



Année Universitaire : 2012-2013

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Composition chimique et effet antimicrobien de
l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*
(Géranium rosat)**

Présenté par:

Ouissam NABHI

Encadré par:

- Mr. Abdelfatah ABDELLAOUI
- Mr. Fouad KHALIL

Soutenu Le 20 Juin 2014 devant le jury composé de:

- Mr. F. KHALIL
- Mr. J.E. HAZM
- Mr. Med. Kh. SKALLI
- Mr. A. ABDELLAOUI

**Stage effectué à : Laboratoire « Physiologie Végétale » de la Faculté des
Sciences Dhar El Mehraz, Fès, Maroc.**

Résumé

À partir des plantes *Pelargonium graveolens* (Géranium rosat), cultivées dans la région de Fès, nous avons extrait l'huile essentielle des feuilles de cette plante par hydrodistillation. Le taux d'humidité de ces feuilles, ainsi que le rendement d'extraction sont calculés. Ensuite, par la méthode des disques, nous avons étudié l'effet de cette huile essentielle sur la croissance de cinq souches microbiennes (*Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*), isolées du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Hassan II, de Fès, représentants des risques sanitaires graves. La sensibilité de chaque une de ces souches, envers quatre antibiotiques différents est étudiée par des antibiogrammes.

Nos résultats montrent que l'effet inhibiteur de cette huile essentielle est variable selon les germes. Où certaines souches sont sensibles, alors que d'autres sont extrêmement sensibles. Pour la majorité des germes étudiés, cette inhibition est plus importante que celle de plusieurs antibiotiques. A titre d'exemple, pour *Acinetobacter baumannii*, qu'est un germe très pathogène, l'effet de cette huile essentielle dépasse largement celui des antibiotiques imipénème, kanamycine, oxacilline et sulpha.

Cette huile essentielle a été analysée par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse (CG-SM) afin d'en déterminer la composition chimique. Ce qui nous a permis de déterminer les 48 constituants, dont 10 sont majoritaires. Et d'en déduire sa spécificité par rapport à l'huile essentielle de la même espèce, étudiée dans d'autres régions du monde. Ainsi que les composants qui pourraient être responsables de son effet antimicrobien.

Mots clés : *Pelargonium graveolens* ; huile essentielle ; composition chimique ; effet antimicrobien ; microbes nosocomiaux.

Abstract

From plants *Pelargonium graveolens* (rose-geranium), grown in the region of Fez, we extract the essential oil from the leaves of this plant by steam distillation. The rate of humidity of the leaves and the extraction efficiency are calculated. Then, by the disc method, we studied the effect of the essential oil on the growth of five bacterial strains (*Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*), isolated from the Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Hassan II, Fez, representatives of serious health risks. The sensitivity of each of these strains to four different antibiotics is studied.

Our results show that the inhibitory effect of this essential oil varies from germs. Some strains are sensitive, others are extremely sensitive. For most pathogens studied, this inhibition is greater than that of many antibiotics. For example, for *Acinetobacter baumannii*, what a very pathogen, the effect of this essential oil greatly exceeds the antibiotic imipenem, kanamycin, oxacillin and sulpham.

The essential oil was analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS), to determine the chemical composition. This allows us to determine the 48 components, 10 of them are in the majority. And to deduce its specificity compared to the essential oil of the same species studied in other parts of the world. Also, the components that could be responsible for its antimicrobial effect are deduced.

Keywords: *Pelargonium graveolens* ; essential oil ; chemical composition ; antimicrobial effect ; nosocomial microbes.

Dédicace

Tout d'abord, louange à « Allah » qui m'a guidée sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspirée les bons pas et les justes reflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Je déduis ce travail à ma chère mère et ma grande mère .A mes frères, Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissance de tous les sacrifices consentis partout et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation.et à mes camarades de classe et tous ceux de la faculté de sciences Dhar el Mahraz qui ont contribué en fonction de leurs moyens à mon aide surtout MHARTI F-Zohra

A cœur vaillant rien d'impossible

A conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre

Tout vient à point à qui sait attendre

Quand il y a le souci de réaliser un dessein

Tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent

En dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout

Notre unique et seul atout

Remerciement

Je remercie profondément le professeur A. ABDELLAOUI pour avoir accepté de me donner le laboratoire d'accueil, pour ses remarques constructives, et d'avoir consacré une grande partie de son temps à la direction de ce travail.

