Abdesalam ENNABILI**, Monsieur **SOIADROU** et à tous les doctorants du laboratoire d'extraction-synthèse chimique et du laboratoire de Biotechnologie microbienne, pour leur aide et leur disponibilité durant ce travail.

Je tiens à remercier **Pr. Mohammed HOUSSAINI IRAQUI**, responsable du master « Biotechnologie Microbienne » pour m'avoir autorisé à m'inscrire dans ce master afin de suivre mes études. L'ADN qui était autrefois de la science fiction, aujourd'hui n'a plus de secret pour moi et cela je te le dois Monsieur. Je tiens aussi à remercier tous les enseignants de la formation pour les efforts précieux et considérables qu'ils ont accomplis pour assurer notre formation universitaire.

Mes remerciements vont aussi, à **Pr. Naima ELGHACHTOULI** et à **Pr. Abdellah HOUARI** qui ont bien voulu accepter de juger ce mémoire et d'examiner ce travail de recherche. Je leur exprime mes très vifs remerciements et mon profond respect.

Je tiens à remercier **Pr. Elhoussine Derwish** , **Mr ELHARCHELI Hassan** et **Mlle EL HAJJAJI Hanane** pour leur aide, soutien, simplicité et pour leur sympathie.

Mes remerciements spéciaux à **Wessal OUEDRHIRI**, **Asmae ELHARAFI**, **ZERIOUL Jawhara** , **Samia CHERGAOUI**, **Maha HAFSSI**, **Moulay SADIKI**, **Samir El AZZAOUI**, et **AMOSSOU Gaffan** pour leur soutien, leurs encouragements durant ce modeste travail.

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui m'ont apporté leurs savoirs faire, leurs aides techniques, leurs expériences, nécessaires pour la réalisation et le développement de ce travail. Enfin je tiens à remercier toutes les personnes intéressées par mon travail et tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près, à réaliser ce travail.

Sommaire

Introduction.....	1
Partie I : Etude bibliographique.....	3
<hr/>	
I. Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales (PAM)	4
1. Importance socio-économique des PAM au Maroc.....	4
2. Plantes médicinales et aromatiques étudiées.....	5
II. Généralité sur les huiles essentielles et les extraits.....	11
1- Définitions.....	11
.....	
2- Historique	13
3- Localisation des huiles essentielles dans les plantes.....	14
4- Rôle biologique des huiles essentielles dans les plantes.....	15
5- Composition chimique des huiles essentielles.....	16
6- Domaines d'application des huiles essentielles.....	19
7- Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	22
8- Les extraits aromatiques de plantes.....	23
III. Généralités sur les techniques d'extraction.....	28
1. La distillation.....	29
2. Pression à froid.....	29
3. Enfleurage.....	30

4. Extraction assistée par micro-ondes.....	31
5. L'extraction assistée par ultrasons.....	33
6. Autres techniques d'extraction.....	36
IV. Techniques d'analyse chimique des huiles essentielles.....	38
✓ La chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	38
✓ Couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (CG/SM).....	39
.....	
Partie II : Matériel & méthodes.....	40
<hr/>	
I. Matériel biologique.....	41
1- Matériel végétal.....	41
2- Matériel microbiologique.....	42
II. Techniques d'extraction.....	43
1. Macération.....	43
2. Sonication.....	43
3. Hydrodistillation.....	45
III. Analyse chimique des extraits aromatiques.....	46
1. Révélation de la présence des flavonoïdes.....	46
2. Dosage des polyphénols totaux.....	47
IV. Analyse chimique des huiles essentielles.....	48
1. Chromatographie en phase gazeuse/FID.....	48
2. Identification des composés volatils des huiles essentielles.....	49
V. Activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits aromatiques	50

1. Préparation des suspensions des souches bactériennes.....	50
2. Préparation des solutions des extraits aromatiques.....	50
3. Méthode de diffusion sur disques.....	51
Partie III : Résultats et discussions.....	52
<hr/>	
I. Résultats de l'extraction.....	53
1- Macération.....	53
2- Sonication.....	53
3- L'hydrodistillation.....	55
II. Composition chimique des extraits aromatiques.....	58
1. Test des flavonoïdes.....	58
2. Teneur en polyphénols totaux.....	58
III. Composition chimique des huiles essentielles (CPG/FID)....	61
IV. Pouvoir antibactérien des huiles essentielles et des extraits méthanoliques	64
1- Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	64
2- Activité antibactérienne des extraits méthanoliques.....	68
Conclusion et perspectives.....	73
<hr/>	

Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de Normalisation

CAMD : Compressed Air Microwave Distillation

CG/SM: Chromatographie phase gazeuse/ Spectrométrie de Masse

CPG/FID: Chromatographie en phase gazeuse / Détecteur à Ionisation de flamme

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentration minimale inhibitrice

CURI: Centre Universitaire Régional d'interface

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

H(%): Humidité

HSV : le virus de l'herpès

IK: Indice de Kovàts

INPMA: Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques à Taounate

MAHD : Microwave Assisted Hydrodistillation

MHG : Microwave Hydrodiffusion and Gravity

Milieu LB: Milieu Luria-Bertani

MVF : Matière végétale fraîche

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAM: Plantes Aromatiques et Médicinales

Rdt (%): Rendement

Liste des figures

Figure 1 : Les 4 types de trichomes sécréteurs observés chez <i>Lavandula angustifolia</i> Mill	15
Figure 2: Exemples de structures de monoterpènes.....	17
Figure 3: Exemples de structures de sesquiterpènes	17
Figure 4: Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane.....	17
Figure 5: Exemples de structures de composés issus de la dégradation d'acides gras ou de terpènes.....	18
Figure 6: Exemples de phénols simples et leurs dérivés.....	24
Figure 7: Familles des flavonoïdes	26
Figure 8: Structure d'autres types de flavonoïdes.....	26
Figure 9: Flavonols prédominant dans les feuillages des plantes	27
Figure 10: Alambic simple à feu nu	29
Figure 11: Schéma du montage de l'expression à froid	27
Figure 12: Spectre électromagnétique	28
Figure 13: Transfert de chaleur sous chauffage classique et sous chauffage par microonde.....	28
Figure 14: Equipements ultrasoniques industriels	32
Figure 15: Propagation de l'onde sonore dans un milieu	34
Figure 16: Cycles de compression et de raréfaction induits par une onde sonore.....	35
Figure 17: Schéma résumé de la partie expérimentale.....	36
Figure 18: (Annexe 10) Photographies de microscopie électronique à balayage de feuilles de basilic.....	AN
Figure 19 : Teneur en eau des trois plantes médicinales.....	36
Figure 20: Rendement en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation.....	37
Figure 21 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.....	37
Figure 22 : Teneur en polyphénols des extraits méthanoliques.....	40
Figure 23: Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels.....	42

Liste des photos

Photo 1: Extracteur Soxhlet.....	37
Photo 2: La sauge officinale : <i>Salvia officinalis</i>	41
Photo 3: Le romarin: <i>Rosmarinus officinalis</i>	41
Photo 4: La lavande stéchade: <i>Lavandula stoechas</i>	42
Photo 5: Extracteur par ultrasons.....	44
Photo 6: Dispositif de l'hydrodistillation.....	45
Photo 7: chromatographe gazeux /FID (CURI).....	49
Photo 8: Activité antibactérienne de PM1 et PM2 vis-à-vis de <i>Bacillus subtilis</i> IL P1428B.....	70
Photo 9: Absence d'inhibition de PM1 et PM2 vis-à-vis d' <i>E.coli</i> 0128B12.....	70
Photo 10: Absence d'inhibition de PM1 et PM2 vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> A22	70
Photo 11: (Annexe 6): Inhibition totale de la souche <i>Bacillus subtilis</i> IL P1428B par les 4 huiles essentielles étudiées.....	Annexe

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques botaniques des trois principales espèces de lavandes en France.....	10
Tableau 2: Extraction assistée par ultrasons de saveurs et arômes.....	33
Tableau 3: Souches bactériennes test.....	42
Tableau 4: Masse de la matière végétale et volume du solvant utilisés pour la macération.....	43
Tableau 5: Paramètres de la sonication.....	44
Tableau 6: Quantité de la matière végétale fraîche hydrodistillée.....	45
Tableau 7: Résultats de la macération.....	53
Tableau 8: Rendements obtenus par la sonication (35 KHz) et (130 KHz).....	54
Tableau 9: Comparaison des rendements obtenus par macération et par sonication.....	54
Tableau 10: Rendements en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation.....	57
Tableau 11: Résultats de la révélation des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques.....	58
Tableau 12: Absorbances correspondantes à des différentes concentrations en acide gallique.....	59
Tableau 13 : Teneur en polyphénols totaux des extraits méthanoliques.....	60
Tableau 14 : Pourcentage des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	62
Tableau 15 : Pourcentage des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i>	63
Tableau 16 : Pourcentage des composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i> (boutons floraux et tiges + feuilles).....	64
Tableau 17: Diamètres d'inhibition (mm) illustrant l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	65-66
Tableau 18: Diamètres d'inhibition (mm) illustrant l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des plantes étudiées.....	69

Avant propos

Une partie de ce stage a été réalisée à l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate (INPMA).

L'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA) est un des établissements universitaires, de recherche appliquée, d'appui technique et d'information spécialisé dans les Plantes Médicinales et Aromatiques (PMA). Ses 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).

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. Elle est implantée à Taounate à Sahel Boutaher, à 80 Km de Fès.

Il joue, à ce titre, un rôle essentiel dans la création, la production, la formation continue et la diffusion du progrès technique dans le secteur des PMA.

La deuxième partie du stage a été effectuée au laboratoire de biotechnologie microbienne à la faculté des sciences et techniques de Fès, sous la direction du **Pr. Saad IBNSOUDA KORAICHI**. Et au Centre universitaire régional d'interface (CURI), qui a été mis en place dans le cadre du programme quadriennal 2004-2007 de développement de la recherche scientifique par l'université Sidi Mohamed Ben Abdellah (USMBA) de Fès en 2007. Le centre (CURI) vise principalement l'optimisation et la mutualisation des moyens lourds de recherche, l'incubation des projets innovants et l'instauration d'une politique de proximité université-entreprise. Il vise également la promotion, la diffusion et le transfert de technologie, la valorisation des résultats de la recherche, l'appui à la préparation et à la négociation de contrats et la gestion de la propriété intellectuelle.

Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus thérapeutiques des plantes. Ce qui a poussé les gents, à travers les siècles, à développer des utilisations et des connaissances sur les plantes médicinales et aromatiques. De plus les effets secondaires induits par les médicaments chimiques inquiètent les utilisateurs, qui se retournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Comme tous les médicaments, les plantes doivent être utilisées avec précautions puisque certaines d'entre elles provoquent aussi des effets indésirables. En considérant que les effets des plantes dues principalement à leurs principes actifs, les chercheurs ont commencé à extraire et à isoler les substances chimiques des plantes depuis le XVIII^e siècle. La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale, car elle a permis la mise au point des médicaments essentiels. A la fin des années 1960, l'OMS (Organisation mondiale de la santé) a décidé de faire participer les herboristes traditionnels aux programmes chargés de répondre aux besoins de soins de tiers du monde. Ce qui a encouragé les grandes firmes pharmaceutiques à investir d'importants capitaux pour trouver de nouvelles substances chimiques afin de les commercialiser.

Les maladies infectieuses causées par les microorganismes affectent la santé des gents, et causent de lourds dégâts au niveau économique. Ainsi de sérieux efforts ont été fournis dans le cadre de développement des antibiotiques et des antifongiques afin de remédier à ces infections microbiennes.

Aujourd'hui, la résistance des microorganismes aux antibiotiques est un problème majeur de la santé publique, comme l'attestent de nombreuses données publiées à l'étranger (Decoussera JW et *al.*, 2010). A titre d'exemple *Staphylococcus aureus*, principal agent pathogène impliqué dans des infections nosocomiales, a acquis de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques dès les années 1960 (Kempf. M et *al.*, 2011). Ainsi l'augmentation de la résistance des agents pathogènes d'origine alimentaire et les perceptions négatives des consommateurs concernant l'utilisation de fibres synthétiques bactéricides, a orienté la recherche des antimicrobiens naturels étant provenant du règne végétal (Leonard C.M. et *al.*, 2010). En effet, depuis quelques années, un intérêt accru s'est porté sur des molécules d'origine végétal ayant montré des propriétés antimicrobiennes.

Le Maroc, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément (El-Hilaly. J et *al.*, 2003). L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années.

Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits aromatiques obtenus par différentes méthodes d'extraction à partir de trois plantes aromatiques de la région de Taounate (Maroc) ; *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* et *Lavandula stoechas*.

Partie I

Etude bibliographique

I. Généralités sur les plantes aromatiques et médicinales (PAM)

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus.

Les progrès de la physiologie, puis de la pharmacologie, ont permis de comprendre les mécanismes d'action de ces substances naturelles. Depuis quelques décennies, la compréhension des relations qui existent entre la structure d'une molécule et son activité biologique permet la conception et la fabrication de médicaments synthétiques aux performances améliorées ou aux effets indésirables mieux contrôlés (Iserin. P, 1996).

1. Importance socio-économique des PAM au Maroc

La médecine traditionnelle marocaine est très riche en plantes médicinales, cette richesse est le fruit de la variabilité importante du climat due à la situation géographique du Maroc (Bellakhdar, 1978). En effet le secteur des PAM représente une importante activité commerciale au Maroc. Les espèces les plus importantes sur le plan économique sont le thym, la verveine, l'armoise et la lavande. Ces quatre espèces exportées sous la dénomination « herbes » ou « épices » sur plusieurs destinations à travers le monde constitue la colonne vertébrale du secteur des PAM au Maroc. Pour les régions de l'oriental l'armoise et le romarin sont les deux espèces qui dominent le paysage aromatique et médicinal et qui font l'objet de transactions commerciales importantes. L'exploitation du romarin procure environ 81.000 JT/an ce qui correspond à une valeur de 4.050.000,00 DH Chemonics International, Inc ., 2005).

Une étude à la province de Taounate a montré que la majorité des plantes médicinales poussent dans la nature (61%), tandis que d'autres sont cultivées (37%) et certains (1,9%) sont domestiqués. Elles sont largement utilisées dans la pharmacopée indigène pour soulager les symptômes communs des maladies cardiovasculaires (5,8%), gastro-intestinaux (24,9%), systèmes de broncho -pulmonaire (9,8%), génito-urinaire (12,2%) et la peau (9,2%) (El-Hilaly. J et *al.*, 2003).

2. Plantes médicinales et aromatiques étudiées

- La sauge officinale : *Salvia officinalis*

- ✓ Caractéristiques botaniques

- Classification

Règne : plante

Embranchement : spermaphytes

Sous embranchement : angiospermes

Classe : dicotylédones

Ordre : tubiflorales

Famille : labiées ou lamiacée

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia officinalis*

- Noms communs : Saugue officinale, herbe sacrée, thé d'Europe, nom vernaculaire en arabe "salmiya" السلمية

- Description : la sauge officinale appartient à la famille des Lamiacées, cette famille appartient aux dicotylédones et se caractérisent par des feuilles opposées, des fleurs zygomorphes à deux lèvres, presque toujours hermaphrodites et par une tige quadrangulaire.

Salvia officinalis est un arbrisseau persistant à feuilles laineuses gris-vert ou violacées (80 cm de hauteur) et à fleurs bleu-violet, la racine brunâtre et fibreuse (Photo 2). Elle se rencontre fréquemment comme plante ornementale ou comme condiment dans les jardins. C'est une plante sacrée considérée comme une véritable panacée depuis l'Antiquité ; son nom vient du latin « salvare » qui signifie « sauver » ou « guérir ».

- Habitat et culture : Originaire des pourtours de la Méditerranée, la sauge affectionne les lieux ensoleillés. On la cultive par semis au printemps. Les plantes sont remplacées tous les 3 ou 4 ans et les feuilles sont récoltées en été (Iserin. P. 1996).

- ✓ Préparations et usage traditionnel

- Infusion à partir des feuilles utilisée en gargarisme jusqu'à 3 fois par jour en cas de coup de froid, toux et rhumatisme (El-Hilaly. J et al 2003).

- Elle réduit la transpiration lorsqu'il est pris sous forme de thé, l'action commence environ 2 heures après avoir bu le thé et peut durer plusieurs jours (Fluck., 1988)..
 - Indigestion : la Sauge officinale a une certaine valeur dans le soulagement de l'indigestion avec du gaz ou la douleur spasmodique (Evans., 1989).
 - Débilité sexuelle : Brown. P (1993) a déclaré en 1875 :'' Elle est appelée par certains un remède le plus capital pour spermatorrhée, et pour le désir vénérienne excessive, et je suis de ceux qui savent d'expérience dans ma pratique, qu'il est grand pour ce qui est appelé faiblesse sexuelle lorsque son utilisation est indiquée''.
 - Soins de la peau : Pour les grands pores, la sauge peut être utile comme compresse ou infusion. Il peut être utilisé pour effet similaire à un masque. Un crème à base de sauge peut être utilisé pour les boutons de fièvre près de l'embouchure (Back 1987).
 - Baignade et lavage : elle est également utilisée dans des bains pour traiter les problèmes de peau (Stuart 1986). D'autres références citent les propriétés suivantes : cicatrisante, antiseptique, tonifiante, antirhumatismale dans des bains, pour les plaies atones, des plaies, les ulcères, les dermatoses (eczéma) (Valnet., 1986) (Spiridon E.K., 2000).
- Le romarin : *Rosmarinus officinalis*
 - ✓ Caratéristiques botaniques
 - Classification
 - Règne : plante
 - Embranchement : spermaphytes
 - Sous embranchement : angiospermes
 - Classe : dicotylédones
 - Ordre : tubiflorales
 - Famille : labiées ou lamiacée
 - Genre : *Rosmarinus*
 - Espèce : *Rosmarinus officinalis*
 - Noms communs : Encensier, herbe aux couronnes, rose des marins, rose de la mer, aziir زير comme nom vernaculaire en arabe.
 - Description : Le romarin fait partie de la famille des Lamiacées ou Labiées. Il possède donc les mêmes caractéristiques morphologiques caractéristiques et communes à l'ensemble de cette famille (Photo 3). Le genre *Rosmarinus* est représenté par trois

espèces différentes, mais *Rosmarinus officinalis* L. est la principale. Ses caractères sont les suivants :

- Arbuste toujours vert, de 60cm à 2m de haut et pouvant vivre jusqu'à 30 ans,
- Tige, à l'écorce grisâtre, écailleuse et fissurée, se divisant en rameaux opposés tortueux, nœuds distancés de 0,5 à 2mm,
- Feuilles opposées, coriaces, sessiles, linéaires, entières, de 1,5 à 4,5cm de long, aux bords enroulés vers le bas ; face supérieure vert sombre et glabre, face inférieure blanche, tomenteuse, parcourue par une nervure saillante, et portant des poils articulés ramifiés et des poils glandulaires fortement serrés,
- Inflorescence spiciforme, à fleurs subsessiles, qui s'épanouissent toute l'année
- Calice gamosépale, poudré-blanchâtre, tube en forme de cloche, à 3 lobes, le plus large est la lèvre supérieure et les deux autres forment la lèvre inférieure,
- Corolle gamopétale, tubuleuse, à 2 lèvres (la supérieure à 2 lobes en forme de casque, l'inférieure à 3 lobes, avec le médian plus large, concave),
- 2 étamines, et des anthères allongées uniloculaires, le fruit est un tétrakène, de couleur brune,
- Fleurs bleu pâle, lilas ou blanchâtres, maculées de petites taches violettes à l'intérieur.

Cette espèce très polymorphe, présente plusieurs variétés. Mais, à cette différenciation morphologique très aléatoire, nombreux botanistes préfèrent s'appuyer sur la composition chimique de l'huile essentielle pour lister quatre chémotypes, suivant le composé dominant :

- Romarin à cinéole,
- Romarin à verbénone,
- Romarin à camphre, bornéol,
- Et parfois romarin à myrcène

- Habitat et culture : Originaires des régions méditerranéennes, le romarin est une plante héliophyte ; il demande une sécheresse estivale accusée et un ensoleillement important et nécessite un hiver doux, des conditions hivernales clémentes, avec des précipitations neigeuses rares et peu abondantes. Si les températures hivernales sont trop basses, les plantes d'un an et plus résistent, mais les plantules périssent (surtout celles situées dans des endroits humides).

Cette plante recherche les sols riches en ions calcium, d'un pH entre 6 et 8,4 et ayant une texture argilo-limono-sableuse. Par contre, elle est peu abondante sur les sols saturés en ions magnésium (BESOMBES .C 2008).

On cultive le romarin à partir de semis ou de boutures au printemps, L'enracinement se produit dans les deux mois suivants. La mise en place définitive a lieu à l'automne ou au printemps suivant, dès que les pieds ont suffisamment de racines.

La récolte, mécanique ou réalisée à l'aide d'une faucille, débute 18 mois après la plantation, à raison d'une coupe par an ; elle consiste à couper les brins à 30 cm du sol, les réunir en bouquets pour les suspendre ensuite. Elle se fait soit en mai avant floraison ou en septembre si l'on recherche le feuillage pour l'herboristerie ou l'industrie alimentaire, soit en pleine floraison (juillet) si le romarin est destiné à la distillation.

✓ Usages traditionnels et courants

- Stimulant cérébral : le romarin stimule la circulation cérébrale, améliorant la concentration et la mémoire (Iserin. P 1996).
- Il soulage également les céphalées, migraines et la dyspepsie.
- Il favorise la pousse des cheveux en stimulant l'irrigation du cuir chevelu.
- Pour ses propriétés hypertensives la plante est employée en cas d'évanouissements liés à une insuffisance circulatoire.
- Fortifiant ; le romarin accélère la convalescence à la suite de maladies chroniques ou de stress prolongés. Il stimule les glandes surrénales et se révèle très efficace dans le traitement de l'asthénie.
- Stimulant psychique ; le romarin est souvent prescrit pour les personnes surmenées et fatiguées. Il est apprécié pour ses propriétés stimulantes et légèrement antidépressives.
- L'huile essentielle de romarin est employée en aromathérapie pour différentes propriétés. Elle est reconnue pour ses propriétés stimulantes sur l'activité locomotrice, qui dues à la stimulation de l'organe de l'odorat mais aussi l'activation pharmacologique directe du système nerveux central.

- Cette huile essentielle possède aussi des propriétés antifongiques et antiseptiques et une action antispasmodique sur le sphincter d'Oddi, mais 7 à 8 fois moins importante que celle de l'huile essentielle de menthe (BESOMBES. C 2008).
- L'huile essentielle de romarin est également utilisée dans l'industrie cosmétique ainsi que par l'industrie alimentaire (BESOMBES. C 2008).
- La lavande stéchade : *Lavandula stoechas*

✓ Caratéristiques botaniques

- Classification

Règne : plante
 Embranchement : spermaphytes
 Sous embranchement : angiospermes
 Classe : dicotylédones
 Ordre : tubiflorales
 Famille : labiées ou lamiacée
 Genre : *Lavandula*
 Espèce : *Lavandula stoechas*

- Noms communs : lavande stéchade, lavande papillon, lavande à toupet ou lavande des îles d'Hyères, son nom vernaculaire en arabe est 'El halhal' الحلال

- Description : *Lavandula stoechas* fait également partie de la famille des Lamiacées ou Labiées (Photo 4). Il possède donc les mêmes caractéristiques morphologiques caractéristiques et communes à l'ensemble de cette famille. Le genre *Lavandula* présente les caractères suivants :

- Sous-arbrisseau,
- Inflorescence en épi lâche ou serré,
- Bractées distinctes des feuilles,
- Calice velu-laineux tubuleux, avec 8 à 15 nervures, 5 dents inégales, les 4 inférieures très courtes et la supérieure prolongée par un appendice cordiforme,
- Corolle à tube saillant un peu dilaté à la gorge, à 2 lèvres (la supérieure à 2 lobes, l'inférieure à 3 lobes),
- 4 étamines courtes, deux des quatre étamines appuyés sur la lèvre inférieure de la corolle,
- Anthères uniloculaires,

- Carpelles glabres et lisses,
- Fleurs pourpres à bleu violacées.

Le genre *Lavandula* regroupe un nombre assez restreint d'espèces. A titre d'exemple : *Lavandula angustifolia* ou *officinalis* ou *vera* ou *spica*, *Lavandula stoechas*, *Lavandula latifolia*

Tableau 1: Caractéristiques botaniques des trois principales espèces de lavandes en France (BESOMBES. C 2008).

	<i>Lavandula vera</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Lavandula latifolia</i>
Taille	30 à 60 cm	20 à 40 cm	30 à 80 cm
Rameaux	Simple, longuement nus au sommet	Peu allongé, feuillés presque jusqu'au sommet	Ramifiés
Epis	Un peu lâches	Compacts, quadrangulaires	Grêles et lâches
Caractéristiques des fleurs	Fleurs bleues ou violacées. Se détachent facilement	Petites fleurs pourpres noirâtres avec une houppe de grandes bractées violettes.	Petites fleurs bleues ou violettes. S'arrachent facilement.
Caractéristiques des feuilles	Feuilles vertes	Feuilles grisâtres, tomenteuses	Feuilles blanches, Tometeuses
Odeur	Agréable	Légèrement camphrée	Nettement camphrée

- Habitat et culture : Au départ, les lavandes poussent dans quelques pays du bassin méditerranéen, puis la culture s'est répandue en Europe de l'Est (Bulgarie, Russie, Ukraine...) et même en Tasmanie ou encore au Canada où des plantes mutées peuvent maintenant résister au gel.

Les lavandes affectionnent les sols légers et bien drainés (elles redoutent les excès d'eau). Toutes supportent bien les terrains calcaires hormis la *Lavandula stoechas* et la *Lavandula viridis* qui, quant à elles, exigent un sol acide. Pour prospérer et bien fleurir les lavandes doivent être plantées en plein soleil

La culture débute, en mars, par la plantation de jeunes plantes produites en pépinière situées en altitude ou de jeunes plantes sauvages. D'avril à mai, il faut effectuer le désherbage et l'apport d'engrais organique. Mi-juin, les plantes

commencent à fleurir. Toute opération de désherbage est stoppée afin de ne pas abîmer les jeunes fleurs.

Les fleurs connaissent leur épanouissement maximal vers la mi-juillet. La maturation des épis de lavande est alors évaluée pour déterminer une date de début de la campagne de récolte, normalement entre le 20 et le 27 juillet, pendant 15 jours. Deux ou trois jours après le début de la campagne, la distillation peut débuter. Une fois la lavande récoltée, vers mi-août, le griffonnage peut reprendre. Les pieds de lavande ont une durée de vie d'environ 10 ans. Quand ce terme est atteint, ces pieds sont arrachés et brûlés, courant octobre.

✓ Usages traditionnels et courants

Venue de l'ouest du bassin méditerranéen, la lavande était déjà utilisée par les Romains pour conserver le linge et parfumer les bains.

Elle est utilisée par décoction des feuilles et des boutons floraux, dans le cas de rhumatisme ou des troubles digestives (El-Hilaly. J et *al.*, 2003).

II. Généralité sur les huiles essentielles et les extraits aromatiques

1- Définitions

Le terme "huile essentielle" a été inventé au XVIème siècle par le médecin suisse Parascelsus Von Hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel (EL KALAMOUNI. C. 2010).

D'après Naves, aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition peut être étendue aux huiles essentielles obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de *Citrus*, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères (GARNERO. J. Techniques d'ingénieur).

Selon l'AFNOR (norme NF T 75-006): "les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques".

Ces définitions écartent les produits obtenus, toujours à partir de matière première végétale, mais en employant d'autres procédés d'extraction, comme l'utilisation de solvants non aqueux ou l'enfleurage (A-S, Carette., 2000). Ainsi nous pouvons définir quatre autres produits (BESOMBES. C., 2008) :

- Concrète : extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première fraîche d'origine végétale, par extraction par un solvant non aqueux, nommé aussi essence concrète ou essence.
- Résinoïde : extrait à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une matière première sèche d'origine végétale, par extraction par un solvant non aqueux.
- Pommade florale : corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs par enfleurage
- Absolue : produit à odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un résinoïde par extraction par l'éthanol à température ambiante.

On distingue trois catégories des huiles essentielles : les huiles brutes ou naturelles, les huiles rectifiées et les huiles fractionnées (Turgeon. M., 2001).

- Les huiles brutes ou naturelles sont obtenues par distillation d'une grande quantité de matières premières broyées (branches, aiguilles, écorces, bois, etc.). Elles ne sont pas raffinées.
- Les huiles rectifiées sont des huiles brutes purifiées, c'est-à-dire que certains résidus laissés lors de la distillation sont éliminés par l'entraînement à la vapeur.
- Enfin, les huiles essentielles de qualité supérieure sont des huiles fractionnées. On les obtient en séparant les composés volatils en diverses fractions, selon leurs points d'ébullition spécifiques.

Les huiles essentielles sont solubles dans l'alcool, l'éther, et dans d'autres solvants, mais insolubles dans l'eau. Elles sont généralement liquides à température ambiante et très peu coloré. Elles ont une densité inférieure à l'unité, à l'exception de quelques cas (cannelle,

sassafras et vétiver), et elles ont un indice de réfraction et un pouvoir rotatoire très élevés (BESOMBES. C ,2008).

L'huile essentielle se sépare de l'eau du distillat par simple décantation mais une petite partie persiste dans l'eau et lui communique une odeur, on parle alors d'eau aromatique, à rapprocher de l'hydrolat, eau distillée aromatisée (parfois artificiellement) à laquelle on ajoute parfois de l'alcool, des stabilisants chimiques ou des conservateurs (EL KALAMOUNI. C., 2010).

2- Historique

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, alimentation... En 812, les capitulaires de Charlemagne sélectionnent 73 plantes qu'ils qualifient de plantes utiles (Abdoulhousen. N, 1990).

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle a devenu un des principaux produits de commercialisation internationale ; ainsi, vers l'an mille, Avicenne, philosophe, médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie ont été les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques. A cette époque (BESOMBES. C ,2008).

Les échanges commerciaux entre l'orient et l'occident ont été accentués par le voyage de Marco Polo vers la Chine et les huiles essentielles seront utilisées lors de l'épidémie de peste du XIV^{ème} siècle (Iserin. P., 1996).

En XIX^{ème} siècle les chimistes ont réussi à isoler les principes actifs de certaines plantes, l'acide salicylique est extrait du saule blanc (*Salix alba*), l'inuline de l'aunée officinale. Pour ensuite réussir la fabrication des molécules synthétiques au XX^{ème} siècle. René Maurice Gattefosse a créé en 1928 le terme de l'aromathérapie, et a publié en 1937 l'ouvrage 'aromathérapie- les huiles essentielles, hormones végétales'. Il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment sur leurs propriétés, et ses résultats seront à

l'origine de nombreuses autres recherches, réalisées notamment par Jean Valnet. Ce dernier a fondé l'association d'études et de recherches en aromathérapie et phytothérapie en 1971, transformée en société française de phytothérapie et d'aromathérapie en 1973. Il l'a quitté en 1980 pour créer en 1981 le collège de phyto-aromathérapie et de médecins de terrain de langue française. En 1975 Pierre Franchomme le coauteur de "l'aromathérapie exactement" a donné la notion fondamentale de chémotype (Iserin. P., 1996 : page 18-31).

3- Localisation des huiles essentielles dans les plantes

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices qui se situent, dans des poils sécréteurs ou trichomes (*Lamiaceae*), dans des poches sécrétrices (*Myrtaceae* ou *Rutaceae*) ou dans des canaux sécréteurs (*Apiaceae* ou *Asteraceae*) (PIOCHON. M., 2008).

Les trichomes (Figure 1) peuvent se présenter sous quatre formes et peuvent se composer de plusieurs cellules sécrétrices, associées pour constituer un plateau porté par un pédicelle court, poils peltés, poils capités à pieds court ou long ou bosselé. Les poils sécréteurs peuvent être externes ou bien internes, comme dans les divers eucalyptus (BESOMBES. C, 2008).

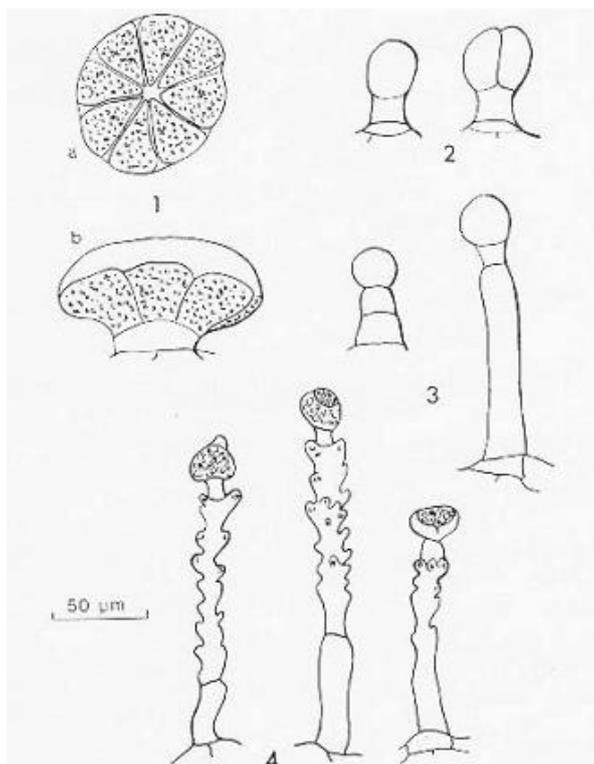


Figure 1 : Les 4 types de trichomes sécréteurs observés chez *Lavandula angustifolia* Mill. : (1) Poil pelté, (a) vue de dessus, (b) vue de profil ; (2) Poil capité court ; (3) Poil capité long ; (4) Poil sécréteur bosselé, différents stades de la sécrétion (BESOMBES. C ,2008).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes végétaux : fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rose), les sommités fleuries (tagète, lavande), les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier), les racines (vétiver), les rhizomes (gingembre, curcuma), les fruits (badiane), le bois (bois de rose, santal) ou les graines (ambrette, muscade) (PIOCHON. M., 2008).

4- Rôle biologique des huiles essentielles dans les plantes

Les huiles essentielles sont des signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement (rôle écologique): attraction des insectes pollinisateurs, action répulsive sur les prédateurs, inhibition de la germination des graines, voire communication entre les végétaux (émission de signaux chimiques signalant la présence d'animaux herbivores par exemple) (EL KALAMOUNI. C , 2010).

5- Composition chimique des huiles essentielles

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales. Le terme « huile » vient de leur caractère hydrophobe et leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme « essentielle » fait référence à l'odeur dégagée par la plante productrice.

✓ Les composés volatils des huiles essentielles

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses (GARNERO. J). Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit les monoterpènes (myrcène, P-pinène, γ -terpinène, etc.), et les sesquiterpènes (*E*-caryophyllène, α -humulène) (Bakkali. F et *al.*,2008).

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus de l'assemblage de plusieurs unités « isopréniques » (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) (figure 2) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$) (figure 3). Et rarement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (BESOMBES. C., 2008). Plusieurs milliers de composés appartenant à la famille des terpènes ont, à ce jour, été identifiés dans les huiles essentielles (Modzelewska et *al.*,2005).

La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono et des sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α -bisabolol), des cétones (menthone, camphor), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate de cédryle) et des phénols (thymol, carvacrol) (PIOCHON. M ., 2008).

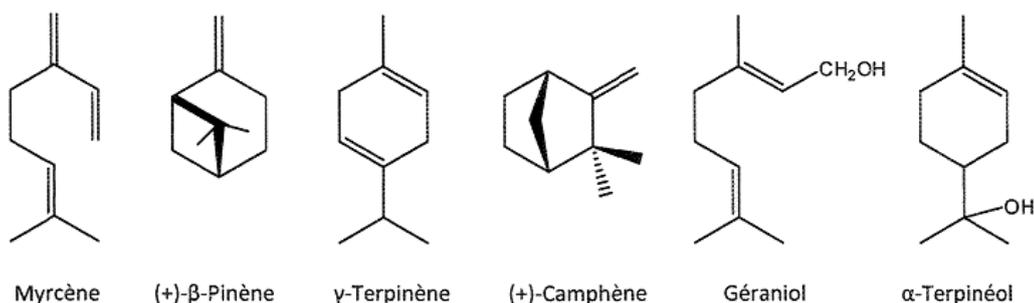


Figure 2 : Exemples de structures de monoterpènes (PIOCHON. M., 2008).

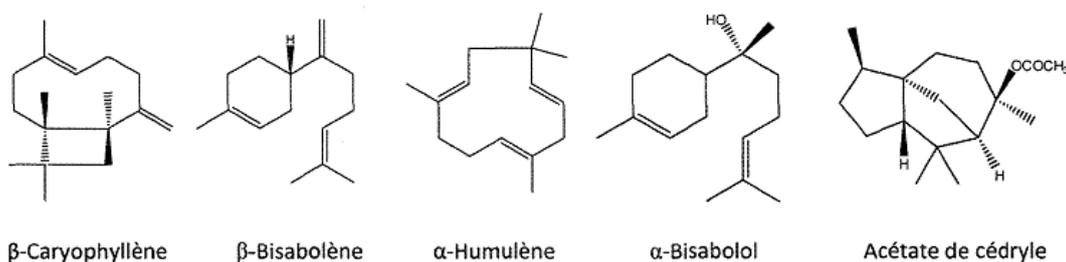


Figure 3 : Exemples de structures de sesquiterpènes (PIOCHON. M., 2008).

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrée dans les huiles essentielles est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Figure 4) (Kurkin, 2003). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'*Apiaceae* (persil, anis, fenouil) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon (Bruneton, 1999).

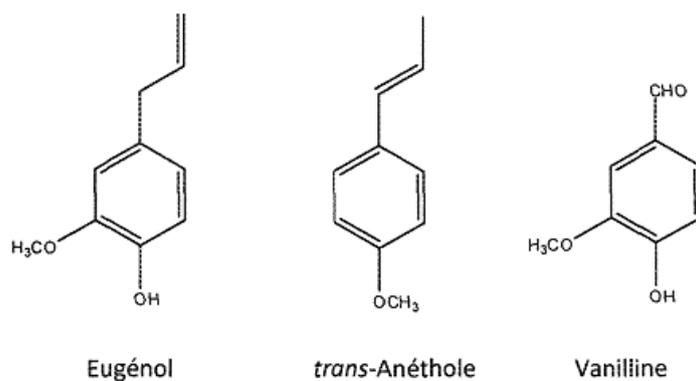


Figure 4 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane (PIOCHON. M. 2008).

Enfin, il existe un nombre non négligeable de composés volatils issus de la dégradation, de terpènes non volatils (c'est le cas par exemple des ionones qui proviennent de l'auto-oxydation des carotènes) et d'acides gras (les petites molécules odorantes, comme par exemple le (3Z)-hexén-1-ol ou le décanal, qui sont obtenues à partir des acides linoléique et α -linoléique) (figure 5) (Bruneton, 1999).

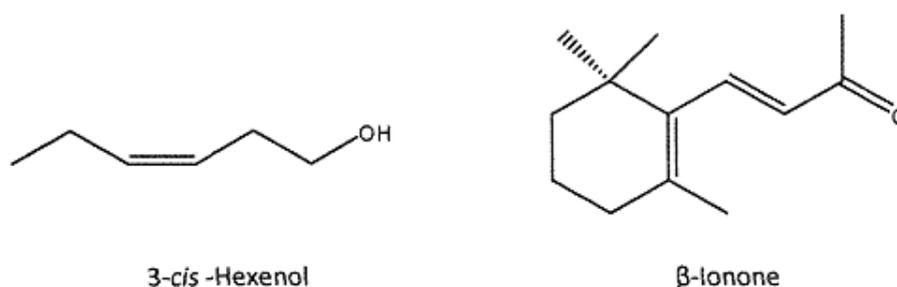


Figure 5 : Exemples de structures de composés issus de la dégradation d'acides gras ou de terpènes (PIOCHON. M., 2008).

✓ Les chémotypes

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents, par exemple le romarin présente quatre chémotypes, romarin à cinéole, romarin à verbénone, romarin à camphre, bornéol, et, parfois, romarin à myrcène (BESOMBES. C .2008). Ce polymorphisme chimique existe aussi chez d'autres espèces à titre d'exemple: *Origanum vulgare* (Mockute et *al.*, 2001), *Mentha spicata* (Edris et *al.*, 2003). Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présentent non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables. Ce qui rend parfois la méconnaissance des chémotypes à l'origine d'accidents graves (PIOCHON. M ,2008).

✓ Les facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques. Chez *Salvia officinalis* par exemple le rendement des huiles essentielles augmente avec un déficit hydrique modéré, avec changement de la composition chimique (Bettaieb. I et *al.* , 2008).

L'étude de la variation de la composition chimique des huiles en fonction du cycle circadien et des saisons a été menée par Celiktas. Y. O et *al* (2007). L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants.

L'influence de l'humidité et les différentes méthodes de séchage sur la composition chimique des huiles essentielles extraites du romarin a été étudiée par Szumny. A et *al* (2009).

Bousbia. N (2009) a montré l'influence des méthodes d'extraction sur le rendement, la composition et la qualité des huiles essentielles obtenues par deux méthodes d'extraction appliquées au romarin, et O. Okoh a montré que les huiles essentielles obtenues par la technique d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes à partir du *Rosmarinus officinalis* possèdent une activité antimicrobienne plus importante que celles obtenues par hydrodistillation classique. Cette différence de l'activité est justifiée par la différence de la composition chimique des deux huiles essentielles (Okoh. O.O et *al.*, 2010).

Le stockage de la matière première avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. Fantino. S. N a constaté des pertes considérables des huiles essentielles lors d'un stockage prolongé de la matière végétale au congélateur, mais peu d'évolution de la composition. Par ailleurs le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier la composition de ces huiles. D'après A-S, Carette, les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître (Fantino. S. N 1990) (Carette 2000).

6- Domaines d'application des huiles essentielles

✓ Parfumerie et cosmétique

Les huiles essentielles et les extraits des plantes aromatiques sont employés dans toute une large gamme de parfums, cosmétiques et produits de beauté : eau de toilette, eau de colonie, déodorants, crème de peau, rouge à lèvres, lotions, savons à raser... (Guenther E, 1972). Ces essences entrent dans la composition de ces produits grâce à leur activité antioxydante qui contribue à la protection de la peau, et servent à préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptiques, tout en leur assurant des odeurs agréables.

✓ Industrie agroalimentaire

Les plantes aromatiques et les épices ont été utilisés depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également

pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle sont autant de plantes aromatiques fréquemment utilisés comme ingrédients alimentaires. Les huiles essentielles de ces plantes ont toutes une particularité commune: elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, il est reconnu non toxique, et il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations (PIOCHON. M 2008).

Des études *in vitro* ont démontré l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis de ; *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et d'autres microorganismes (Kempf. M et *al.*, 2011). Ce qui a permis l'identification d'un certain nombre de composés des huiles essentielles ayant une activité inhibitrice comparable ou plus efficace que celle des antibiotiques, comme le carvacrol, le thymol, l'eugénol, périllaldéhyde, cinnamaldéhyde et de l'acide cinnamique.

Une autre étude menée sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dans des viandes fraîches, des produits de viande, des poissons, de lait, des produits laitiers, des légumes, des fruits et de riz cuit a montré que la concentration nécessaire pour obtenir un effet antimicrobien significatif est d'environ 0,5 à 20 µl/g dans les aliments et environ 0,1-10 µl /ml dans les solutions pour lavage des fruits et légumes (Burt. S., 2004).

A. Singh (2003) a montré l'efficacité des huiles essentielles du thym et le clou de girofle sur *Listeria monocytogenes* (Singh. A et *al.*, 2003). Et Leonard. C. M a prouvé que les huiles essentielles de *Mentha spicata* (menthe verte), *Syzygium aromaticum* (girofle), ainsi que le nérol pur possèdent des activités antibiofilm listeria ce qui les rendent de bons candidats pour le développement ultérieur des désinfectants respectueux de l'environnement (Leonard. C.M. et *al.*, 2010).

Les effets inhibiteurs des huiles essentielles de *Salvia officinalis* et de *Schinus molle* ont été évalués contre deux agents pathogènes d'origine alimentaire appartenant au genre *Salmonella*. Bien que les activités antibactériennes des deux huiles essentielles dans la viande de boeuf hachée ont été évidentes (Hayouni et *al.*, 2008). De même l'huile essentielle de cannelle a montré une forte activité antibactérienne contre *Salmonella*, toutefois l'activité des huiles essentielles du romarin a été faible (Valverde et *al.*, 2010). L'activité des huiles

essentielles et des composés volatiles sur *Salmonelle* a été étudiée récemment (Bajpai, V.K., et *al.*, 2011).

Une autre étude récente a mis en évidence l'activité antifongique de quatre huiles essentielles sur des levures isolées à partir du secteur alimentaire (Rentsenkhand T et *al.*, 2011).