Je remercie également Mr EL OUAZZANI, responsable du CMBA : chimie des molécules bioactives. Pour les grands efforts qui il a fournis pour le bon déroulement des études au cours de cette formation.

Egalement, mes sincères remerciements à mes professeurs enseignants –chercheurs qui ont participé au bon déroulement des études, par leurs cours, leurs séminaires enrichissants, leurs précieux conseils et leur disponibilité tout au long de cette formation.

Je remercie Mr KHALIL, pour son aide et sa disponibilité concernant la partie analytique de mon travail.

Un grand merci à tous les membres de jury pour le temps qui ils ont accordé pour l'examen de ce travail et pour leurs remarques constructives.

Je remercie toute ma famille, ma mère, et particulièrement mon frère Dr. Rida, qui a tout fait pour que je réussisse. Tu as toujours été là pour moi durant toutes les étapes du déroulement de ce travail, et ton aide m'a été précieuse, tout comme tes conseils et ton écoute. Je t'aime très fort.

Je remercie Dr. BIDAOUI, qui m'a encouragée de poursuivre mes études. C'est grâce à vous que j'en suis là, même si ça n'a pas toujours été facile !

Je remercie Siham, qui a toujours été là pour me soutenir durant les 2 ans du MASTER, pour toutes les raisons qui font que nous sommes maintenant si proches, je remercie également Btissam, Salma, Fatima-zohra et tout mes amis .

Enfin je remercie tous mes amis pour leur présence à mes côtés.

Liste des abréviations

CEC	: Cefaclor
F	: Nitrofuranoïn
CPG/MS	: couplage chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse
H	: huile essentielle <i>Pélargonium graveolens</i>
HE	: Huile essentielle
IPM	: Imipénème
K	: Kanamycine
OFX	: Ofloxacine
OX	: Oxacilline
P	: Pénicilline
SPSS	: <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SXT	: Sulpha
VA	: Vancomycine
ZOX	: Ceftizoxime
O.M.S	: Organisation mondial de la santé
CPG/IRFT	: Le couplage de la CPG avec un spectromètre infrarouge par transformée de Fourier.
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire.

Liste des photos

Photo 1 : <i>Pelargonium graveolens</i> (géranium rosat).....	18
Photo 2 : Dispositif d'hydrodistillation des huiles essentielles	20
Photo 3 : Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS) (CURI)	24
Photo 4 : Taux d'inhibition <i>Acinetobacter baumannii</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> (H) vis à vis des antibiotiques : Imipenem (IPM) ; Kanamycine (K) ; Oxacillin (OX) ; Sulpha (SXT). ...	26
Photo 5 : Taux d'inhibition <i>Staphylococcus aureus</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> (H) vis à vis des antibiotiques: Imipenem (IPM) ; Oxacillin (OX) ; Ceftizoxime (ZOX) ; Cefaclor (CEC).	28
Photo 6 : Taux d'inhibition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> (H) vis à vis des antibiotiques: Imipenem (IPM) ; Oxacillin (OX) ; Vancomycine (VA) ; Sulpha (SXT).	30
Photo 7 : Taux d'inhibition de <i>Klebsiella pneumonia</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> (H) vis à vis des antibiotiques: Imipenem (IPM) ; Sulpha (SXT) ; Ofloxacin (OFX) ; Penicillin (P).	31
Photo 8 : Taux d'inhibition d' <i>Escherichia coli</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> (H) vis à vis des antibiotiques: Imipenem (IPM) ; Ceftizoxime (ZOX) ; Ofloxacin (OFX) ; Nitrofuranoïn (F).	33

Liste des tableaux

Tableau 1: certaines caractéristiques des souches bactériennes étudiées	22
Tableau 2 : Classification de la sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles selon Moreira <i>et al.</i> , (2005).	35
Tableau 3 : Composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i>	37
Tableau 4 : Comparaison des pourcentages (%) des composants les plus majoritaires de l'huile <i>Pelargonium graveolens</i> de notre étude avec celle d'autres chercheurs.	38