✓ Industrie pharmaceutique

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les huiles essentielles pour traiter un certain nombre de maladies. Beaucoup d'ouvrages décrivent des préparations à base des huiles essentielles, diverses prescrites pour le traitement de plusieurs maladies. Cependant, ces prescriptions ne possèdent pas de bases scientifiques rigoureuses car elles sont souvent tirées de pratiques empiriques (Valnet, 1986). Actuellement, plusieurs publications scientifiques fondées utilisent les huiles essentielles et les extraits aromatiques ou leurs composés majoritaires pour tester leurs effets *in vitro* ou *in vivo* sur des modèles animaux. A titre d'exemple ;

- ✓ Les antispasmodiques, tels que le gingembre (Thompson HJ et *al.*, 2006). et la réglisse (Sato Y, et *al.*, 2007).
- ✓ Une étude sur les extraits de feuilles du romarin a prouvé l'activité neuroprotectrice contre une neurotoxicité induite par l'acrylamide chez des rats, ceci semble être dû à l'activité antioxydante de l'acide caféique et rosmarinique (Waggas. M.Aet *al.*, 2008).
- ✓ Les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants qui permettent la prévention du stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibres entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est qui est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'alzheimer, l'artériosclérose et le cancer (Edris, 2007).
- ✓ Une étude récente des huiles essentielles de certaines plantes médicinales de la région Meknès-Tafilalet a montré qu'elles possèdent une activité hypoglycémiant (El Amrani. F et *al.*, 2010).

7- Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

✓ Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Depuis longtemps les vertus antimicrobiennes des huiles essentielles ont été utilisées, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises (Hala G.M et *al.*, 2000). Parmi les études anciennes on note l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle (Beylier-Maurel 1976), et qu'en 1919 Gatte Fosse a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huile de pin (Rhayour. K., 2002).

Dans les années 1990, de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles des plantes aromatiques ont été apparus. A titre d'exemple, Kato T a constaté que la listerine qui est une solution constituée d'huile essentielle à base de thymol et d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire (Kato T et *al.*, 1990). D'autres travaux ont démontré que les huiles essentielles et leurs composés majoritaires possèdent un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram – et à Gram+ (Dorman H.J.D. et *al.*, 2000).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles des PAM et de leurs constituants est décrite par plusieurs d'études récentes :

- ✓ *Rosmarinus officinalis* (Jiang.Y et *al.*, 2011) (Hussain. A I. et *al.*, 2011).
- ✓ *Salvia officinalis* et *salvia triloba* (Delamare A. P. L. et *al.*, 2007), (Bouaziz. M et *al.*, 2009).
- ✓ Activité antifongique du thym du Maroc (*Thymus bleicherianus* et *Thymus capitatus*) (El Ajjouri. M et *al.*, 2008).
- ✓ *Mentha spicata* (menthe verte), et *Syzygium aromaticum* (girofle) (Leonard C.M. et *al.*, 2010).
- ✓ *Cinnamomum verum* (cannelle) (Valverde et *al.*, 2010).
- ✓ L'activité antivirale des huiles essentielles de l'*Allium cepa* L, *Allium sativum*, *Cuminum cyminum*, *Corriandrum sativum*, *Petroselinum sativum* et *Ocimum basilicum* contre le virus de type 1 de l'herpès (HSV1) a été démontrée par (Romeilah R et *al.*, 2010).
- ✓ Un travail a été consacré à l'étude de l'activité fongitoxique (action fongistatique et fongicide) des huiles essentielles sur la germination, la croissance mycélienne et la

sporulation des dermatophytes responsables de multiples mycoses chez l'homme. Dans l'ensemble, les trois huiles essentielles testées de plantes aromatiques et médicinales : thym (*Thymus sature-joïdes* L.), menthe pouliot (*Menthe pulegium* L.) et romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) présentent des activités inhibitrices sur la germination des spores ou des arthrospores de tous les dermatophytes testés à des concentrations allant de 0,001 à 4 % (Ouraini. D. et *al* 2005).

- ✓ Sur 224 bactéries isolées d'infections hospitalières Kempf. M a étudié leur sensibilité vis-à-vis des composés à base des huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologies. L'ensemble des résultats ont montré une activité antibactérienne intéressante sur les bactéries testées. La plupart des souches étaient inhibées par des concentrations de 0,2 %. Les valeurs moyennes les plus élevées étaient obtenues avec des bactéries commensales de la flore intestinale, ce qui est un aspect particulièrement intéressant à exploiter dans cette étude (Kempf M. et *al.*, 2011).
- ✓ Les huiles essentielles de *Boesenbergia pandurata* pourrait être considéré comme un agent antifongique naturel contre les infections à *candida albicans* (Taweechaisupapong. S et *al.*, 2010).

8- Les extraits aromatiques de plantes

Les extraits de plantes contiennent des minéraux (phosphore, potassium, sodium, calcium...) un grands nombre de composés organiques ; des lipides, des protéines, des glucides, des vitamines et des polyphénols. La teneur en chaque type de composés organiques dans l'extrait dépend principalement de la méthode d'extraction et du solvant utilisé.

Parmi ces constituants les polyphénols sont réputés pour leurs excellentes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancérigènes, et antimicrobiennes (PEREZ M.E.G., 2008).

- ✓ Les composés phénoliques

Un groupe largement distribué de métabolites secondaires sont les composés phénoliques. Il s'agit d'un groupe très répandu qui est représenté par divers types de composés. On définit les polyphénols comme des composés aromatiques portant plus qu'une fonction hydroxyle sur un noyau benzénique (PEREZ M.E.G., 2008).

- Les phénols simples

Ce sont des phénols de structure simple, dont le squelette est basé sur le C6-C1 et au maximum C6-C2 (Figure 6). Dans les plantes supérieures, ces composés dérivent de la voie biosynthétique des phénylpropanes suivies par une dégradation du squelette C6-C3 initialement formé.

Une voie directe représentée par aromatisation de l'acide shikimique semble être la voie principale vers l'acide gallique, le précurseur des tanins hydrolysables (PEREZ M.E.G., 2008).

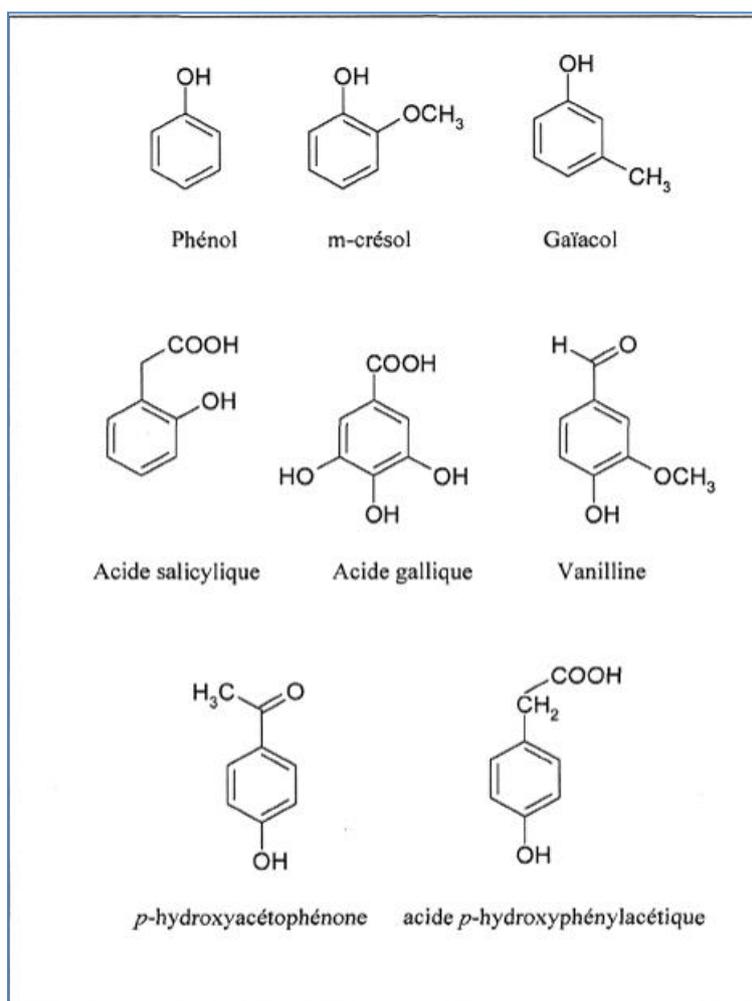


Figure 6: Exemples de phénols simples et leurs dérivés (PEREZ M.E.G., 2008).

Un autre groupe de polyphénols simples est constitué par les lignanes, formés de deux unités phénylpropane liées entre-elles de différentes manières. Quelques-uns d'entre eux forment des structures dimères également présentes dans les molécules de lignine.

- Les flavonoïdes

L'évolution des plantes vasculaires est directement liée au développement de la capacité de lignification ou plus précisément à l'expansion du métabolisme phénylpropane (impliquant l'acide shikimique comme intermédiaire obligatoire). Les flavonoïdes partagent la même voie de biosynthèse que la lignine et sont représentés par des composés avec des squelettes C6-C3-C6, c'est-à-dire à la base de phénylpropane. Leur structure moléculaire est caractérisée par un squelette carboné de type diphenyl 1,3-propane qui comprend 15 atomes de carbone répartis en deux cycles benzéniques notés A et B reliés entre eux par la structure chromane à trois carbones (C) (PEREZ M.E.G., 2008).

Plusieurs sous-groupes de flavonoïdes existent selon le degré d'insaturation et d'oxydation de l'hétérocycle : flavone, flavanone, flavane, isoflavones (Fengel et Wegener, 1984).

Les flavonoïdes existent généralement dans la nature sous forme hydroxylée et combinés à diverses molécules, ce qui explique la grande variété de ces composés (Figure 7). La présence de glucides ou de groupements méthyle sur les hydroxyles phénoliques est très fréquente. Pour la plupart des flavonoïdes, la chaîne aliphatique propane est incluse dans un hétérocycle pyrane. Toutefois, il existe d'autres molécules pour lesquelles la chaîne propane, qui relie les deux cycles A et B, présente des squelettes différents à savoir : chalcones, aurones, isoflavones (figure 8)

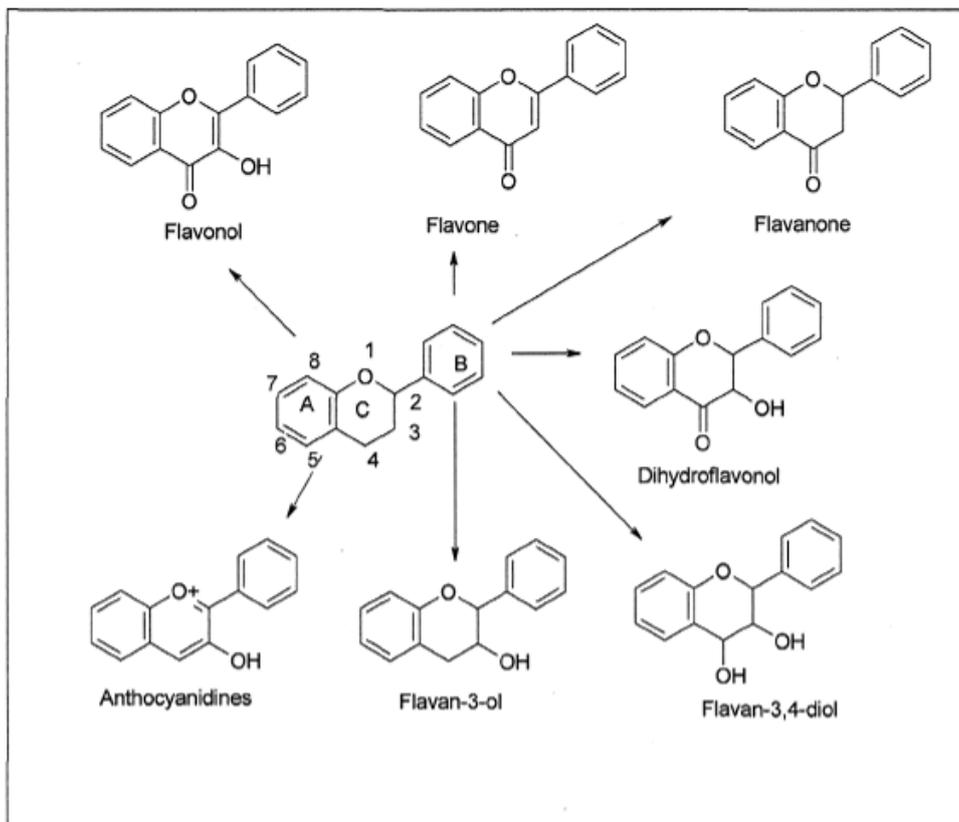


Figure 7: Familles des flavonoïdes (PEREZ M.E.G., 2008).

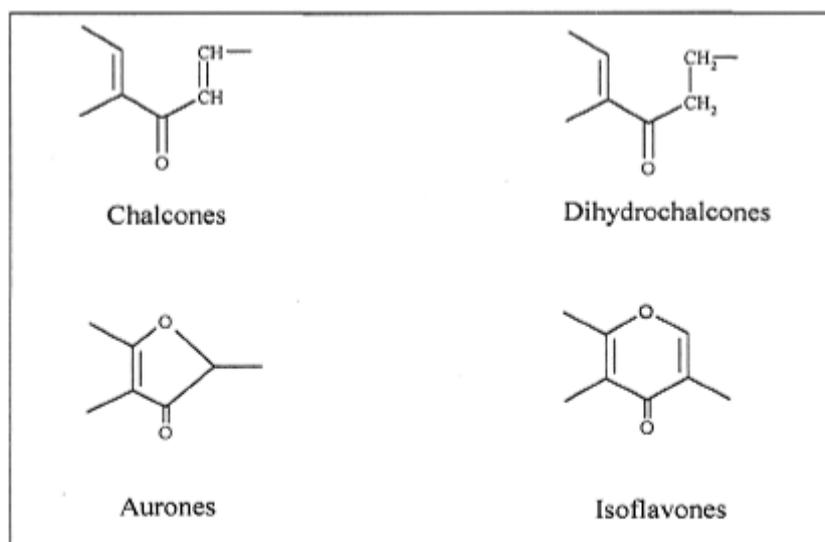


Figure 8: structure d'autres types de flavonoïdes (PEREZ M.E.G., 2008).

Les glycosides (hétérosides) des flavonols, principalement ceux du kaempferol, de la quercétine et de la myricétine représentent les polyphénols prédominants dans les feuillages des plantes vasculaires (Figure 9) (Stevanovic, 2005).

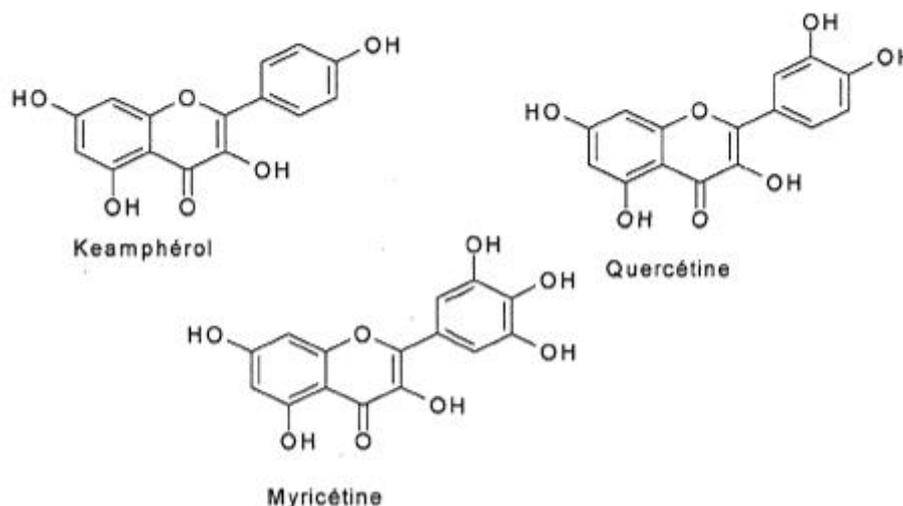


Figure 9 : Flavonols prédominant dans les feuillages des plantes vasculaires (PEREZ M.E.G., 2008).

Les flavonoïdes jouent un rôle dans la pigmentation des plantes, la fixation du diazote atmosphérique par les plantes légumineuses, la défense chimique contre les prédateurs (phytoalexines) et la reproduction des plantes (PEREZ M.E.G., 2008).

- Les tannins

Les tannins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau. En plus de présenter les réactions caractéristiques des phénols en général, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines (Stevanovic, 2005). Cette réactivité avec les protéines est à l'origine des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau au cours de la transformation de la peau en cuir, la rendant imputrescible et moins perméable à l'eau. Les tannins sont très répandus dans le monde végétal, leur teneur et leur nature varient d'une espèce à l'autre.

- ✓ Activités biologiques des polyphénols :

Plusieurs études épidémiologiques dont la célèbre ZUTPHEN Study aux Pays-Bas indiquent qu'il existe une association inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et l'incidence de cancer et des maladies cardiovasculaires (Pincemail. J et *al.*, 2007). La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Ceci peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de

modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies (Martin S. et *al.*, 2002).

L'effet antiprolifératif des polyphénols a été décrit par Bennani. H (2009), en étudiant l'impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate. Egalement plusieurs travaux ont montré le rôle des flavonoïdes dans la désactivation des radicaux libres à cause de leurs structures permettant le piégeage des radicaux libres et de présenter par conséquent des activités antioxydantes très importantes (Martin. S et *al.*, 2002) (El Hajaji H. et *al.*, 2011).

De nombreuses études ont montré que les flavonoïdes sont dotés d'activités anti-inflammatoires, vasodilatatrices, cardioprotectrices, neuroprotectrices, œstrogéniques (Harborne et Williams, 2000). L'une de leurs fonctions indiscutables est leur rôle de protection des végétaux contre les invasions microbiennes. Ceci n'est pas seulement le fait de leur présence dans les plantes en tant que constituants, mais aussi celui de leur accumulation comme phytoalexines en réponse aux attaques fongiques, bactériennes ou virales (Grayer et Harborne, 1994 ; Harborne, 1999).

Enfin, les études menées sur l'activité antimicrobienne des extraits des plantes ont montré que celle-ci est due principalement aux flavonoïdes. A titre d'exemple les travaux de Hrikrishna (2004), ont prouvé le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside'' prunine-6-O-p-coumarate'' contre deux bactéries à Gram + (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus albus*) et deux bactéries à Gram- (*Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*) (Hrikrishna et *al.*, 2004). Et (Sati S.C et .Joshi S.2011). qui a étudié l'activité antifongique des extraits de plantes.

III- Généralités sur les techniques d'extraction

Parmi de nombreuses techniques d'extraction des huiles essentielles, la distillation est la méthode la plus ancienne et également la plus utilisée. D'autres techniques plus récentes ont été développées afin d'améliorer le rendement ou la qualité des huiles essentielles extraites, diminuer le temps d'extraction, réduire la quantité du solvant utilisé, et accélérer la cinétique d'extraction (BESOMBES. C ,2008).

1. La distillation

Dans un premier temps, l'extraction des huiles essentielles s'est faite en plongeant la matière première dans l'eau qu'on porte ensuite à ébullition, c'est l'hydrodistillation (figure 10). Par la suite, la matière première et l'eau ont été séparées : soit l'eau est placée au fond de la cuve avant d'être portée à ébullition pour qu'un courant de vapeur d'eau traverse la matière première, c'est la vapo-hydrodistillation ; soit la vapeur d'eau est générée dans une chaudière à l'extérieur de l'alambic, technique dite vapo-distillation. Dans ces divers cas, la vapeur d'eau chargée d'huile essentielle est dirigée vers un condenseur formé généralement d'un serpentín, à tubes parallèles, dans lequel circule de l'eau froide. Une fois condensées, eau et huile essentielle sont acheminées vers un essencier ou vase florentin. Dans ce dernier, nous obtenons deux liquides, non miscibles : l'eau aromatisée et l'huile essentielle. La séparation se fait ensuite par une simple décantation (BESOMBES. C ,2008).

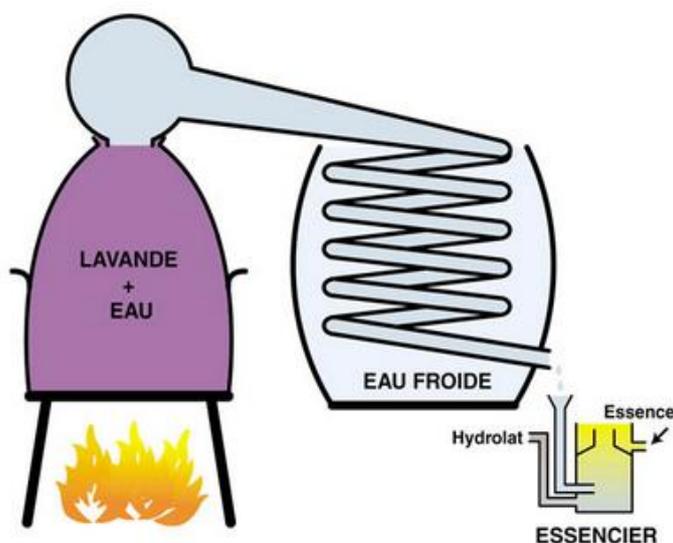


Figure 10 : Alambic simple à feu nu (BESOMBES. C ., 2008).

2. Pression à froid

La pression à froid est une extraction sans chauffage réservée aux agrumes (figure 11). Le principe de ce procédé mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles. Celles-ci ainsi libérées sont entraînées par un courant d'eau. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation.

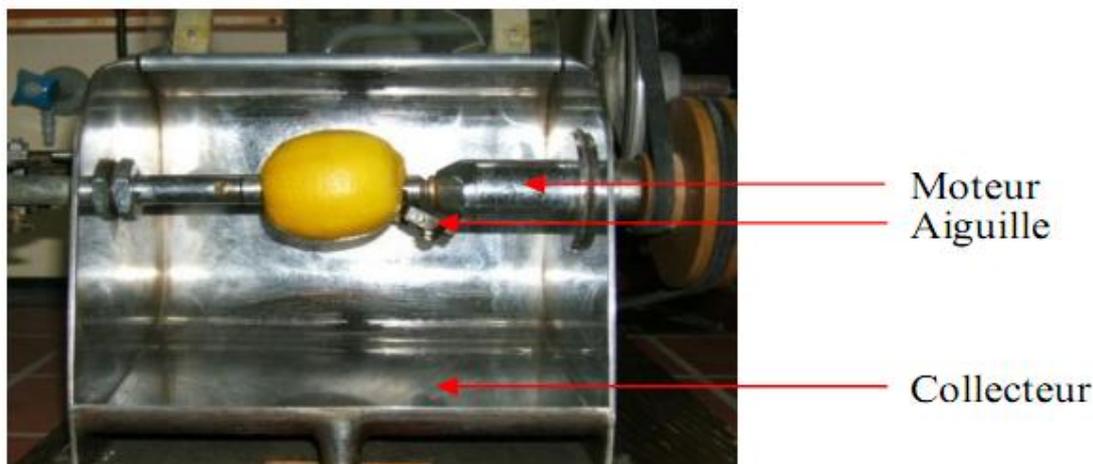


Figure 11 : Schéma du montage de la pression à froid (FARHAT. A ., 2010).

L'utilisation de grandes quantités d'eau dans cette technique peut altérer les qualités des huiles essentielles, par hydrolyse, par dissolution des composés oxygénés et par transport de micro-organismes. C'est pour cette raison que les constructeurs cherchent à s'affranchir de l'utilisation de l'eau lors d'une telle extraction. Ainsi, pour éviter ces altérations, de nouveaux procédés physiques usuels sont apparus qui sont basés sur l'ouverture des sacs oléifères par éclatement sous l'effet d'une dépression, ou l'utilisation du principe de l'abrasion de l'écorce fraîche (FARHAT. A ., 2010).

3. Enfleurage

Cette technique est employée en parfumerie. Elle est fondée sur l'affinité qui peut exister entre les corps gras et les huiles essentielles. En effet les huiles essentielles sont absorbées par les corps gras, souvent à froid (enfleurage à froid) ou à l'état fondu (liquide) par chauffage (enfleurage à chaud). B. M. Lawrence donne des indications précises sur cette technique (BESOMBES. C ,2008).

L'enfleurage à froid est particulièrement adapté aux fleurs fragiles (jasmin, tubéreuse, ...), alors que l'enfleurage à chaud est réservé aux fleurs moins fragiles, comme la rose centifolia, la violette, la fleur d'oranger et la cassie. Le corps gras utilisé est souvent de la graisse animale raffinée. Le produit obtenu dans les deux cas est appelé pommade florale, qui peut subir, par la suite, une extraction par l'alcool afin d'avoir une absolue (LUCCHESI. M.E., 2005) (BESOMBES. C ,2008).

4. Extraction assistée par micro-ondes

✓ Micro-ondes

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques qui occupent, dans le spectre électromagnétique (figure 12), une bande de fréquence de trois décades de 300 GHz à 300 MHz. Les longueurs d'ondes associées s'étalent de 1 millimètre à 1 mètre. La fréquence la plus utilisée est de 2450 MHz correspondant à la fréquence de la majorité des magnétrons des fours micro-ondes de cuisine ayant une puissance de 600 à 1000 Watts et une longueur d'onde dans l'air de 12,2 cm (LUCCHESI. M.E., 2005).

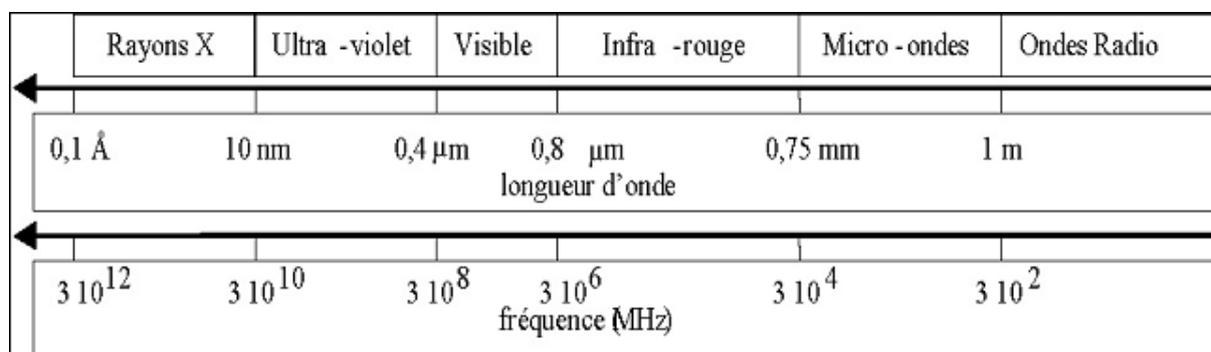


Figure 12 : Spectre électromagnétique (LUCCHESI. M.E., 2005).

✓ Le chauffage micro-ondes

Des matériaux capables de s'échauffer sous l'action des micro-ondes sont ceux composés de molécules formant des dipôles électriques (matériaux électriquement neutres mais ayant une répartition dissymétrique de leurs charges ioniques partielles) (LUCCHESI. M. E., 2005).

Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel. Le transfert de chaleur classique se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient. Sous chauffage micro-ondes, le volume traité devient lui même source de chaleur. On parle de dégagement de la chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient. La figure 13 illustre les deux modes de chauffage (LUCCHESI. M. E. 2005).

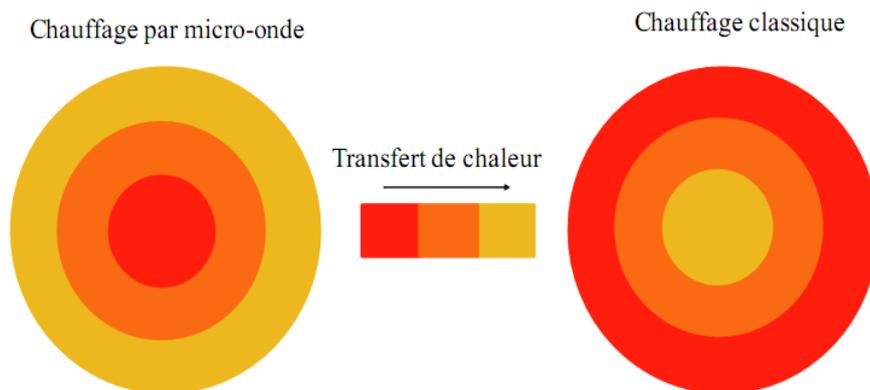


Figure 13 : Transfert de chaleur sous chauffage classique et sous chauffage par micro-onde (FARHAT. A., 2010).

Les techniques d'extraction utilisant la technologie microondes sont très nombreuses. L'entraînement à l'air assisté par micro-ondes « Compressed Air Microwave Distillation (CAMD) » a été proposé en 1989 par Craveiro, comme la première technique d'extraction des huiles essentielles sous chauffage micro-ondes (A.A. Craveiro et *al.*, 1989). D'autres techniques ont été développées, l'hydrodistillation assistée par micro-ondes « Microwave Assisted Hydrodistillation (MAHD) » qui a été développée par Stashenko. E. E et *al.* (2004), et d'autres ont été brevetées telle que, l'hydrodiffusion assistée par micro-ondes et gravité « Microwave Hydrodiffusion and Gravity (MHG) » qui a été brevetée par Chemat F. et *al.* (2008).

Les avantages de ces variantes par rapport aux méthodes d'extraction classiques peuvent être résumés ci-dessous :

- ❖ Quantitatif : des rendements similaires ou parfois meilleur à ceux obtenus par les méthodes classiques (Romanik G. et *al.*, 2007)
- ❖ Qualitatif : les huiles essentielles obtenues présentent une proportion plus importante de composés oxygénés (Okoh O.O. et *al.*, 2010)
- ❖ Temps d'extraction: le procédé se réalise avec un court temps d'extraction (Romanik. G et *al.*, 2007)
- ❖ Economique : Comme le temps d'extraction est réduit, le procédé est plus économique en temps et en énergie et par la suite en coût

- ❖ Environnemental : dans le cas des techniques assistée par micro-ondes sans solvants le système n'utilise ni du solvant organique ni de l'eau. (LUCCHESIE M.E. et al., 2004).

5. L'extraction assistée par ultrasons

L'utilisation des ultrasons pour l'extraction sur les matrices végétales ou alimentaires est un nouvel outil permettant d'augmenter les rendements et/ou d'accélérer les cinétiques d'extraction. Ces améliorations peuvent être attribuées à l'amélioration de la diffusion des substances dissoutes de l'intérieur de la cellule vers le milieu d'extraction. Les premières applications ont été liées à la détermination des métaux dans les aliments. Les applications couvrent aujourd'hui l'extraction de nombreux autres composés comme les arômes, les antioxydants, les huiles et les colorants (tableau 2) (Veillet, 2009).

Cette technique est apparue en 1950, avec des équipements de taille laboratoire. Elle représente une adaptation de l'hydrodistillation pour les huiles essentielles ou de l'extraction par solvants organiques pour les extraits aromatiques. En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et dans le même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (Veillet S., 2010).

Tableau 2 : Extraction assistée par ultrasons de saveurs et arômes (Veillet S., 2010).

Matrice	Analytes	Conditions d'extraction
Brandy et vin rouge	Composés aromatiques	US, 20 °C, 3-étapes d'extraction CH ₂ CL ₂ . TS : 3*10 min. Valeurs moyennes (µg/l) : 291 (linalol), 248 (α-terpinéol), 397 (citronellol)
Graines de carvi	Carvone et limonène	US, 20 KHz, 150 W, 20 °C, n-hexane. TS : 60 min. Rd (mg/g) : 17 (carvone) 16 (limonène).
Vanille	Vanilline	US, 20 KHz, 750 W, 25 °C, EtOH or EtOH/H ₂ O. TS:1-2 min.
Safran	Safranal	US, 35 KHz, 25 °C, H ₂ O : Et ₂ O. TS : 5*10 min. Rd : Safranal entre 40.7 and 647.7 mg/100g safran
Miel	Composés aromatiques	US, 25 °C, H ₂ O, n-pentane : Et ₂ O, TS : 2*10 min.
Mout de vin	Composés aromatiques	US, 48 KHz, 20 °C, 3-étapes d'extraction avec CH ₂ CL ₂ . TS : 3*10 min.

La technologie basée sur les ultrasons est utilisée dans de nombreux procédés tels que, la cuisson, la congélation, la cristallisation, le séchage, le dégazage, la filtration, le démoulage, la destruction de la mousse, l'émulsification, et les techniques d'extraction (Chemat. F et *al.*, 2011). Aujourd'hui de multiples équipements industriels existent sur le marché (figure 14)



Figure 14: Equipements ultrasoniques industriels : 50, 500 and 1000 l (Chemat. F et *al.*, 2011)

- ✓ Phénomène de cavitation généré par les ultrasons

Lorsque des ultrasons se propagent à travers un liquide, les oscillations des molécules provoquent la formation des zones de compression et de dépression ou de raréfaction (figure 15).

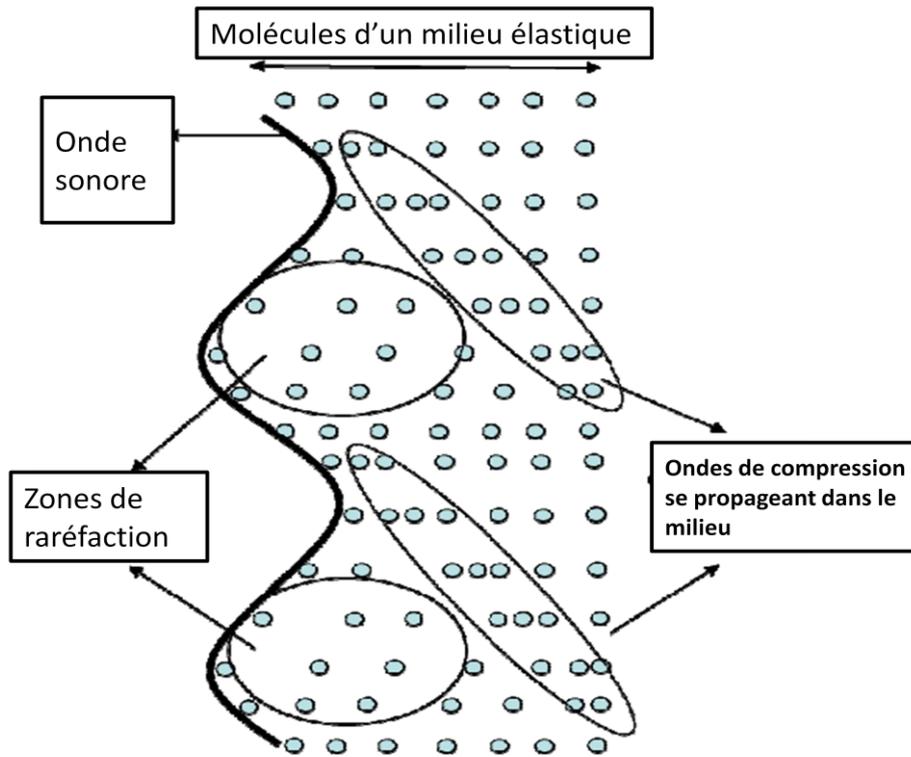


Figure 15 : Propagation de l'onde sonore dans un milieu (Veillet. S, 2010).

Des variations de pression entre phases de compression et de raréfaction sont générées, ce qui implique des mouvements moléculaires induisant des distensions et des rapprochements entre des groupes de molécules. Lors de cycles de raréfaction la distance d augmente (figure 16).

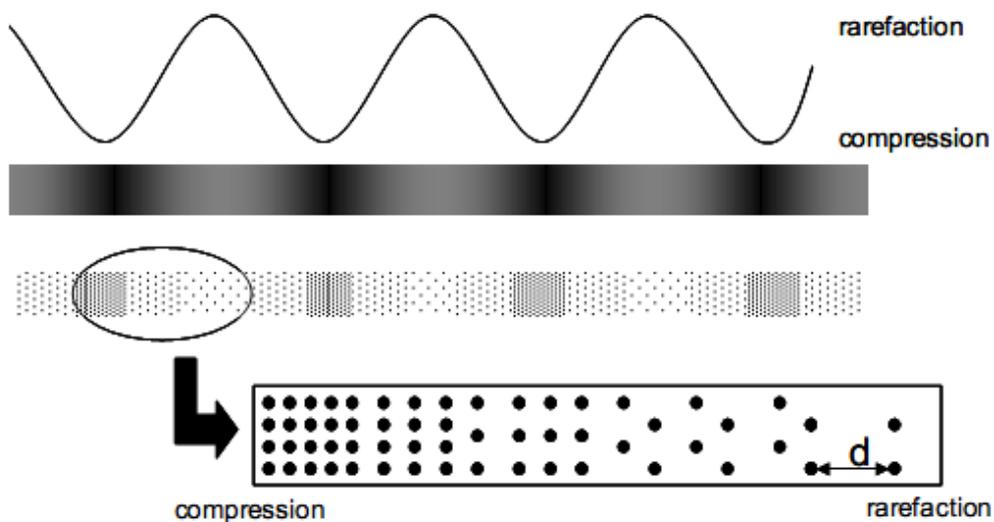


Figure 16: Cycles de compression et de raréfaction induits par une onde sonore (Veillet. S, 2010).

Chaque milieu liquide possède une distance moléculaire d critique au dessous de cette distance le liquide reste intacte, mais au dessus de ce seuil caractéristique, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation contenant de la vapeur du liquide et des gaz dissous apparaissent. Ce phénomène est appelé la cavitation (Veillet. S, 2010) (Chemat. F et *al.*, 2011).

6. Autres techniques d'extraction

Il ya d'autres techniques employées pour l'extraction des molécules d'intérêts à partir des plantes ;

✓ Extraction par solvant organique

L'extraction par solvants organiques volatils reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, méthanol et moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone.

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

- Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau
- Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué
- Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau
- De résinoïdes ou extraits éthanoliqes concentrés
- Des oléorésines et des concrètes qui sont respectivement des extraits à froid et à chaud au moyen de solvants divers.

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

✓ Extraction soxhlet

L'extracteur de Soxhlet un appareil spécialement conçu pour l'extraction continue solide liquide. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal (Photo 1). Cette cartouche est fixée sur un réservoir à siphon et elle est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution

collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en solutés à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec le solvant. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de solutés (LAGNIKA. L 2005).

Cette technique permet une récupération haute, mais a un certain nombre de lacunes, y compris l'extraction à long temps, grande consommation de solvants et de l'énergie électrique (Romanik. G et *al.*, 2007).



Photo 1: Extracteur Soxhlet (INPMA).

✓ Extraction par des fluides supercritiques

Les fluides supercritiques possèdent la capacité de pénétrer l'échantillon de matériel végétal presque aussi bien que des gaz, ce qui résulte de leur coefficient de diffusion élevé et une faible viscosité. Dans le même temps, leur pouvoir de dissolution est semblable aux liquides. L'agent le plus couramment utilisé est le dioxyde de carbone, en raison de son faible coût, faible toxicité, et à des paramètres critiques favorables ($T_c = 31,1^\circ \text{C}$, $P_c = 74,8 \text{ atm}$). Le CO_2 comme une substance non polaire est capable de dissoudre les composés apolaires et

modérément polaires. Un mélange de CO₂ avec des modificateurs (solvants organiques polaires) est utilisé pour l'extraction de substances polaires.

Les avantages les plus importants de l'extraction en utilisant les liquides supercritiques comprennent: la réduction considérable du volume de solvant utilisé, du temps d'extraction et la facilité d'automatisation (Romanik. G *et al.*, 2007).

IV- Techniques d'analyse chimique des huiles essentielles

L'analyse chimique des huiles essentielles permet d'identifier et de quantifier ses constituants. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de composés. En effet, la CPG est la méthode de référence utilisée pour analyser les huiles essentielles (Lehotay *et al.*, 2002), elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées (Arpino *et al.*, 1995).

✓ La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée pour l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du millilitre voire du microlitre. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs à ionisation de flamme (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles (PAOLINI. J, 2005).

Chaque constituant est caractérisé par un indice calculé à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, dans les mêmes conditions d'analyse des échantillons (indice de Kováts) (Kováts E., 1965) ou en programmation de température (indices de rétention) (Van Den Dool H *et al.*, 1963). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes (PAOLINI. J, 2005).

✓ Couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (CG/SM)

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatisants. La CG sur colonne capillaire constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation en impact électronique (FERNANDEZ. X).

Partie II

Matériel &

méthodes

I. Matériel biologique

1- Matériel végétal

Trois plantes aromatiques et médicinales ont été sélectionnées sur la base des recherches bibliographiques, elles ont été identifiées par le botaniste de l'institut des plantes médicinales et aromatiques à Taounate (INPMA), Pr. Abdeslam ENNABILI.

La récolte des parties aériennes de ces plantes a été effectuée au jardin de l'INPMA pendant le mois de février (14/02/2011), sous le contrôle et la direction de l'ingénieur responsable du Jardin :



Photo 2: La sauge officinale : *Salvia officinalis* (INPMA)



Photo 3 : Le romarin: *Rosmarinus officinalis* (INPMA)



Photo 4: La lavande stéchede: *Lavandula stoechas* (INPMA)

2- Matériel microbiologique

Onze souches bactériennes ont été utilisées dans ce travail, parmi elles neuf souches de référence et deux souches de l'institut Pasteur (tableau 3)

Tableau 3: Souches bactériennes test

Code	Souche
H	<i>E.coli</i> HB 101
Ec1	<i>E.coli</i> 0128B12
Ec2	<i>E.coli</i> CIP 5412
AL	<i>E.coli</i> AL52
DH5a	<i>E.coli</i> DH5a
Ps1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A22
Ps2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Bs1	<i>Bacillus subtilis</i> IL B142B
Bs2	<i>Bacillus subtilis</i> IL P1428B
Sa1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922
Sa2	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 543154

II. Techniques d'extraction

1. Macération

Les parties aériennes des plantes récoltées ont été séchées et broyées.

- Délipidation par l'hexane :

Une quantité de la matière végétale séchée et broyée est mise dans un erlenmeyer et rajoutée d'un certain volume d'hexane (tableau 3). Le mélange a été soumis à une agitation à température ambiante pendant 2 heures. Puis il est filtré et le solvant a été évaporé sous vide à l'aide d'un rotavapor.

- Macération par méthanol :

La matière végétale délipidée a été ensuite mélangée avec du méthanol (tableau 4). Le mélange a été agité pendant 10 h à température ambiante, après filtration le solvant a été évaporé sous vide. L'extrait obtenu est pesé et le rendement par rapport à la matière sèche est calculé.

Tableau 4: Masse de la matière végétale et volume du solvant utilisés pour la macération

Matière végétale sèche (g)	Volume d'hexane (ml)	Volume de méthanol (ml)
50 g (<i>Salvia officinalis</i>)	300	300
100 g (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	350	300
50 g (<i>Lavandula stoechas</i>)	300	300

2. Sonication :

La matière végétale sèche broyée a été soumise à une extraction par ultrasons en utilisant le méthanol.

A 50 g de la plante séchée et broyée, 200 ml de méthanol ont été rajoutés, l'ensemble a été soumis à la sonication (Photo : 5)



Photo 5 : Extracteur par ultrasons

Deux sonications I et II ont été réalisées avec les paramètres suivants (tableau 5), et chaque sonication a été répétée deux fois :

Tableau 5: Paramètres de la sonication

Paramètres	Sonication I	Sonication II
Fréquence	35 KHz	130 KHz
Puissance	100%	100%
Fonction	Normale	Normale
Température	30 C°	30 C°
Temps	45 min (3*15 min)	45 min (3*15 min)

Les mélanges ont été filtrés, le solvant est évaporé sous vide, l'extrait obtenu est pesé, mis dans un flacon et le rendement par rapport à la matière sèche est calculé.

- NB : tous les extraits obtenus ont été conservés à 4°C, à l'obscurité.
- Calcul du rendement :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{M(\text{ext})}{M_s} * 100$$

Rdt (%): Rendement

M (ext) : Masse de l'extrait obtenu

Ms : Masse de la matière végétale sèche

3. Hydrodistillation

Les parties aériennes fraîches des plantes *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* et *Lavandula stoechas*, a été soumise à une hydrodistillation à l'aide d'un appareil Clevenger.

NB : Pour *Lavandula stoechas*, les huiles essentielles des boutons floraux ont été extraites séparément de celles des tiges et des feuilles.

Une masse déterminée de la plante fraîche est introduite dans un ballon unicol et rajoutée de l'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heure. Le volume de l'huile essentielle obtenue est déterminé. Deux répétitions ont été réalisées.

L'huile essentielle récupérée a été stockée à 4 °C à l'obscurité.

Tableau 6: Quantité de la matière végétale fraîche hydrodistillée

	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	
Partie distillée	Aérienne	Aérienne	Tiges et feuilles	Boutons floraux
Masse (g)	200	200	200	130



Photo 6: dispositif de l'hydrodistillation

Pour calculer le rendement par rapport à la matière sèche, il est nécessaire de calculer d'abord le pourcentage d'humidité spécifique à chaque plante. 20g de l'échantillon de la

matière fraîche de la plante destinée à l'hydrodistillation ont été placés dans l'étuve réglée à 100 °C, après 24 heures la matière sèche est pesée.

Deux répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon.

- Calcul de l'humidité H(%)

$$H (\%) = \left[\frac{M_f - M_s}{M_f} \right] * 100$$

M_f et M_s sont respectivement les masses de la plante à l'état frais et à l'état sec.

- Calcul du rendement en huile essentielle :

Il est exprimé en ml de distillat pour 100 g de la matière sèche par la relation suivante :

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

Rdt (%): rendement en huiles essentielles en (ml/g)

V: volume d'huiles essentielles recueilli

ΔV: erreur sur la lecture

M_s: masse de la matière végétale sèche

III. Analyse chimique des extraits aromatiques

1. Révélation de la présence des flavonoïdes

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapide (Karumi et al. , 2004).

Le test consiste à ajouter à 1ml de l'extrait méthanolique, 1ml d'alcool chlorhydrique (HCl, éthanol, eau distillée), des copeaux de magnésium métallique, et 0.2 d'alcool

isoamylique. Laisser agir 3 min et observerer le changement de la couleur. La présence de flavonoïdes est confirmée par la coloration rose orangée (flavones), rose violacée (flavonones), rouge (flavonols, flavononols).