Liste des figures

Figure 1: Montage d'hydrodistillation (Clevenger)	10
Figure 2 : Principe de la méthode de diffusion par disque	23
Figure 3 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition d' <i>Acinetobacter baumannii</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> avec celui des antibiotiques : Imipenème, Kanamycine, Oxacillin et Sulpha.	27
Figure 4 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> avec celui des antibiotiques : Imipenème, Oxacillin, Ceftriaxone, Cefaclor.	29
Figure 5 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> avec celui des antibiotiques: Imipenem, Oxacillin, Vancomycine, Sulpha.	30
Figure 6 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition de <i>Klebsiella pneumonia</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> avec celui des antibiotiques: Imipenème, Sulpha, Ofloxacine, Pénicilline... ..	32
Figure 7 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition d' <i>Escherichia coli</i> par HE de <i>Pelargonium graveolens</i> avec celui des antibiotiques : Imipenème, Ceftriaxone, Ofloxacine, Nitrofurantoin.	33
Figure 8 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition des souches bactériennes étudiées par HE de <i>Pelargonium graveolens</i>	34
Figure 9 : Profile chromatographique de l'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i>	36

Sommaire

Introduction générale	1
Partie I :Synthèse bibliographique	
I. La phytothérapie	3
1. Définition.....	3
2. Aperçu historique	3
II. Huiles essentielles	4
1. Définition.....	4
2. Rôles des huiles essentielles au niveau de la plante	5
3. Structures productrices des huiles essentielles	5
3.1. Trichomes glandulaire	6
3.2. Cavités sécrétrices.....	6
3.3. Cellules sécrétrices.....	6
3.4. Canaux sécréteurs	6
III. Facteurs influençant le rendement et la composition des huiles essentielles	7
1. Facteur physiologiques	7
2. Facteurs environnementaux	7
3. Facteur géographiques	8
4. Conditions d'extraction et de stockage.....	8
IV. Les principales techniques d'extraction des huiles essentielles.....	8
1. Entraînement à la vapeur	8
1.1. L'hydrodiffusion :.....	9
1.2. La distillation à la vapeur sous pression	9
1.3. L'hydrodistillation	9
2. Extraction par des solvants organiques	10
3. Extraction par le dioxyde de carbone supercritique	11
V. Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles	11
1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	11
2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse (CPG/SM)	12
3. Le couplage de la CPG avec IRFT	13
4. La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN- ¹³ C).....	13
VI. Propriétés physicochimiques et biologiques des HE.....	14

1. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles	14
2. Propriétés biologiques des huiles essentielles	15
2.1. Effet antioxydant.....	15
2.2. Effet antimycosique	15
2.3. Effet antibactérien	16

Partie II :Matériel & méthodes

I. Matériel végétal	18
1. Description de la plante	18
2. Récolte de la plante.....	19
3. Conservation des plantes	19
4. Détermination de l'humidité.....	19
II. Extraction des huiles essentielles	20
1. Description du dispositif d'extraction	20
2. Procédé d'extraction des huiles essentielles	20
3. Conservation de l'huile essentielle obtenue	21
4. Détermination du rendement en huile essentielle.....	21
III. Evaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle	22
1. Souches microbiennes étudiées	22
2. Méthode d'analyse.....	22
3. Incubation et lecture des résultats.....	23
IV. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle	23
1. La méthode analytique utilisée	23
2. Caractéristiques de l'appareil de CG/SM utilisé	24

Partie III :Résultats & discussion

I. Rendement en huiles essentielles	25
1. Taux d'humidité	25
2. Rendement	25
II. Effet antimicrobien de l'huile essentielle de <i>Pelargonium graveolens</i>	26
1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	26
2. <i>Staphylococcus aureus</i>	27

3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
4. <i>Klebsiella pneumonia</i>	31
5. <i>Escherichia coli</i>	32
6. Comparaison de la sensibilité des souches étudiées	34
III. Composition chimique des huiles essentielles	36
1. Résultats d'analyse chimique	36
2. Comparaison des résultats	38
Conclusion & Perspectives	40
Références bibliographiques	42

Introduction générale

Les plantes aromatiques traditionnellement utilisées par nos ancêtres pour l'aromatisation des aliments, les arts culinaires et les vertus médicinales. Elles sont prometteuses et constituent une grande source de molécules bioactives et d'antimicrobiens naturels pour l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique. Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont principalement dues aux huiles essentielles qui sont des substances odorantes contenues dans les plantes.

Plusieurs techniques sont utilisées pour extraire ces huiles essentielles du matériel végétal. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums.