2. Dosage des polyphénols totaux

- Principe :

Les polyphénols totaux peuvent être dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu (El Hajaji, H et al., 2011).

En milieu basique, le réactif de Folin-Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés phénoliques présents dans l'échantillon à doser. Les produits de réduction (oxydes métalliques $W8O23$ et $Mo8O23$) de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols totaux présents dans l'échantillon (Veillet. S., 2010).

La quantification des polyphénols totaux a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par l'acide gallique à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait méthanolique.

- Préparation de la solution de $NaCO_3$:

200 g de carbone de sodium anhydre ont été dissouts dans 800 ml d'eau distillée et porter à ébullition. Après refroidissement quelques cristaux de $NaCO_3$ ont été ajoutés, et après 24 h on filtre et on ajoute de l'eau distillée à 1 litre.

- Préparations des solutions d'acide gallique :

Dans une fiole jaugée de 100 ml, 0.5 g d'acide gallique ont été dissouts dans 10 ml d'éthanol et diluées au volume avec de l'eau distillée d'une façon à obtenir des concentrations de 500 mg/l, 250 mg/l, 150 mg/l, 100 mg/l et 50 mg/l.

- Courbe d'étalonnage :

Une courbe d'étalonnage qui va servir pour la transformation des densités optiques lues à partir du spectrophotomètre en concentrations de polyphénols totaux, a été réalisée avec la mesure de la densité optique des solutions de différentes concentrations d'acide gallique.

- Mode opératoire

Après solubilisation de 4 mg de l'extrait dans 4ml d'eau distillé, 20 µl de cette solution ont été ajoutés à 1.58 ml d'eau distillé et 100 µl du réactif de Folin-Ciocalteu, après 5 minutes 300 µl d'une solution de NaCO₃ (préalablement préparée) sont ajoutés, le mélange a été agité et incubé à température ambiante pendant 2h. L'absorbance à 765 nm et ensuite mesurée.

IV. Analyse chimique des huiles essentielles

1. Chromatographie en phase gazeuse/FID

Les analyses chromatographiques des huiles essentielles ont été effectuées sur une colonne en phase gazeuse de type RTX-440, apolaire (30 m* 0.32 mm, 0.25 µm épaisseur du film).

L'appareil est équipé par un détecteur à ionisation de flamme (FID) alimenté par un mélange de gaz H₂/air. Le gaz vecteur utilisé est l'azote avec un débit de 1ml/min.

L'injection est assurée par un injecteur PVT (Température de Vaporisation Programmée) de type split-splitless. Le mode d'injection est split (fluide : 1/50, débit : 66 ml/min), le volume injecté est 1 µl.

La température au niveau de l'injecteur est réglée à 50 °C. Elle reste constante pendant 5 min jusqu'à l'élimination du solvant qui accompagne l'échantillon injecté. L'injecteur est porté ensuite à 250 °C à raison de 4°C/min avec un plateau de 5 min pour la température initiale et de 10 min pour la température finale.

L'appareil est piloté par un système informatique de type " ChromQuest ", gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques (Photo 7)



Photo 7: chromatographe gazeux /FID (CURI)

2. Identification des composés volatils des huiles essentielles

L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son indice de Kovats qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. Ce système est basé sur une notion de rétention relative. Il compare la rétention d'un produit quelconque à celle d'un alcane linéaire.

Il a été calculé à partir des temps de rétention fournis par les chromatogrammes des huiles essentielles et le chromatogramme obtenu en injectant un mélange d'alcane de C9 à C23 dans les mêmes conditions opératoires que celles des huiles essentielles. L'indice de Kovats IK d'un produit inconnu x est donné par la formule suivante :

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

Avec :

IK : indice de Kovats

TR_x : temps de rétention réduit d'un composé X inconnu

TR_n : temps de rétention réduit de l'alcane à n atomes de carbone qui sort juste avant le composé X

TR_{n+1} : temps de rétention réduit de l'alcane à (n+1) atomes de carbone qui sort juste après le composé X

La technique d'identification des composés des huiles essentielles en se basant sur leurs indices de Kovats est largement utilisée dans de nombreux travaux (Derwich et al., 2010)(E. Derwich et al., 2010). Une table des indices de Kovats spécifiques à chaque produit sont proposés dans la littérature (Adams ; Essentiel Oil Components by GC/MS). Ces indices de références ont été comparés à ceux calculés à partir de nos échantillons.

V. Activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits aromatiques

Pour étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits méthanoliques obtenus, on a choisi la méthode de diffusion sur disques, ou méthode de Vincent, appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme (Rhayour. K, 2002). Dans cette méthode, on a utilisé des disques de papier Whatman de 5 mm de diamètre, imprégnés par un volume connu de l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface par la suspension bactérienne. Après incubation, la lecture des résultats a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm.

1. Préparation des suspensions des souches bactériennes

Onze souches bactériennes ont été utilisées dans ce travail, parmi elles neuf souches de référence et deux souches de l'institut Pasteur (tableau 3)

A partir des souches stockées dans le glycérol à -80°C, des cultures liquides dans le milieu LB ont été préparées, puis des boîtes de pétri ont été ensemencées et incubées pendant 24 h à 37 °C. Ces boîtes ont été utilisées pour la préparation des cultures liquides d'une nuit.

2. Préparation des solutions des extraits aromatiques

Les extraits méthanoliques obtenus par macération et par sonication ont été dissouts dans le DMSO à 2%, afin d'avoir une concentration de 500 mg/ml. Les solutions obtenues ont été stockés à 4°C à l'obscurité.

3. Méthode de diffusion sur disques

Des boîtes pétri contenant du milieu LB stérile ont été étalées par 100 μ l de la culture bactérienne, les disques de papier Whatman (5 mm) stériles ont été déposés et imbibés par 10 μ l de l'extrait. Les témoins négatifs ont été réalisés par le DMSO à 2%.

Pour les huiles essentielles, les disques ont été imbibés par des volumes variables 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l. Un seul disque est déposé par boîte. Les témoins négatifs ont été réalisés par dépôt des disques stériles.

L'incubation des boîtes a été effectuée à 37 °C pendant 24 h. La lecture des résultats est faite par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition en mm.

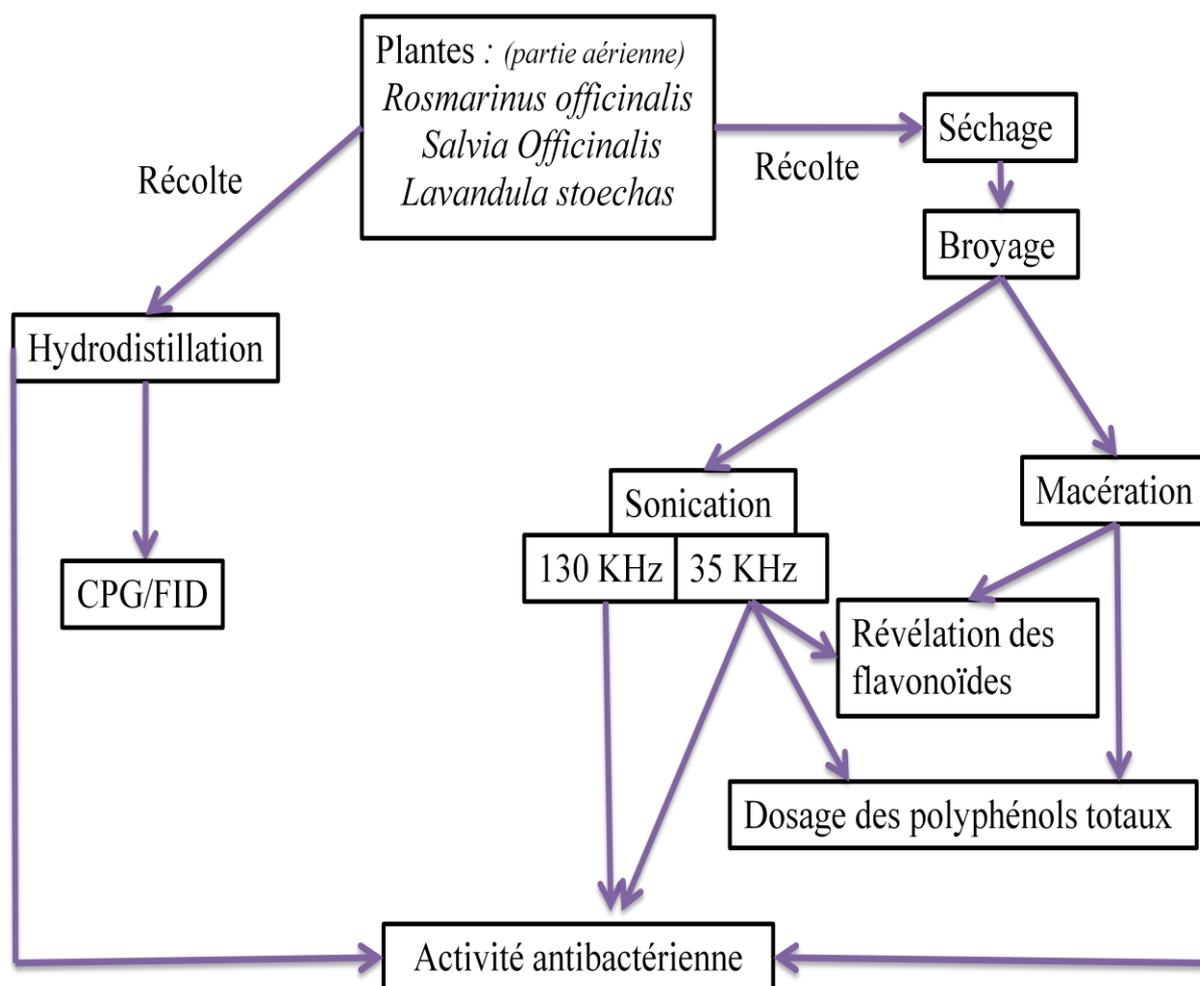


Figure 17: Schéma résumé de la partie expérimentale

Partie III

Résultats &

discussions

I. Résultats de l'extraction

1- Macération

Les rendements de la macération par l'hexane (solvant apolaire) ont été importants pour la sauge et le romarin (Tableau 7). Ce qui reflète la teneur en lipides élevée par rapport à la lavande stéchade.

Le méthanol est le solvant le plus polaire, il permet l'extraction d'une grande fraction des composés organiques à partir de la matière végétale notamment les antioxydants. Ce qui explique les rendements supérieurs à ceux obtenus par l'hexane (Rosangela. A. J et *al.*, 2007). Le romarin et la sauge présentent toujours des rendements supérieurs, 15,8 et 13,88 % respectivement ce qui reflète leur richesse en composés extractibles par rapport à la lavande stéchade (9,78 %).

Tableau 7: Résultats de la macération

Plante	Poids de la plante (g)	Solvant	Poids de l'extrait (g)	Rendement (%)
<i>Salvia officinalis</i>	50	Hexane	2.15	4.3
		Méthanol	6.94	13.88
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	Hexane	3.4	3.4
		Méthanol	15.8	15.8
<i>Lavandula stoechas</i>	50	Hexane	0.88	1.76
		Méthanol	4.89	9.78

2- Sonication

L'extraction par ultrasons avec le méthanol a donné des rendements de 4% à 12% (tableau 8). La sauge et le romarin présentent les rendements les plus élevés par rapport à la lavande.

La sonication réalisée avec 35 KHz a montré une efficacité d'extraction plus importante que celle réalisée avec 130 KHz. Cette différence se voit en comparant les rendements des trois plantes obtenus par l'utilisation de ces deux fréquences.

Tableau 8: Rendements obtenus par la sonication (35 KHz) et (130 KHz)

Plante	Sonication (35 KHz)	Sonication (130 KHz)
<i>Salvia officinalis</i>	11.78	5.18
<i>Rosmarinus officinalis</i>	8.7	5.5
<i>Lavandula stoechas</i>	4.59	3.96

La comparaison des rendements obtenus par sonication et par macération, montre que cette dernière a donné des rendements supérieurs à ceux obtenus par sonication (tableau 9). Cependant des études ont montré que la sonication peut être plus efficace que la macération si les conditions de l'extraction sont optimisées.

Tableau 9: Comparaison des rendements obtenus par macération et par sonication

Plante	Rendement (%) macération	Rendement (%) sonication (35 KHz)	Rendement (%) sonication (130 KHz)
<i>Salvia officinalis</i>	13.88	11.78	5.18
<i>Rosmarinus officinalis</i>	15.8	8.7	5.5
<i>Lavandula stoechas</i>	9.78	4.59	3.96

L'étude de Romanik. G (2007) a montré que la sonication est la technique d'extraction la plus rentable et économique, avec un coût faible, un temps d'extraction court et un volume de solvant faible, en la comparant avec l'extraction Soxhlet, l'extraction accélérée par solvant, l'extraction assistée par microondes et l'extraction par des fluides supercritiques.

Une autre étude qui a été faite afin de comparer l'extraction par macération et par sonication, et qui a montré que la sonication a prouvé sa simplicité, sa rapidité et son efficacité que la macération conventionnelle pour l'extraction des composés organiques à partir de la matière végétale (Rosangela A. J et *al.*, 2007).

Afin de mieux comprendre le phénomène au niveau cellulaire lors de l'extraction par ultrasons Veillet. S (2009) a réalisé une expérience, selon laquelle des fragments de feuilles de basilic ont été prélevés après macération et après sonication. Ces fragments ont été ensuite observés par microscope électronique à balayage et comparés à des fragments de feuilles fraîches (ANNEXE 10 : Figure 18). Quand les feuilles sont fraîches on peut facilement observer que les glandes d'huile essentielle se retrouvent à la surface de la feuille de basilic,

dans un léger renforcement de cellules. Ces glandes apparaissent sous forme sphérique et il en existe de différentes tailles partout sur la feuille (Annexe 10 :Figure 18.1 et 18.2) (Chemat. F et *al.*, 2011 ; Veillet. S 2009).

Lors du processus de macération (Annexe 10 : Figure 18.3 et 18.4), ces glandes d'huile essentielle vont se vider de leur contenu progressivement, mais à un rythme lent. En effet l'huile essentielle sort de la glande par un phénomène de diffusion passive, ces glandes ne sont toujours pas complètement vidées de leur contenu. A l'inverse, lors d'une extraction assistée par ultrasons, les bulles de cavitation générées par les ultrasons permettent l'explosion des glandes (Annexe 10 : Figure 18.5 et 18.6). Cette différence fondamentale entre un procédé de diffusion passive et un procédé qui faisant exploser les parois et les membranes cellulaires permet d'expliquer les rendements obtenus après 45 min de sonication et donc l'accélération de la cinétique d'extraction.

✓ Influence de la fréquence

Les rendements obtenus par la fréquence de 35 KHz ont été supérieurs à ceux obtenus par 130 KHz pour les trois plantes (tableau 8).

Les fréquences les plus couramment utilisées pour l'extraction des composés organiques à partir des végétaux sont entre 20 et 40 kHz. De plus hautes fréquences rendent plus difficile la cavitation. En effet, les bulles de cavitation ont besoin du temps pour être générées pendant la phase de raréfaction. Plus la fréquence est élevée, plus les phases de raréfaction sont courtes donc moins la bulle a de chance pour être créée (Veillet. S, 2009). C'est pour cette raison que les ultrasons de haute fréquence sont dits non destructeurs ; la fréquence est trop élevée pour pouvoir permettre la cavitation ce qui justifie les rendements faibles obtenus par 130 KHz par rapport à ceux obtenus par la fréquence 35 KHz.

3- L'hydrodistillation

- Taux d'humidité :

Les résultats obtenus ont révélé un taux d'humidité important compris entre 52% et 73% (figure 19). Ce qui signifie que approximativement la moitié ou plus de la moitié du poids frais de la plante est constituée par l'eau. Les boutons floraux de la lavande stéchade montrent une teneur en eau très importante 73.4 %, la sauge officinale présente aussi une proportion considérable en eau 64.83 % environ les 2/3 du poids frais de la plante. Par contre

le romarin et les tiges et les feuilles de la lavande présentent une teneur en eau de 52% c'est-à-dire la moitié du poids frais.

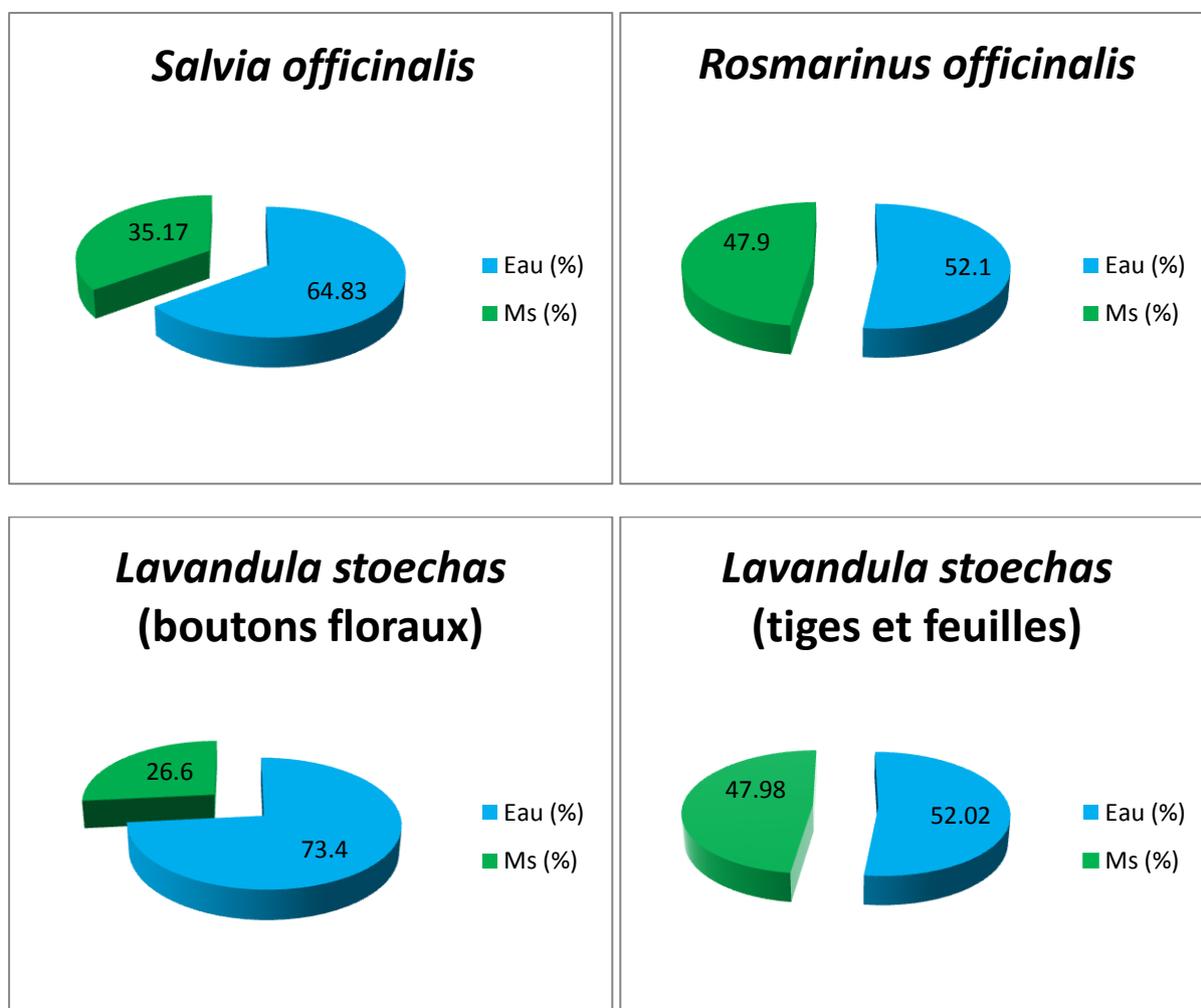


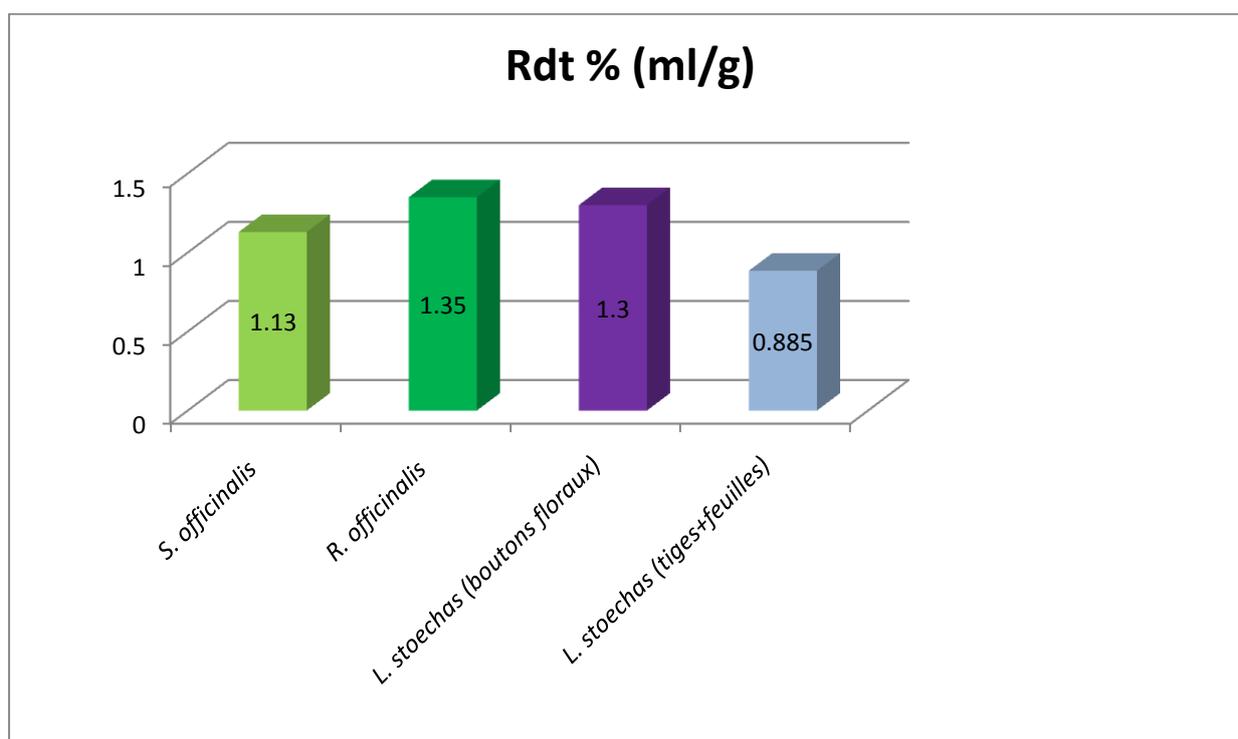
Figure 19 : Teneur en eau des trois plantes médicinales

- L'hydrodistillation

Les rendements moyens en huiles essentielles obtenus, qui ont été calculés en fonction de la masse du matériel végétal sec, varient sensiblement entre les différentes plantes (tableau 10, figure 20). Le romarin permet une extraction avec le rendement le plus élevé 1.35 %, suivi par les boutons floraux de la lavande stéchede et la sauge officinale. Ces rendements sont voisins de ceux cités dans nombreuses études, *Salvia officinalis* (FELLAH. S et al., 2006), *Rosmarinus officinalis* (Bedrossian. C. 1999).