Les microorganismes sont impliqués dans un grand nombre de maladies et sont responsables de la détérioration d'une vaste variété de produits. Malgré les grands progrès dans la compréhension de la pathogénèse microbienne, les maladies infectieuses continuent à poser de sérieux problèmes de santé publique surtout dans les pays en voie de développement. En effet, l'apparition de la résistance aux antibiotiques constitue un problème mondial de santé publique. L'usage extensif des antibiotiques chez l'Homme est la cause majeure de l'apparition des résistances. Cette dernière est accentuée par le mauvais suivi des traitements. Une meilleure utilisation des antibiotiques ne pourra que ralentir l'extension des résistances et la découverte de nouvelles molécules actives reste une nécessité.

Les huiles essentielles sont toujours révélées efficaces dans le contrôle de la propagation de graves maladies telles que la peste dans l'ancienne Athènes par Hippocrate et plus tard le choléra. En effet, les personnes qui travaillaient en parfumerie à Paris et Londres semblaient résistants à cette maladie. Cette propriété antimicrobienne des huiles essentielles, connue depuis l'antiquité, a fait l'objet d'un bon nombre de publications qui ont confirmé, par des études *in vitro*, leur action inhibitrice contre les bactéries, les champignons, les levures, les virus et les protozoaires.

Les huiles essentielles présentent une très grande richesse de molécules, tant en nombre qu'en variété. Cependant ces mélanges de molécules bioactives ne sont pas valorisés du point de vue de leur potentiel chimique et biologique. Leur criblage permettrait

de découvrir de nouveaux antibactériens, qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

Dans la première phase de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, que nous avons extrait des feuilles de cette plante, sur cinq souches microbiennes. Comme nous avons comparé l'effet de cette huile essentielle avec ceux de plusieurs antibiotiques.

La deuxième phase de ce travail, des analyses chimiques, réalisées, ont été entreprises en vue d'établir la composition de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, afin d'élucider certains facteurs influençant cette composition et pour déterminer les molécules impliquées dans l'activité antibactérienne de cette huile essentielle.

Les travaux menés au cours de ce travail ont comme objectifs :

- L'extraction de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* (géranium rosat) cultivée dans notre région ;
- L'étude de l'effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, contre des germes nosocomiaux. Afin de la valoriser ;
- L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, pour déterminer les composants intervenant dans ces effets biologiques.

Partie I :

Synthèse bibliographique

I. La phytothérapie

1. Définition

Le mot phytothérapie provient de 2 mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ». La phytothérapie désigne la médecine basée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels. Elle est probablement la Médecine la plus ancienne.

On peut la distinguer en trois types de pratiques :

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'étude clinique.
- Une pratique basée sur les avancées et preuves scientifiques qui recherchent des extraits actifs dans les plantes. Les extraits actifs identifiés sont standardisés. Cette pratique débouche suivant les cas sur la fabrication de médicaments pharmaceutiques ou de phytomédicaments.
- Une pratique de prophylaxie déjà utilisée dans l'antiquité.

2. Aperçu historique

L'histoire de la phytothérapie est liée à celle de l'humanité, car dans toutes les cultures on a toujours compté sur les valeurs curatives des plantes pour soigner et guérir les Hommes. Certaines cultures – notamment en Chine et en Inde – perpétuent depuis des siècles une longue tradition d'herboristerie, tandis qu'en Europe et Amérique du Nord, sa popularité fut plus fluctuante face à la médecine conventionnelle (Sebai et Boudali, 2012)

Il est vraisemblable que la première médecine par les plantes, hormis une utilisation presque instinctive des propriétés thérapeutiques des plantes qui existe depuis la nuit des temps et est toujours pratiquée dans certaines tribus, soit née en Inde, il y a plus de 4000 ans. Ce savoir se propagea également vers l'ouest, au Moyen-Orient, et la tradition égyptienne eut une influence significative sur l'herboristerie européenne. Des papyrus datant de 3500 ans indiquent que les Egyptiens employaient plusieurs centaines de plantes tant pour leurs valeurs culinaires que thérapeutiques. Ces deux usages demeurèrent inextricablement liés pendant des siècles, comme l'écrivait un médecin grec: « que votre nourriture soit votre médecine, et votre médecine votre nourriture » (Sebai et Boudali, 2012).

Lorsque les Romains leur succédèrent, leurs médecins militaires propagèrent les plantes et l'herboristerie dans le monde entier. Quantité de plantes méditerranéennes furent ainsi transplantée dans toute l'Europe et en Angleterre. Grâce à l'invention de l'imprimerie, la

diffusion des anciens textes romains et grecs s'élargit à un public plus vaste. Une découverte qui coïncida avec la rapide expansion des villes ; pendant les deux siècles qui suivirent, la connaissance des plantes s'accrut considérablement dans tous les domaines.

Donc, depuis la nuit des temps, les plantes ont toujours été utilisées en médecine traditionnelle pour leurs propriétés biologiques. Ces propriétés leur étant conférées par leurs diverses composantes parmi lesquelles les huiles essentielles (Baba Moussa *et al.*, 1997).

II. Huiles essentielles

1. Définition

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels que l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur ou par pression très élevée à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (AFNOR, 2000).

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

Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante (Anton et Lobstein, 2005). Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante.

Ces huiles se concentrent dans les poches de sécrétion situées dans les **tiges**, les **écorces** (cannelier), les **racines** (vétiver), les **rhizomes** (gingembre), les **fruits** (anis et orange), le **bois** (camphre) et même parfois à partir des **gommes** qui s'écoulent du tronc des arbres (Nguemtchouin Mbouga, 2012). Comme elles peuvent être concentrées soit dans les **fleurs** (ylang-ylang, bergamotier, rosier), soit dans les sommités **fleuries** (tagète, lavande), soit dans les **feuilles** (citronnelle, eucalyptus), ou dans les **racines** (vétiver), ou dans les **fruits** (vanillier), ou dans les **graines** (muscade) ou encore autre part dans la plante (Anton et Lobstein, 2005).

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal en proportion relativement faible (<1%) et peuvent cependant atteindre chez certaines espèces comme *Eugenia caryophyllata* L. (clou de girofle) près de 15% (Bernard *et al.*, 1988).

2. Rôles des huiles essentielles au niveau de la plante

Le rôle exact que jouent les huiles essentielles dans la physiologie de la plante productrice reste encore mal connu. Toutefois, il existe plusieurs spéculations à ce sujet qui définissent les huiles essentielles comme des signaux moléculaires qui réagissent les interactions écologiques entre la plante et son environnement. En effet, la complexité de ces produits leur permet de communiquer une multitude de messages biologique spécifiques. Etant volatiles, les composants des huiles essentielles sont capables d'influencer un organisme qui se trouve à une certaine distance de la plante productrice. Leur nature lipophile leur permet une certaine persistance dans une biosphère largement aqueuse. Ainsi il a été démontré que les huiles essentielles ont un effet attractif envers les animaux qui servent à la pollinisation (Ciccarelli *et al.*, 2008) et à la dispersion des graines. Par contre un effet répulsif a été observé contre les herbivores (Isman, 2000). Les plantes aromatiques utilisent les huiles essentielles également pour inhiber la germination et le développement d'autres espèces végétales dans leur voisinage : effet allélopathique (De Feo *et al.* 2002). C'est le cas par exemple de *Salvia leucophylla* qui libère dans l'atmosphère des substances comme le camphre et le 1,8-cinéole afin d'inhiber la germination et le développement d'autres espèces en concurrence (Nishida *et al.* 2005). De plus, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes, où les plantes productrices résistent à plusieurs pathologies fréquentes chez les autres familles végétales. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées « phytoalexines ». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine (Mann, 1987).

3. Structures productrices des huiles essentielles

Les plantes aromatiques se caractérisent par la présence de structures sécrétrices des huiles essentielles dans presque tous les organes du végétale (fleurs, graine, racines, feuilles, fruits...). La présence de ces structures réduit le risque d'auto toxicité et permet la présence des huiles essentielles à des concentrations élevées à l'emplacement où elles exercent leurs rôles défensifs ou attractifs. Il s'agit de structures histologiques sécrétrices spécialisés qui

différents selon l'organe végétal considéré et qui sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Ces structures, également impliquées dans le stockage des huiles essentielles, peuvent varier selon la famille botanique de l'espèce végétale considérée. Néanmoins chez certaines espèces plusieurs types de structures sécrétrices peuvent coexister au niveau d'une même plante voir même dans un même organe.