Tableau 10: Rendements en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation

Plante	Poids MVF (g)	Volume d'HE (ml)	H (%)	Rdt % (ml/g)
<i>Salvia officinalis</i>	400	1.6	64.83	1.13 ± 0.021
<i>Rosmarinus officinalis</i>	400	2.6	52.1	1.35 ± 0.01
<i>Lavandula stoechas</i> (boutons floraux)	260	0.9	73.4	1.3 ± 0.043
<i>Lavandula stoechas</i> (tiges+feuilles)	400	1.7	52.02	0.885 ± 0.015

**Figure 20: Rendement en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation**

L'influence de la partie de la plante utilisée pour l'extraction sur le rendement des huiles essentielles se voit clairement en comparant le rendement des boutons floraux (1.3 %) qui dépasse celui des tiges et des feuilles (0.885) de la même plante, chose qui est confirmée par l'étude de SKOULA. M et al (1996), qui a montré que les boutons floraux sont plus riches en huiles essentielles que les feuilles de *Lavandula stoechas*.

II. Composition chimique des extraits aromatiques

1. Test des flavonoïdes

Le test réalisé permettant la mise en évidence de la présence des flavonoïdes a été positif pour les extraits méthanoliques de *Salvia officinalis* obtenus par macération et par sonication, la couleur rose orangée suggère l'existence des flavones (Figure 7). Le même résultat a été trouvé pour l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* obtenu par sonication. Cependant l'extrait obtenu par macération de la même plante et les deux extraits de *Lavandula stoechas* ont montré un test de révélation négatif (tableau 11) ce qui peut être expliqué par la faible teneur ou l'absence des flavonoïdes dans ces extraits.

Tableau 11: Résultats de la révélation des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques

Plante	Extrait	Méthode d'extraction	Résultats	Coloration	Type de flavonoïdes
<i>R. officinalis</i>	PM1	Sonication (35 KHz)	+	Rose orangée	Flavones
	PM3	Macération	-	-	-
<i>S. officinalis</i>	PM4	Sonication (35 KHz)	+	Rose orangée	Flavones
	PM6	Macération	+	Rose orangée	Flavones
<i>L. stoechas</i>	PM7	Sonication (35 KHz)	-	-	-
	PM9	Macération	-	-	-

+ : présence, - : absence

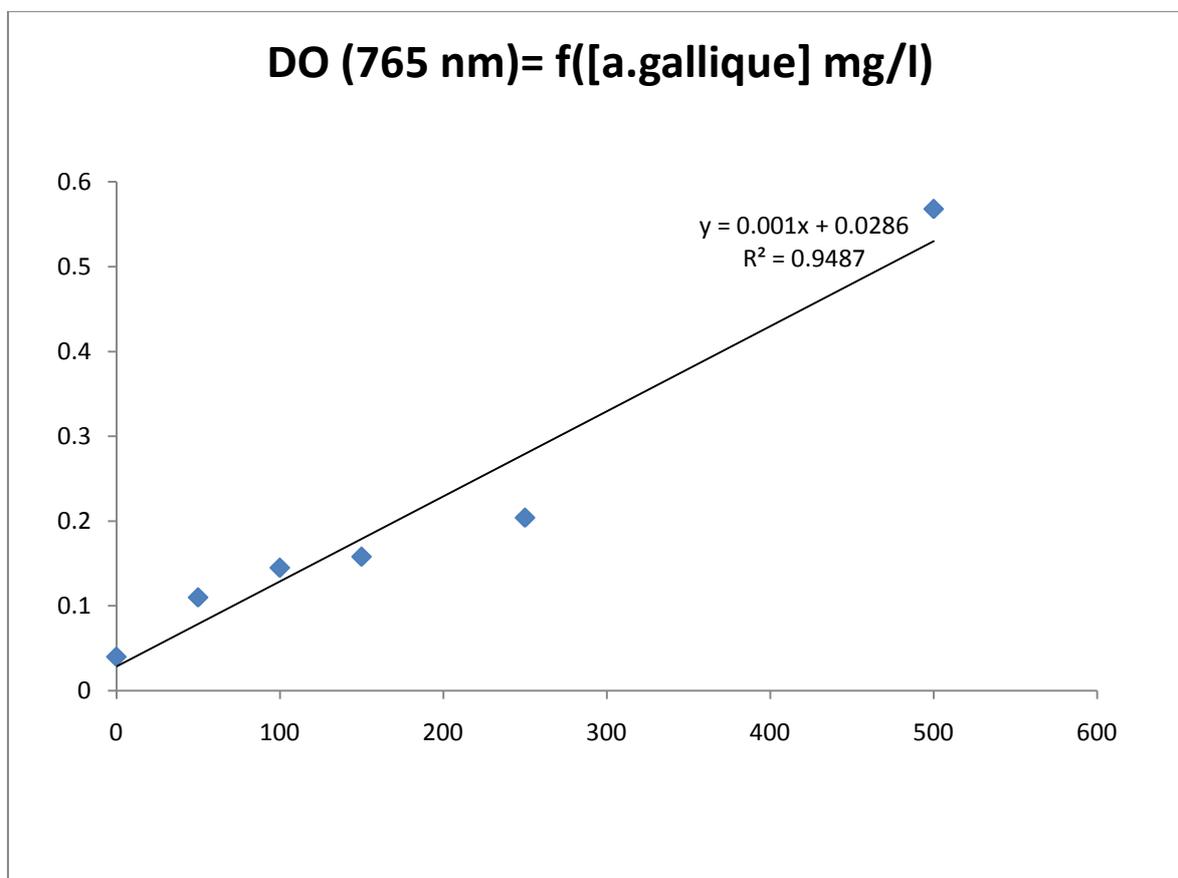
2. Teneur en polyphénols totaux

- Courbe d'étalonnage (figure 21)

La courbe d'étalonnage (figure) a été tracée par les données représentées dans le tableau 12 qui regroupe les densités optiques mesurées de chaque solution à concentration connue d'acide gallique.

Tableau 12: Les absorbances correspondantes à des différentes concentrations d'acide gallique

[Acide. Gallique] mg/l	DO (765 nm)
500	0.568
250	0.204
150	0.158
100	0.145
50	0.11
0	0.04

**Figure 21: Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux**

- Teneur en polyphénols totaux des extraits méthanoliques

L'étude quantitative des extraits méthanoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avaient pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols.

Les quantités des polyphénols correspondantes ont été rapportées en équivalent mg d'acide gallique par gramme d'extrait méthanolique et déterminées par l'équation de type ($y = a x + b$). Les résultats obtenus ont été représentés dans le tableau 13 et la figure 22.

Tableau 13: Teneur en polyphénols totaux des extraits méthanoliques

	Méthode d'extraction	DO (752 nm)	mg eq A. Gallique/g d'extrait méthanolique
PM1	Sonication	0.2222	193.6
PM3	Macération	0.21	181.4
PM4	Sonication	0.2237	195.1
PM6	Macération	0.1451	116.5

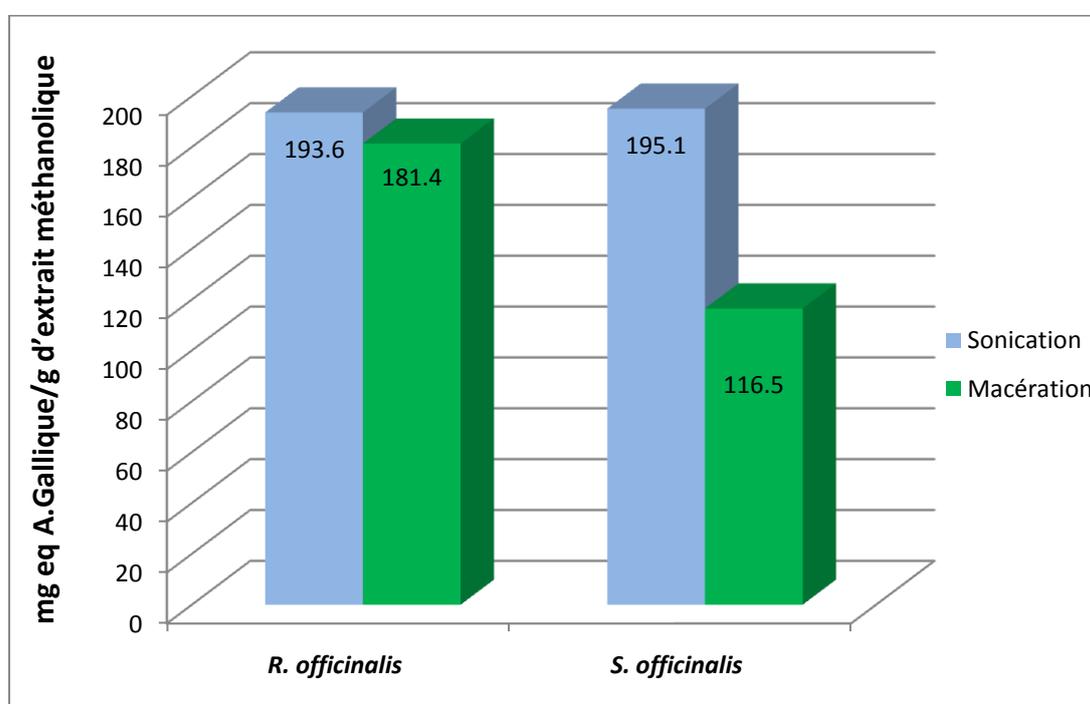


Figure 22: Teneur en polyphénols des extraits méthanoliques

Ces résultats montrent d'abord que les deux plantes (*R. officinalis* et *S. officinalis*) contiennent des polyphénols, avec des teneurs voisines.

Une deuxième remarque, réside dans l'effet de la méthode d'extraction sur la quantité des polyphénols extraite. Comme le montre le graphe (figure 22), la sonication a montré plus d'efficacité que la macération pour l'extraction de ces molécules. Ceci s'explique par la différence entre la diffusion passive (macération) et le phénomène de cavitation (sonication).

La cavitation provoque la destruction des parois et des membranes cellulaires ce qui rend les composés organiques de la plantes facilement lessivables par le solvant. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Paniwnyk. L et *al* (2009).

Paniwnyk. L et *al* (2009) ont étudié l'influence de solvant sur l'extraction de l'acide rosmarinique et carnosique à partir du romarin, et ils ont prouvé que le méthanol donne des rendements plus importants que l'éthanol. Ceci est probablement dû à la nature polaire de l'acide rosmarinique favorisant le méthanol (solvant le plus polaire). Et ils ont prouvé aussi que ces rendements peuvent être améliorés en utilisant la sonication avec des basses fréquences.

Des études, ont montré que le romarin est riche en polyphénols ; des acides phénoliques représentés par l'acide rosmarinique, acide carnosique et le carnosol (Peng. y et *al.*, 2005), (Yesil-Celiktas. O et *al.*, 2007) et (Paniwnyk. L et *al.*, 2009). Et des flavonoïdes, à titre d'exemple la diosmétine, la luteoline, la 5-hydroxy-4'-7-diméthylflavone, la genkwanine, l'hispiduline, la 6-méthoxy-lutéoline, la 6-méthoxy-lutéoline-7-méthyléther, la 6-méthoxy-genkwanine -4'-méthyléther (Peng. Y et *al.*, 2005) (Hossain. M.Bet *al.*, 2011).

Salvia officinalis aussi est une plante qui contient des acides phénoliques ; l'acide rosmarinique (132.2 µg/mg d'extrait méthanolique). L'acide caféique, l'acide ferulique, l'acide 3-Caffeoylquinique et l'acide 5-Caffeoylquinique sont présents sous forme de traces dans les extraits méthanolique (Cristovao F. L et *al.*, 2007). Les flavonoïdes de la sauge officinale sont la luteolin-7-glucoside (1.2 µg/mg d'extrait méthanolique), 4', 5, 7,8-Tetrahydroxyflavone (0.1 µg/mg d'extrait méthanolique), et l'Apigenin-7-glucoside sous forme de traces (Cristovao F. L et *al.*, 2007).

III. Composition chimique des huiles essentielles (CPG/FID)

Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles ont été effectuées au niveau du centre universitaire régional d'interface (CURI) à Fès.

Vingt composés ont été identifiés dans les huiles essentielles du romarin et de la sauge officinale, et quatorze dans les huiles de *Lavandula stoechas* (Tableaux ; 14, 15, 16) (Annexe :1, 2, 3, 4, 5)

Cette caractérisation des composés présents dans les huiles essentielles a montré l'existence des hydrocarbures aliphatique monoterpènes (l' α et β -pinène, camphene,

limonene) des cétones (camphor), des éthers monoterpéniques (1,8 cinéole), des alcools monoterpéniques (linalol) et sesquiterpéniques (viridiflorol) et enfin des sésquiterpènes (α -Humulene et caryophyllene).

Le camphor et le 1.8 cinéole semblent être des composés majoritaires des trois plantes. L' α et β -pinène, borneol, et le camphene se trouvent avec des pourcentages relativement élevés dans le romarin et la sauge officinale.

Tableau 14 : Pourcentage des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Composé	IK	Pourcentage relatif (%)
α pinène	939	5.9
camphene	953	7.27
β pinène	980	5.20
3. octanone	986	1.30
Myrcene	991	4.00
α terpinene	1018	1.57
Limonene	1031	1.96
1.8 cineole	1033	6.75
γ terpinene	1062	3.29
linalol	1098	2.22
camphor	1143	6.08
borneol	1165	4.10
4- terpinol	1177	1.51
α -terpinol	1189	1.62
verbenone	1204	3.65
piperitone	1252	5.62
bornyl acétate	1285	1.98
E- caryophyllene	1418	1.40
β farnescene	1458	0.60
α bisabolol	1683	0.12

La composition chimique de l'huile essentielle du romarin obtenue (tableau 14), est très proche de celles citées dans plusieurs travaux (Hussain.I. A et *al.*, 2011 ; Jiang. Y et *al.*, 2011 ; Rasooli. I et *al.*, 2008 ; Djeddi. S et *al.*, 2007), avec L' α -pinène, camphene, β -pinène, Myrcene, 1,8 cinéole, camphor, borneol et le piperitone comme composés majoritaires.

De même les études de (Hussain.I. A et *al.*, 2011, PIEROZAN. M .K et *al.*, 2009, Bouaziz. M et *al.*, 2009, Hayouni et *al.*, 2008 ; B. Vukovic-Gacic et *al.*, 2006 ; Radulescu. V

et *al.*, 2004), confirment que les huiles essentielles de *S. officinalis* présentent comme composés majoritaires, l' α -pinène, camphene, β -pinène, Myrcene, 1,8 cinéole, camphor, borneol, bornyl acétate, *E*-caryophyllene, et le viridiflorol (Tableau 15)

Tableau 15 : Pourcentage des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

Composé	IK	Pourcentage relatif (%)
α -pinène	939	3.8
camphene	953	2.20
β pinène	980	5.04
Myrcene	991	3.07
α - phellandrene	1005	1.23
α terpinene	1018	2.44
Limonene	1031	1.02
1.8 cineole	1033	5.27
camphor	1143	5.87
borneol	1165	3.34
cis pinocamphone	1173	0.65
4- terpinol	1177	2.47
α -terpinol	1189	1.4
myrtenol	1194	0.85
bornyl acétate	1285	3.36
<i>E</i> - caryophyllene	1418	4.54
Aromadendrene	1439	0.25
α Humulene	1454	3.64
Viridiflorol	1595	4.16
Manool	2056	1.04

D'une manière générale la composition chimique des huiles essentielles des boutons floraux de *L. stoechas* diffèrent quantitativement avec celles obtenus à partir des tiges et des feuilles (tableau 16). Ce qui est confirmé par l'étude de SKOULA. M et *al* (1996).

Le fenchone et le myrtenyl acétate constituent les composés majoritaires avec des pourcentages importants des huiles essentielles des boutons floraux. Le β -pinène, le 1,8 cinéole, le camphor et le borneol sont les composés majoritaires des huiles essentielles des tiges et des feuilles de la lavande stéchede (SKOULA. M et *al.*, 1996).

Tableau 16 : Pourcentage des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* (boutons floraux et tiges + feuilles)

Composé	IK	Pourcentage relatif (%) <i>BF</i>	Pourcentage relatif (%) (tiges+feuilles)
α pinène	939	0.25	0.56
camphene	953	0.41	0.78
β pinène	980	-	2.19
p cymene	1026	0.25	0.95
1.8 cineole	1033	0.59	6.15
fenchone	1087	10.33	8.03
linalol	1098	0.5	3.62
camphor	1143	17.85	22.64
borneol	1165	0.24	3.39
lavandulol	1177	0.41	1.23
Myrtenol	1194	1.00	1.67
myrtenyl acétate	1235	11.98	0.77
lavandulyl acétate	1289	3.13	6.58
α Cadinol	1653	1.49	1.08

IV. Pouvoir antibactérien des huiles essentielles et des extraits méthanoliques

1- Activité antibactérienne des huiles essentielles :

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *R. officinalis*, *S. officinalis* et *L. stoechas*. Sont résumés dans les tableaux (17) :

L'huile essentielle de *R. officinalis* a exercé une activité inhibitrice importante vis-à-vis des bactéries Gram + (*B. subtilis* et *S. aureus*), cette activité augmente avec le volume de l'huile essentielle déposée sur le disque. Une activité inhibitrice impressionnante est apparue vis-à-vis de *Bacillus subtilis* IL P1428B (Annexe 6)

Aucune zone d'inhibition n'a été observée contre *P. aeruginosa* présentée par deux souches (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa* A22). Ces souches possèdent un potentiel de résistance élevé contre l'activité antimicrobienne de toutes les huiles essentielles testées.

E. coli représentée par 5 souches s'est avérée moins sensible que les bactéries à Gram + (*B. subtilis* et *S. aureus*). *Bacillus subtilis* est la souche qui a représenté la plus forte sensibilité vis-à-vis de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

Nos résultats concernant l'activité antibactérienne des huiles essentielles du romarin concordent avec ceux de plusieurs études récentes (Jiang. Y et al., 2011 ; Hussain. I. A et al., 2011 ; Zaouali. Y et al., 2010), de même pour la sauge officinale (Hussain. I. A et al., 2011 ; Bouaziz. M et al., 2009 ; PIEROZAN. M.K et al., 2009 ; Hayouni et al., 2008).

Tableau 17 : Diamètres d'inhibition (mm) illustrant l'activité antibactérienne des huiles essentielles

A	PHO1	PHO2	PHO3	PHO4
<i>E. coli</i> HB 101	9	10	-	8
<i>E. coli</i> 0128B12	17	12	-	13
<i>E. coli</i> CIP 5412	11	10	-	8
<i>E. coli</i> AL52	17	12	-	10
<i>E. coli</i> DH5α	11	10	-	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A22	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> IL B142B	16	+++	10	+++
<i>Bacillus subtilis</i> IL P1428B	+++	+++	7	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	15	9	-	10
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 543154	20	11	-	10

(5 µl d'HE déposée sur disque)

	PHO1	PHO2	PHO3	PHO4
<i>E. coli</i> HB 101	10	12	-	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A22	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> IL B142B	17	+++	13	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	+++

IL P1428B				
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	17	9	-	14
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 543154	20	16	-	18

(10 µl d'HE déposée sur disque)

	PHO1	PHO2	PHO3	PHO4
<i>E. coli</i> HB 101	15	12	10	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A22	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> IL B142B	31	+++	15	+++
<i>Bacillus subtilis</i> IL P1428B	+++	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	20	16	16	15
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 543154	20	17	-	18

(15 µl d'HE déposée sur disque)

+++ : Inhibition totale, - : absence d'inhibition, PHO1 : HE du romarin, PHO2 : HE de sauge officinale, PHO3 : HE des boutons floraux de la lavande stéchade, PHO4 : HE des tiges et des feuilles de la lavande stéchade

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *S. officinalis* s'est montrée très comparable à celle de *R. officinalis*, ce qui peut être expliqué par le fait que ces deux plantes semblent avoir, d'après l'analyse chimique, les mêmes composés majoritaires (α et β pinène, 1.8 cineole, borneol, limonene, 4-terpinol, α -terpinol). Ces composés sont les agents responsables de l'activité antibactérienne de *R. officinalis*, et *S. officinalis* ; le 4-terpinol, l' α -terpinol, le borneol et le linalol sont des alcools terpéniques, ils possèdent une activité antimicrobienne importante après les phénols terpéniques, ils sont connus par leur activité bactéricide plutôt que bactériostatique, car ils agissent comme dénaturants des protéines (Pelczar et al., 1988). Ils sont actifs sur la plupart des bactéries Gram + et Gram - (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Yersinia*

enterocolitica, *Proteus vulgaris*...), le maximum de l'activité de ces alcools est représenté par 4-terpinol et l' α -terpinol. Le borneol est le moins actif. (Dorman H.J.D. et al., 2000).

L' α et β pinène, limonène sont des hydrocarbures aliphatique monoterpènes, qui ont une activité antibactérienne modérée sur la pluparts des bactéries telles que *E.coli* et *S. aureus*, ils ne sont pas actifs sur *P.aeruginosa* et sur *B. subtilis*. (Dorman H.J.D. et al., 2000).

Concernant les huiles essentielles de *L. stoechas*, les boutons floraux de *Lavandula stoechas* ont prouvé leur richesse en huiles essentielles (rendement : 1.3 %) par rapport aux tiges et feuilles (0.885%). Cependant l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites à partir des boutons floraux s'est avérée très faible contre les bactéries testées. Cette activité contre les Gram – (*E. coli*) n'est détectée qu'à partir des disques de charge (15 μ l de l'huile essentielle), par contre les huiles essentielles extraites des tiges et des feuilles ont montré une activité inhibitrice plus importante que celle de *S. officinalis* vis-à-vis des souches testes.

La faible activité antibactérienne des huiles essentielles des boutons floraux peut être expliquée par les faibles pourcentages en composés majoritaires actifs (α pinène, 1.8 cinéole, linalol, borneol) et même l'absence de certains composés (β -pinène).

Une remarque tirée à partir de ces résultats montre que les bactéries à Gram + sont plus sensibles à l'activité des huiles essentielles que les bactéries à Gram négatif. Certains auteurs rapportent que ceci est commun pour les huiles essentielles des plantes de la famille des Lamiacées (PIEROZAN. M. K et al., 2009)

La sensibilité modérée des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des huiles essentielles peut être expliquée en termes de contraintes de diffusion des composés à travers leur membrane externe causée par la présence d'une barrière hydrophile. Bien que cette barrière ne soit pas totalement imperméable, elle entrave le transport des macromolécules et des composants hydrophobes (PIEROZAN. M. K et al., 2009).

La diversité des constituants des huiles essentielles semble un témoin de l'inexistence d'un mécanisme d'action spécifique vis-à-vis des microorganismes. L'activité antimicrobienne de ces composés est fort probablement due à l'existence de plusieurs cibles dans la cellule (Dorman H.J.D. et al 2000).

Les mécanismes probables du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles, principalement chez les bactéries à Gram positif, sont basés sur le contact direct de leurs composés hydrophobes avec la membrane cellulaire, et leur pouvoir de répartir les phospholipides en les rendant plus perméables ce qui pourrait causer des dommages structuraux ou une rupture complète des membranes cellulaires, et des pertes de nutriments.(figure 23) (PIEROZA. K. M et *al.*, 2009). Des recherches sur les effets des terpénoïdes sur la membrane bactérienne isolée suggèrent que cette activité est due à des propriétés lipophiles des terpènes, à la puissance de leurs groupements fonctionnels et à leur solubilité aqueuse (Dorman H.J.D. et *al.*, 2000). Plusieurs processus comprenant l'inhibition de transport des électrons, la translocation des protéines, phosphorylation et d'autres réactions enzymatiques peuvent avoir lieu (Dorman H.J.D. et al 2000).

2- Activité antibactérienne des extraits méthanoliques

Le tableau (18) regroupe les résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des trois plantes.

Le témoin négatif utilisé est le DMSO à 2%, qui a servi pour la mise en solution des extraits méthanoliques, il n'a pas exercé aucune inhibition sur les souches testées (tableau 20, photo 14)

Une résistance des bactéries à gram – (*P. aeruginosa* et *E. coli*) vis-à-vis de tous les extraits testés a été notée où aucune zone d'inhibition n'a été détectée (Photo 9 ; 10). Cependant ces extraits méthanoliques des plantes obtenus par sonication et par macération, ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram + (*B. subtilis* et *S. aureus*).

En ce qui concerne *Lavandula stoechas*, les extraits possèdent une très faible activité antimicrobienne vis-à-vis de deux souches tests (*Bacillus subtilis* IL P1428B et *Staphylococcus aureus* ATCC 25922). Ceci semble avoir une relation avec le test de révélation des flavonoïdes qui a été négatif pour ces extraits, puisqu'il semble que l'activité antimicrobienne des extraits est due principalement aux flavonoïdes (Partie bibliographique)

Les extraits méthanoliques de *R. officinalis* et de *S. officinalis* ont été actifs sur les bactéries à Gram + (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) (Photo 8)

Tableau 18: Diamètres d'inhibition (mm) illustrant l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques

Plante	Témoin Négatif	<i>Rosmarinus officinalis</i>			<i>Salvia officinalis</i>			<i>Lavandula stoechas</i>		
Produit	DMSO (B)	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM6	PM7	PM8	PM9
Technique d'extraction		Son 35 KHz	Son 130 KHz	Mac	Son 35 KHz	Son 130 KHz	Mac	Son 35 KHz	Son 130 KHz	Mac
<i>E. coli</i> HB 101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 0128B12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> CIP 5412	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> AL52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> DH5a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> IL B142B	-	12	12	10	11	10	8	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> IL P1428B	-	12	14	11	15	16	12	7	8	7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	-	13	13	11	13	12	10	10	10	6
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 543154	-	13	12	11	15	15	12	-	-	-

- : Absence d'inhibition, Son : sonication, Mac : macération, DMSO : le diméthylsulfoxyde



Photo 8: Activité antibactérienne de PM1 et PM2 vis-à-vis de *Bacillus subtilis* IL P1428B (B : témoin négatif)

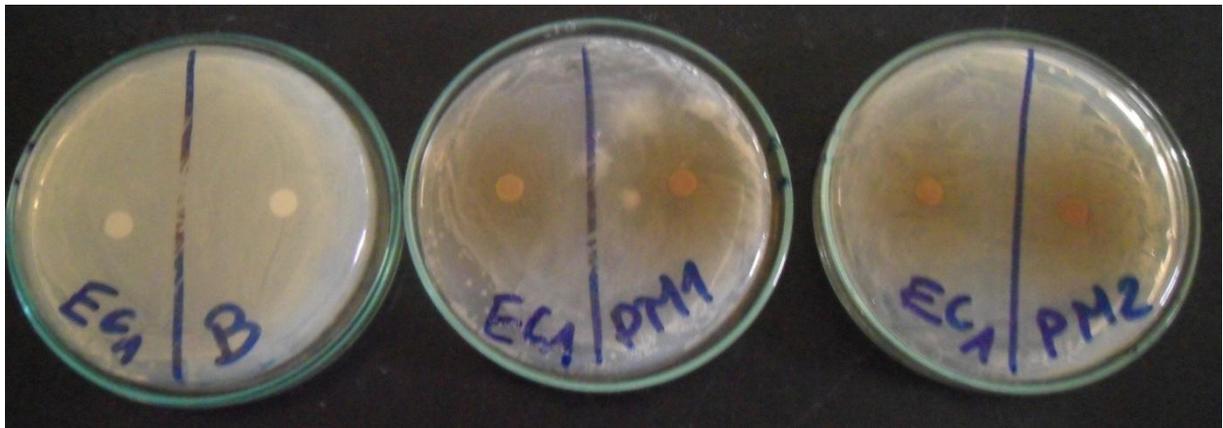


Photo 9: Absence d'inhibition de PM1 et PM2 vis-à-vis d'*E.coli* 0128B12 (B : témoin négatif)



Photo 10: Absence d'inhibition de PM1 et PM2 vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* A22 (B : témoin négatif)

Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude du pouvoir antimicrobien des extraits méthanoliques et éthanoliques de *R. officinalis* (Abdel-Massih. R et *al.*, 2010) (Celiktas. Y. O et *al.*, 2007) qui affirment que l'activité antimicrobienne des extraits méthanoliques est faible par rapport à celle des huiles essentielles.

Pour les deux plantes (*R. officinalis* et de *S. officinalis*) on constate que les extraits obtenus par la technique de sonication (avec 35 KHz et 130 KHz) possèdent un pouvoir antimicrobien relativement supérieur à celui des extraits obtenus par macération, donc il est fort probable qu'il y a une relation entre le pouvoir antibactérien et la teneur en polyphénols, puisque le dosage des polyphénols totaux des deux extraits (*R. officinalis* PM1 et *S. officinalis* PM4) obtenus par sonication a donné des résultats relativement supérieurs à ceux obtenus par macération (PM3 et PM6) (tableau 13).

L'influence de la fréquence utilisée pour l'extraction par les ultrasons sur le pouvoir antimicrobien n'est pas évidente. Car on ne constate pas une différence significative entre les résultats de l'activité antibactérienne des extraits obtenus avec une fréquence de 35 KHz et 130 KHz.

✓ Mode d'action des substances naturelles sur les microorganismes :

Les mécanismes d'action des composés naturels sont liés à la désintégration de la membrane cytoplasmique, la déstabilisation de la force motrice des protons, le flux d'électrons, le transport actif et la coagulation du contenu des cellules (Figure 23).

Les polyphénols agissent par privation de substrat, rupture de la membrane et complexe la paroi cellulaire (Silva NCC et *al.*, 2010). Les flavones tel que l'abyssinone inhibe la réverse transcriptase de VIH (Silva NCC et *al.*, 2010).

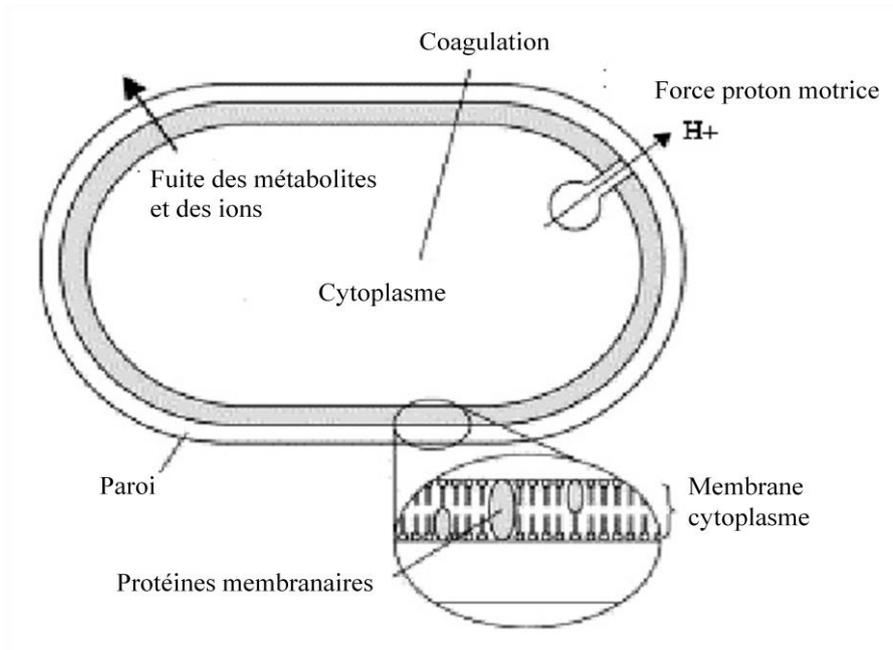


Figure 23 : Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérés comme sites d'action pour les composés naturels (Silva NCC et al., 2010).

Conclusion et perspectives

Le présent travail est consacré à l'étude de l'activité antibactérienne, le rendement et la composition chimique des huiles essentielles extraites de trois plantes médicinales et aromatiques de la région de Taounate (Maroc).

Les résultats ont montré une activité antibactérienne efficace contre les bactéries testées, notamment les huiles essentielles du romarin et de la sauge officinale qui ont été obtenues avec des rendements élevés et qui peuvent être rentables à l'échelle industrielle. La bactérie Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*, s'est avérée la plus résistante, ce qui est confirmé par de nombreuses études de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. A partir de *Lavandula stoechas* on a extrait deux huiles essentielles, la première avec un rendement élevé et une activité inhibitrice modérée c'est celle obtenue à partir des boutons floraux et la deuxième est extraite à partir des tiges et des feuilles avec un rendement relativement faible, mais qui possède une activité inhibitrice importante.

Le deuxième aspect de notre étude consiste à comparer deux méthodes d'extraction des composés phénoliques, la macération a donné des rendements supérieurs à la sonication, mais des études ont montré que la sonication peut être plus reproductible et plus économique, ce qui ouvre la perspective de l'optimisation des conditions d'extraction par sonication. L'évaluation des activités antibactériennes des extraits obtenus par sonication a donné des résultats importants pour les extraits de *Rosmarinus officinalis* et de *Salvia officinalis*.

Les performances antibactériennes mises en évidence méritent d'être étudiées avec plus de détails ; en déterminant les CMI et les CMB, en étudiant l'activité antifongique et l'activité antibiofilms de ces extraits. Afin d'envisager des perspectives d'application de ces huiles et ces extraits dans les domaines, pharmaceutiques, cosmétique et comme conservateur dans le domaine agroalimentaire.

Références bibliographiques

- A A. Craveiro, F.J.A. Matos, J.W. Alencar, M.M. Plumel, Microwave oven extraction of an essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 4, 43-44, 1989
- A Singh, Singh, R.K.K. Bhunia, N. Singh . Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 36 (2003) 787–794
- Abdel-Massih. R et al :Antibacterial Activity of the Extracts Obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*,and *Trigonella foenum-graecum* on Highly Drug-Resistant Gram Negative Bacilli; *Journal of Botany* Volume 2010, Article ID 464087, 8 pages, doi:10.1155/2010/464087
- Abdoulhousen. N, Romarin officinal. Thèse de Docteur, 1990
- AFNOR (norme NF T 75-006) (Association Française de Normalisation, Huiles essentielles, Tome 2, Monographies relatives aux huiles essentielles. 6ième édition. AFNOR, Paris, 2000.)
- Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A. et Witier, P (1995) "Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse." Ed. Masson, Paris
- Back, P (1987). *The Illustrated Herbal*. Hamlyn Publishers through Octopus Books printed in Hong Kong by Mandarin. ISBN No.0 600 553 361
- Bajpai, V.K., Baek, K.-H. & Kang, S.C., Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review, *Food Research International* (2011), doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.052
- Bakkali. F et al ; Biological effects of essential oils – A review; *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 446–475
- Bedrossian. C, Le romarin : analyse chromatographique de l'huile essentielle. Thèse de doctorat, 1999
- BELLAKHDAR - Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes - contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine - Editions Techniques Nord-Africaines, Rabat, 1978, 358 pages
- Bennani. H, Jean Fiet, Ahmed Adloun ; Impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate : étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols; *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - NOVEMBRE 2009 - SUPPLÉMENT AU N°416*
- BESOMBES. C . Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat, 2008
- Bettaieb I. et al ; Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oils composition; *Scientia Horticulturae* 120 (2009) 271–27

- Beylier-Maurel M.F; -Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. Rivista Italiana. E.P.P.O.S., 1976, 58: 283-286
- Bouaziz. M et al : Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia; Food and Chemical Toxicology 47 (2009) 2755–2760
- Bousbia. N et al Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity; Food Chemistry 114 (2009) 355–362
- Brown. P, O (1993): (A reprint of the long-lost classic)The Complete Herbalist. Newcastle Publishing (Van Nuys, California). Originally published 1875. ISBN No.0-87877-184-0
- Bruneton, J. 1999. Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales. 2eme édition. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 915 p.
- Burt. S; Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review International Journal of Food Microbiology 94 (2004) 223– 253
- Carette A-S, épouse Delacour, La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat, 2000
- Celiktas. Y. O ; Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations; Food Chemistry 100 (2007) 553–559
- Celiktas. Y. O et al ; Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli; Journal of Plant Physiology 164 (2007) 1536—1542
- Chemat. F, M. Vian, F. Visioni, Microwave hydrodiffusion for isolation of natural products. Brevet Européen, EP 1 955 749 A1. 2008.
- Chemat. F, Zill-e-Huma, Muhammed Kamran Khan; Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction; Ultrasonics Sonochemistry 18 (2011) 813–835
- Chemonics International, Inc . FILIERE DES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES. Contract No. 608-M-00-05-00043-01, Submitted to: USAID/Morocco Mission U.S. Agency for International Development ; SEPTEMBRE 2005
- Decoussera JW, Lamyb B, Pinac P, Allouchd PY, the Collège de bactériologie virologie hygiène study Group (ColBVH). Trends in antibiotic susceptibility of blood stream pathogens in hospitalized patients in France, 1996 to 2007. Diag Microbiol Infect Dis 2010;66:292–300
- Derwich et al ; Aromatic Plants of Morocco: GC/MS Analysis of the Essential Oils of Leaves of *Mentha piperita*. Advances in Environmental Biology, 4(1): 80-85, 2010
- Djeddi. S, Bouchenah. N, Settar. I, and Helen D. Skaltsa; COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Rosmarinus officinalis* FROM ALGERIA; Chemistry of Natural Compounds, Vol. 43, No. 4, 2007
- Dorman H.J. Det al: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils; Journal of Applied Microbiology 2000, 88, 308–316

- E. Derwich et al; Comparative Essential oil Composition of Leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a Traditional Herbal Medicine in Morocco. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 4(1): 47-54, 2010
- Edris, A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res.* 21, 308-323
- Edris, A.E.; Shalaby, A.; Fadel, H. 2003. Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L) growing in Siwa Oasis, Egypt. *Eur. Food Technol.* 218, 74-78
- El Ajjouri. M , Satrani. B, Ghanmi. M , Aafi. A, Farah. A, Rahouti. M, Amarti. F, Aberchane.M ; Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre ; *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2008 12(4), 345-351
- El Amrani. F , A. Rhallab, T. Alaoui, K. El Badaoui, S. Chakir ; Étude ethnopharmacologique de quelques plantes utilisées dans le traitement du diabète dans la région de Meknès-Tafilalet (Maroc) ; *Phytothérapie* (2010) 8: 161–5
- El Hajaji. H et al . Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry* (2011) 4, 321–324
- EL KALAMOUNI. C . Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, 2010
- El-Hilaly. J, Hmammouchi. M, Lyoussi. B; Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco); *Journal of Ethnopharmacology* 86 (2003) 149–158
- Evans, W.C (1989). *Trease and Evans, Pharmacognosy*. 13th edition. Balliere Tindall ISBN 0-7020-1357-9
- Fantino. S. N, Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.)- Détermination de critères précoces de sélection. Thèse de doctorat, Octobre 1990
- FARHAT. A ; Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application .2010
- FELLAH. S et al : EXTRACTION ET ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES DE LA *SALVIA OFFICINALIS*.L CUEILLIE DANS DEUX REGIONS DIFFERENTES DE LA TUNISIE ; *J.Soc.Alger.Chim.*, 2006, 16(2), 193-202
- Fengel, D., Wegener, G. 1984 *Wood chemistry ultrastructure reactions*. Walter de Gruyter. Berlin. New York. pi 85
- FERNANDEZ. X et Daniel CABROL-BASS ; Analyse des arômes ; techniques d'ingénieur
- Fluck, Hans (1988). *Medicinal Plants*. W.Foulsham & Co. Ltd. ISBN 0-572-00996-8
- GARNERO.J ; Huiles essentielles, techniques d'ingénieur

- Grayer R.J., and Harborne J.B. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. *Phytochemistry*, 37, 19-42
- Guenther E, 1972; Robert E. The essentials oils, Krieger publishing co, In, New York,
- Hala G.M., Christ H. & Carla K.- Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 71(3): 513-520
- Harborne J.B. 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27, 335-368
- Harborne J.B., and Williams C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504
- Harikrishna D., Appa Rao A V N et Prabhakar M. C (2004) Pharmacological investigation of prunin-6-O-p-coumarate : A flavonoid glycoside. *Indian J Pharmacol.*36 (4), 244-250
- Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., & Hamdi, M., (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125,242-251.
- Hossain. M.B et al ; Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology; *Food Chemistry* 126 (2011) 339–346
- Hussain.I. A, Farooq Anwar, Poonam S. Nigam, Satyajit D. Sarker, John E. Moore, Juluri R. Rao, Anisha Mazumdar ; Antibacterial activity of some *Lamiaceae* essential oils using resazurin as an indicator of cell growth; *LWT - Food Science and Technology* 44 (2011) 1199e1206
- Iserin. P ; Encyclopedie des plantes médicinales, identification, préparations, soins ; (2nd Edition) ; Copyright © 1996, 2001 Dorling Kindersley Limited, Londres ; Text copyright © 1996, 2001 Andrew Chevallier ; ISBN: 2-03-560252-1)
- Jiang. Y, Nan Wu, Yu-Jie Fu, Wei Wang, Meng Luo, Chun-Jian Zhao, Yuan-Gang Zu, Xiao-Lei Liu; Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary; *Environ. Toxicol. Pharmacol* (2011), doi:10.1016/j.etap.2011.03.011
- Karumi Y., Onyeyili P.A et Ogugbuaja V.O (2004) Identification of active principales of *M. balsamia* (Balsam Apple) Leaf Extract. *J. Med. Sci* 4 (3), 179-182.
- Kato T., Lijima H., Ishihara K., Kanek T., Hirai K., Naito Y & Okuda K. - Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 1990. 31(4) : 301-307
- Kempf. M, M. Eveillard, F. Kowalczyk, E. Rossines, G. Panhelleux, M.-L. Joly-Guillou ; Antibacterial activity against 224 clinical bacterial strains of JCA 250 and JCA 251 compounds containing essential oils provided from Aroma Technologies research; *Pathologie Biologie* 59 (2011) 39–43

Kováts E., Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in *Advances in Chromatography*, Chap. 7, 1965, 229-247

Kurkin, V.A. 2003. Phenylpropanoids from medicinal plants. Distribution, classification, structural analysis and biological activity. *Chem. Nat. Compd.* 39,123-153.

LAGNIKA. L : ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DE SUBSTANCES NATURELLES ISOLEES DE PLANTES BENINOISES , 2005

LAGUNEZ. R. L; ETUDE DE L'EXTRACTION DE METABOLITES SECONDAIRES DE DIFFERENTES MATIERES VEGETALES EN REACTEUR CHAUFFE PAR INDUCTION THERMOMAGNETIQUE DIRECTE ; thèse doctorat 2006

Lehotay, S.J. et Hajslova, J (2002) "Application of gas chromatography in food analysis." *Trends in Analytical Chemistry*, 21: 686-697

Leonard. C. M, S. Virijevic, T. Regnier, S. Combrinck ; Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms; *South African Journal of Botany* 76 (2010) 676–680

Lima. C. F et al ; Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage; *Chemico-Biological Interactions* 167 (2007) 107–115

Longaray D. A. P , Ivete T. Moschen-Pistorello, Liane Artico, Luciana Atti-Serafini, Sergio Echeverrigaray . Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* 100 (2007) 603–608

LUCCHESI. M. E (2005) ; Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes ; Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles ; thèse de doctorat 2005

LUCCHESI. M.E, F. Chemat, J. Smadja, Solvent-free microwaves extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043, 323-327, 2004.

Martin. S et al: Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium; *Annales de cardiologie et d'angéiologie* 51 (2002) 304–315

Mockute, D.; Bernotiene, G.; Judzentiene, A. 2001. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp.vulgare growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry* 57, 65-69

Modzelewska, A.; Sur, S.; Kumar, K.S.; Khan, S.R. 2005. Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Curr. Med.Chem.- Anti-cancer Agents* 5,477-499

Okoh. O.O, A.P. Sadimenko, A.J. Afolayan ; Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods , *Food Chemistry* 120 (2010) 308–312

Ouraini, D, A.Agoumi, M. Ismaïli-Alaoui, K. Alaoui, Y. Cherrah, M. Amrani, M.-A. Belabbas; Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes ; *Phytothérapie* (2005) Numéro 4: 147-157

Paniwnyk .L et al ; The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from *Rosmarinus officinalis* using ultrasound; *Ultrasonics Sonochemistry* 16 (2009) 287–292

PAOLINI. J; Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone 13 de *Citrus albidus* et de deux *Asteracea* endémiques de Corse : *Eupatorium* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*. thèse doctorat 2005

Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R (1988) Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. In *Microbiology* pp. 469–509. New York: McGraw-Hill International

Peng, Y et al ; Détermination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 431–437

PEREZ M .E.G ; CARACTÉRISATION DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES EXTRAITS DE RAMILLES DU BOULEAU JAUNE : ÉTUDE DE LEUR CAPACITÉ ANTIOXYDANTE ; Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences du bois pour l'obtention du grade de maîtres sciences (M.Se.), 2008

PIEROZA. K. M et al ; Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(4): 764-770, out.-dez. 2009

Pincemail. J et al Effect of a diet rich in fruits and vegetables on the plasmatic antioxidant rates and of the markers of the oxidative damage; *Nutrition clinique et métabolisme* 21 (2007) 66–75

PIOCHON. M ; ÉTUDE DES HUILES ESSENTIELLES D'ESPÈCES VÉGÉTALES DE LA FLORE LAURENTIENNE : COMPOSITION CHIMIQUE, ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES ET HÉMI-SYNTÈSE ; Août 2008

Radulescu. V et al ; Capillary gas chromatography–mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*; *Journal of Chromatography A*, 1027 (2004) 121–126

Rasooli. I et al : Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils; *International Journal of Food Microbiology* 122 (2008) 135–139

Rentsenkhand T, Miklós Takó, László Galgóczy, Tamás Papp, Miklós Pesti, Csaba Vágvolgyi, Katalin Almássy, Judit Krisch ; Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk ; *International Journal of Food Microbiology* 144 (2011) 480–486

Rhayour. K ; Étude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, 2002

- Romanik. G, E. Gilgenast, A. Przyjazny, M. Kamiński; Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis; J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 253–261
- Romeilah. R, Sayed A. Fayed and Ghada I. Mahmoud ; Chemical Compositions, Antiviral and Antioxidant Activities of Seven Essential Oils Journal of Applied Sciences Research, 6(1): 50-62, 2010
- Rosangela A. J et al ; The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration; Ultrasonics Sonochemistry 14 (2007) 6–12
- Sati S.C et Joshi S .2011. Aspects of antifungal Potentiel of Ethnobotanically Known Medicinal Plants. Research Journal of Medicinal Plant 5 (4): 377-391, 2011
- Sato Y, et al (2007) Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of glycyrrhiza ularensis roots, acts in the lower part of intestine. Biol Pharm Bull 30(1): 145-9
- Silva NCC, Fernandes Júnior A: Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases ISSN 1678-9199 | 2010 | volume 16 | issue 3 | pages 402-413
- SKOULA. M et al ; Essential Oil Variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Growing Wild in Crete (Greece); Biochemical Systematics and Ecology, Vol. 24, No. 3, pp. 255-260,1996
- Spiridon E.K ; SAGE, The Genus *Salvia*, Department of Plant Physiology ,Faculty of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Greece , copyright 2000
- Stashenko. E. E, B.E. Jaramillo, J.R. Martinez, Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. Journal of Chromatography A, 1025, 105-113, 2004.
- Stevanovic T. Automne 2005. Chimie du bois. CHM-22170. Université Laval. Québec. Canada, p 6.6-6.20
- Stuart, M (1986). The Encyclopaedia of Herbs and Herbalism. Orbis ISBN 0-85613-700-6
- Szumny. A, Figiel. A, Gutiérrez-Ortíz. A, Ángel A. Carbonell-Barrachina; Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method Journal of Food Engineering 97 (2010) 253–260
- TAWEECHASUPAPONG. S, SUPAPORN SINGHARA, PILANTHANA ; LERTSATITTHANAKORN AND WATCHAREE KHUNKITTI; ANTIMICROBIAL EFFECTS OF *BOESENBERGIA PANDURATA* AND *PIPER SARMENTOSUM* LEAF EXTRACTS ON PLANKTONIC CELLS AND BIOFILM OF ORAL PATHOGENS; Pak. J. Pharm. Sci., Vol.23, No.2, April 2010, pp.224-231
- Thompson HJ et al (2006) Review: ginger prevents 24 hour postoperative nausea and vomiting. Evid Based Nurs 9(3): 80

Turgeon. M, PROFIL DES PRODUITS FORESTIERS ; PREMIÈRE TRANSFORMATION, HUILES ESSENTIELLES ; Ministère des Ressources naturelles, Secteur des forêts, Direction du développement de l'industrie des produits forestiers. Décembre 2001

Valnet, J (1986). The Practice of Aromatherapy. C.W.Daniel Co. Ltd. ISBN 0-85207-143-4

Valverde, M. T., Iniesta, F. M., Garrido, L. C., Rodríguez, A. T., García-García, I., Macanas, H., & Roda, R. C., et al (2010). Inactivation of Salmonella spp in refrigerated liquid egg products using essential oils and their active compounds. Proceedings in International Conference on Food Innovation "Food Innova", Universidad Politecnica De Valencia.

Van Den Dool H., Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, J. Chromatogr., 1963, 11, 463-471

Veillet S., Tomao V. & Chemat F (2009c) Ultrasound Assisted Extraction of aromas and antioxidants. Dans F. Chemat (Ed) Essential oil and aromas green extractions and applications, HKB, New Delhi, Inde

Veillet. S : Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation ; 2010

Vukovic-Gacic et al; Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*; Food and Chemical Toxicology 44 (2006) 1730–1738

Waggas. M.A and E. Balawi. A. Neurophysiological Study on Possible Protective Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Leaves Extract in Male Albino Rats Treated with Acrylamide; American-Eurasian Journal of Scientific Research 3 (2): 163-171, 2008

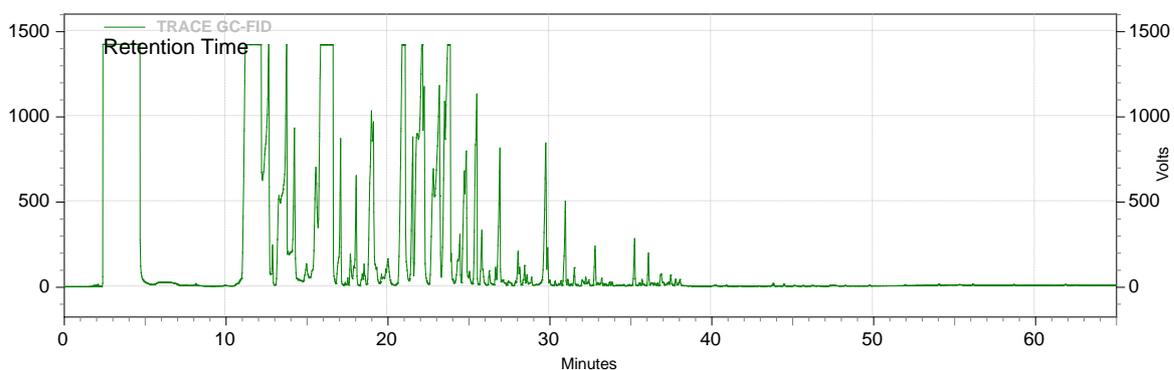
Zaouali. Y et al ; Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities, Food and Chemical Toxicology 48 (2010) 3144–3152

ANNEXE

Les chromatogrammes

Area % Report

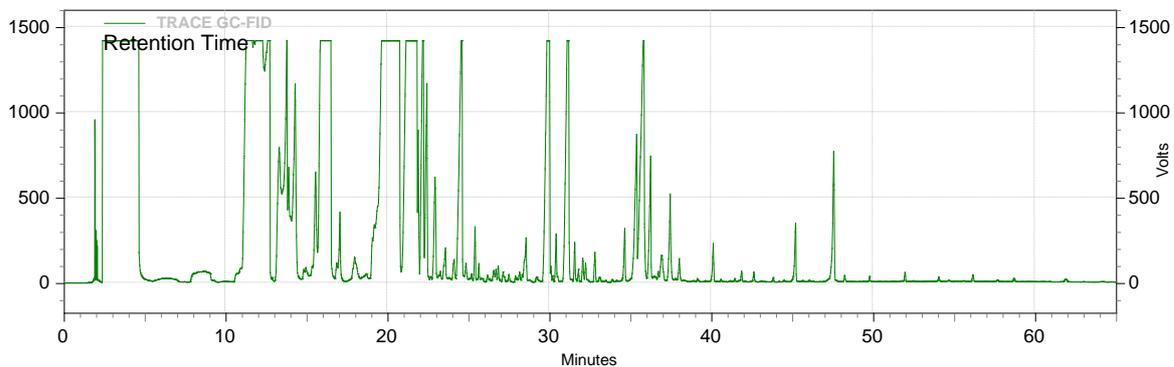
Data File: C:\ChromQuest\Data\PH01.dat
Method: C:\ChromQuest\Methods\methodeFARAR1.met
Acquired: 18/05/2011 14:17:20
Printed: 22/05/2011 09:08:11



Annexe 1 : chromatogramme de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

Area % Report

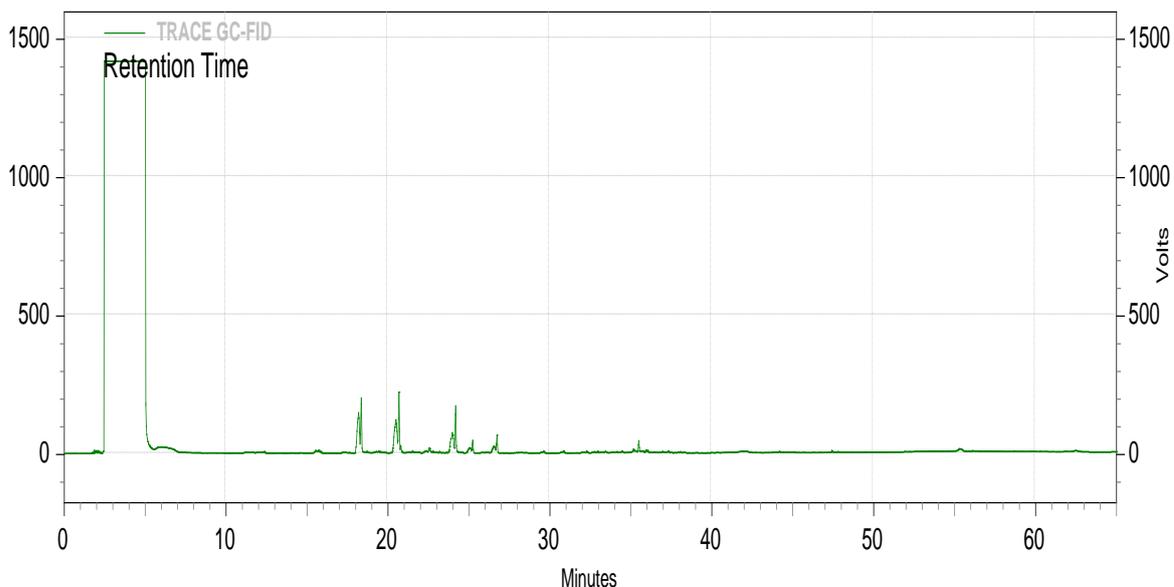
Data File: C:\ChromQuest\Data\PHO2.dat
Method: C:\ChromQuest\Methods\methodeFARAR1.met
Acquired: 17/05/2011 10:40:07
Printed: 22/05/2011 09:09:48



Annexe 2 : chromatogramme de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*

Area % Report

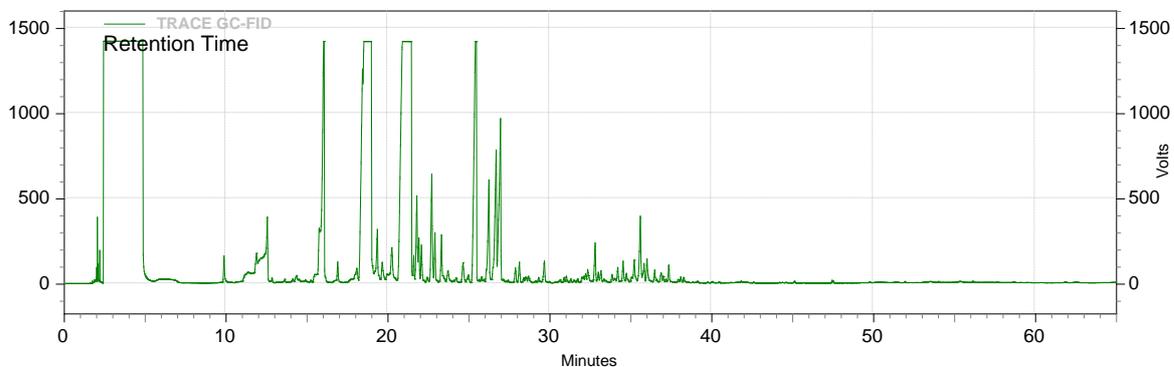
Data File: C:\ChromQuest\Data\PH03.dat
 Method: C:\ChromQuest\Methods\methodeFARAR1.met
 Acquired: 18/05/2011 16:40:58
 Printed: 22/05/2011 09:10:51



Annexe 3 : chromatogramme de l'huile essentielle des boutons floraux de *Lavandula stoechas*

Area % Report

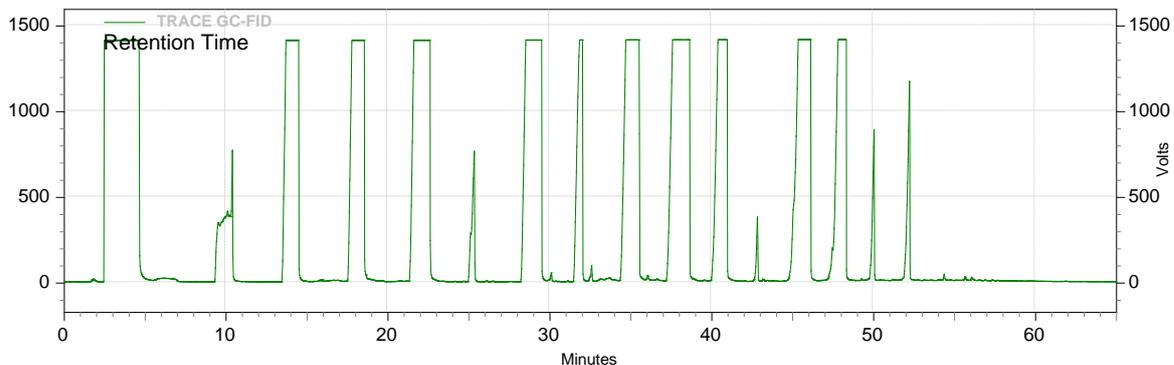
Data File: C:\ChromQuest\Data\PH04.dat
 Method: C:\ChromQuest\Methods\methodeFARAR1.met
 Acquired: 17/05/2011 14:20:41
 Printed: 22/05/2011 09:11:45



Annexe 4 : chromatogramme de l'huile essentielle des tiges et des feuilles de *Lavandula stoechas*

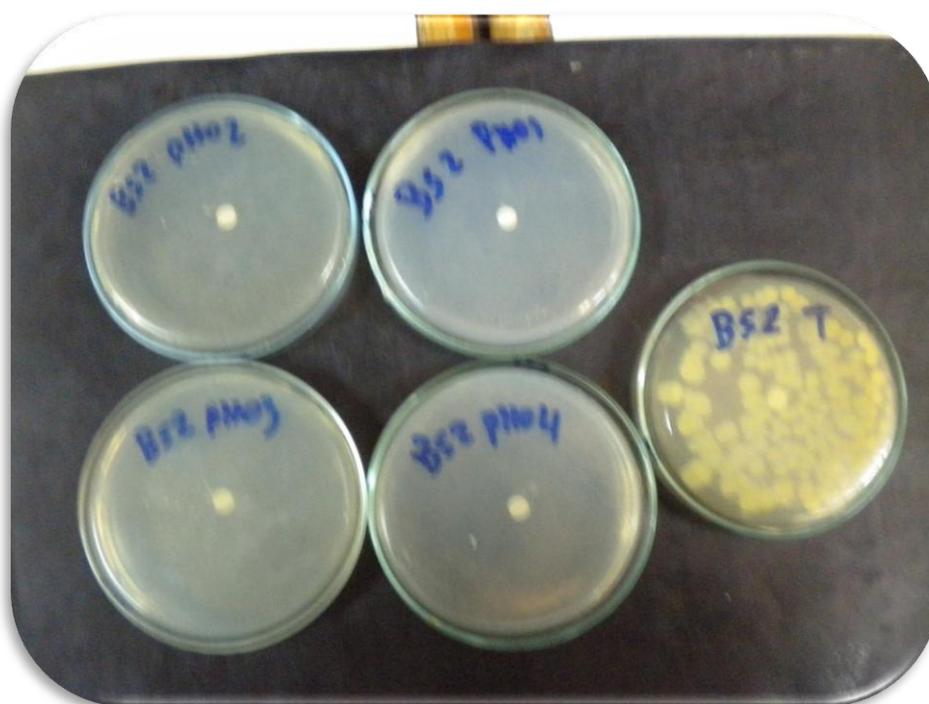
Area % Report

Data File: C:\ChromQuest\Data\ALCANES-C9-C23.dat
 Method: C:\ChromQuest\Methods\methodeFARAR1.met
 Acquired: 17/05/2011 09:28:52
 Printed: 22/05/2011 09:30:49



Annexe 5 : chromatogramme des alcanes linéaires (C9-C23)

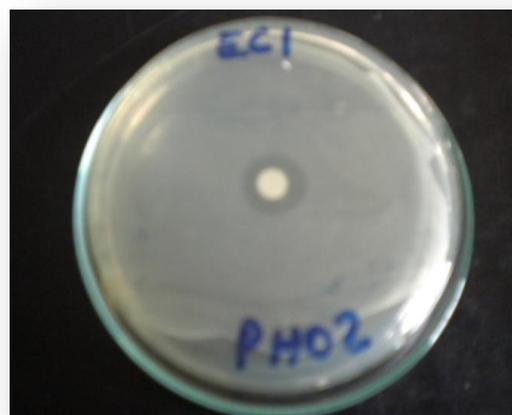
Photos :



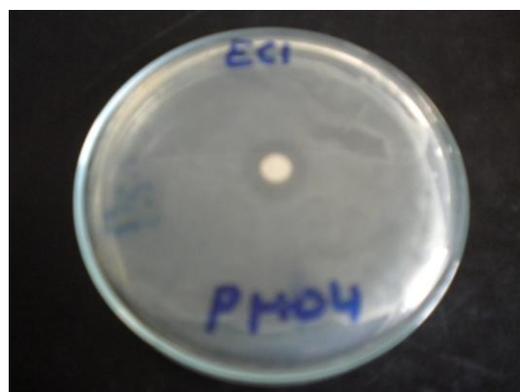
Annexe 6 : Photo 11 : Inhibition totale de la souche *Bacillus subtilis* IL P1428B par les 4 huiles essentielles étudiées (T : témoin) (disque de 10 µl de charge)



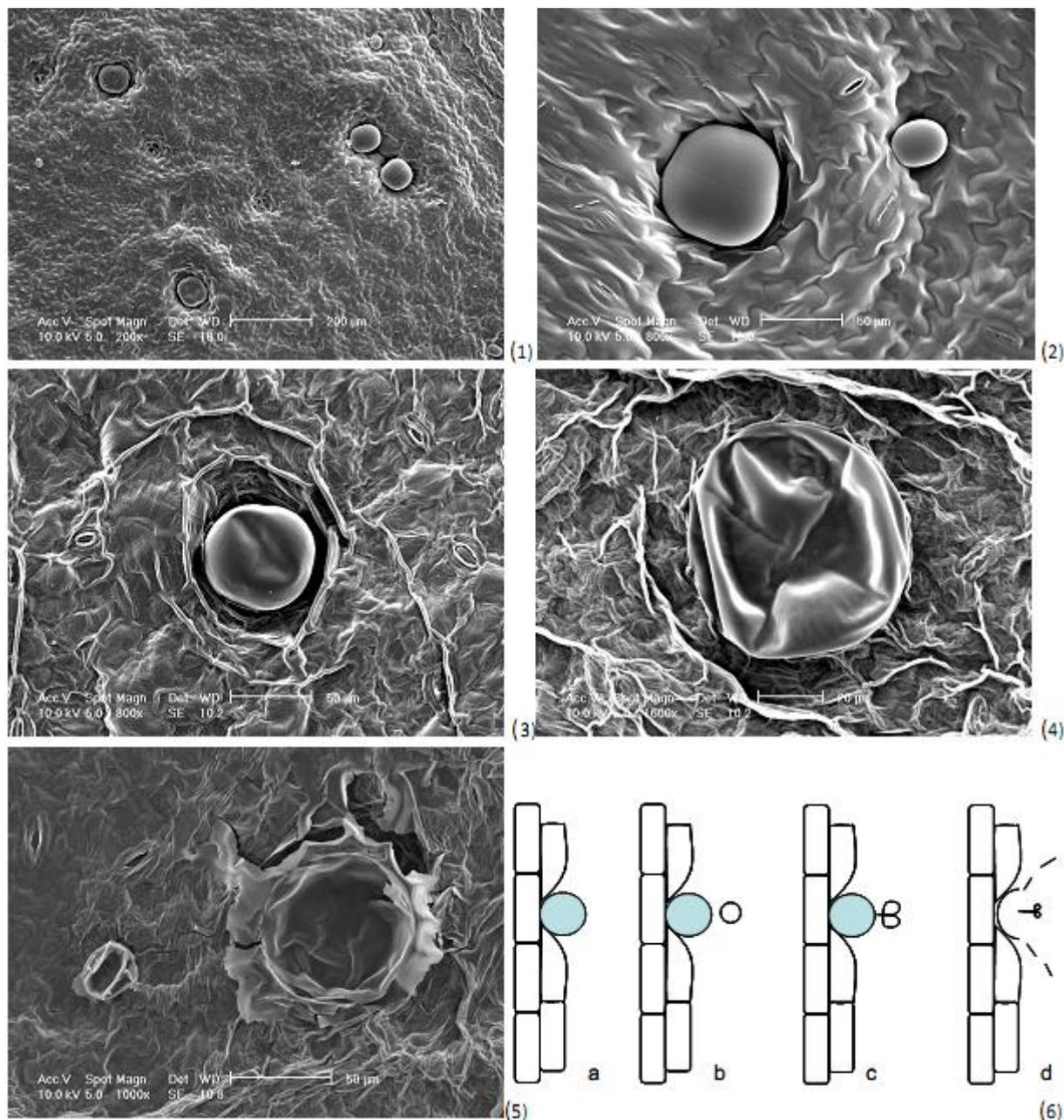
Annexe 7 : Zone d'inhibition illustrant l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de romarin vis-à-vis d'*E.coli*



Annexe 8 : Zone d'inhibition illustrant l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la sauge officinale vis-à-vis d'*E.coli*



Annexe 9: Zone d'inhibition illustrant l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des tiges et des feuilles de *Lavandula stoechas* vis-à-vis d'*E.coli*



ANNEXE 10 : Figure 18: Photographies de microscopie électronique à balayage de feuilles de basilic : (1-2) feuilles fraîches de basilic, rapport optique (x 200 et x 800), (3) feuilles de basilic, macération de 6h (rapport optique X 800), (4) feuilles de basilic : macération de 12h (rapport optique X 1600), (5) feuilles de basilic macération sous ultrasons de 15 min (rapport optique X 1000), (6) Représentation d'une bulle de cavitation implosant à la surface d'une poche d'huile essentielle, a) schéma en coupe de profil de la surface d'une feuille avec une glande d'huile essentielle, b) création d'une bulle de cavitation, c) implosion de la bulle de cavitation générant un micro jet orienté vers la poche à essence, d) destruction de la glande et diffusion de l'huile essentielle dans le milieu

Milieu de culture

- Milieu Luria-Bertani gélosé

Peptone : 10 g/l

Extrait de levure : 5 g/l

NaCl : 10 g/l

Agar : 15 g/l