3.1. Trichomes glandulaire

Les espèces appartenant à la famille des lamiacées sont caractériser par la presence des trichomes glandulaires qui sont reconnus comme étant le site de biosynthèse, de sécrétion et d'accumulation des huiles essentielles (Ascensao *et al.*, 1995 ; Gersbach, 2002). On peut les trouver, à titre d'exemple, dans les feuilles de la menthe (*Mentha avertis*) (Sharma *et al.*, 2003). Ces structures sont constitués d'une cellule basale, d'une tige et de cellules sécrétrices recouvertes d'une cuticule (Turner *et al.*, 1999).

3.2. Cavités sécrétrices

Leur présences est bien établie comme étant caractéristique des Myrtacées et des Rutacées .il s'agit d'une espèce entoure par épithélium de cellules épidermiques sécrétrices .On les trouves par exemple dans les feuilles et les fleurs de *Mytrus communis* (Kalachanis et Psaras, 2005 ; Ciccarelli *et al.*, 2008) et des citrus (Rodriguez *et al.*, 1998).

3.3. Cellules sécrétrices

Ce sont des cellules généralement de grande taille pouvant avoir une cuticule lignifiée. C'est la plus simple des structures sécrétrices. On la rencontre dans différents tissus végétaux, comme le cortex du gingembre (*Zingiber officinale*) et l'endosperme de la noix de muscade (*Myristica frarans*).

3.4. Canaux sécréteurs

Les canaux ou conduits sécréteurs sont des cavités ovales qui se joignent souvent pour créer un réseau s'étendant des racines, passant par la tige, aux feuilles, aux fleurs et aux fruits. On les retrouve chez les espèces de la famille des Apiacées comprenant le cumin, le fenouil et l'anis (Gersbach et Reddy, 2002).ils sont aussi présents chez de nombreuses plantes de la famille des Astéracées telles que la camomille ; l'estragon ; l'absinthe et l'armoise commune (Zizovic *et al.*, 2007)

III. Facteurs influençant le rendement et la composition des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au plan du rendement des plantes d'origine, qu'au niveau de leur composition. Plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement en huiles essentielles ainsi que leurs compositions chimiques. Certains facteurs sont relatifs à la plante productrice, d'autres sont en relation avec son environnement et d'autres sont liés aux conditions de l'extraction et de stockage.

1. Facteurs physiologiques

Les facteurs physiologiques tels que le type de matériel végétal, et le stade de développement de la plante ainsi que la nature des structures sécrétrices déterminent la quantité et la qualité de l'huile essentielle produite (Figueiredo *et al.*, 2008). En effet, les huiles essentielles sont généralement plus abondantes dans les organes jeunes. Le stade de développement influence également la composition de l'huile essentielle et par conséquent sa couleur. Généralement peu de plantes donnent des huiles essentielles de compositions similaires pour leurs différents organes (fleurs, feuilles,...). Cette différence de composition peut être en partie expliquée par l'existence de structures sécrétrices différentes d'un organe à l'autre. En effet, les plantes ayant des structures sécrétrices internes sont caractérisées par une stabilité du rendement en huile essentielle. Outre les variations annuelles et mensuelles, il peut également y avoir des fluctuations journalières qui semblent être liées à l'activité du pollinisateur. En effet, pour les espèces à pollinisation diurne l'émission des composés volatils atteint son maximum pendant la journée tandis que celles à pollinisation nocturne montrent une émission maximale pendant la nuit. Les dommages mécaniques (herbivores) ou chimiques (herbicides) affectent le rendement et la qualité des huiles essentielles (Banchio *et al.*, 2007). En effet, une huile essentielle extraite à partir d'une plante traumatisée contient des composés qui ne sont pas présents dans l'huile essentielle extraite d'une plante saine.

2. Facteurs environnementaux

Les conditions environnementales (climat, pollution, conditions édaphiques,..) jouent également un rôle important dans la détermination du rendement et la qualité de l'huile essentielle. En effet, durant les mois basse température et de courte photopériode, on assiste à une réduction évidente de la production des composés volatils. De plus, plusieurs phytopathologies sont responsables d'une instabilité de production des huiles essentielles. La

nature du sol (type et composition) utilise pour la culture des plantes influence la récolte, le rendement et même la composition de l'huile essentielle (Boira et Blanquer, 1998).

3. Facteurs géographiques

Beaucoup de travaux ont montré l'existence d'une corrélation entre la composition qualitative de l'huile essentielle et la variation géographique (Azevedo *et al.* 2001 ; Orav *et al.*, 2006). Cette variation peut être liée d'un côté à une différence des conditions environnementales propre à chaque région géographique et d'un côté à la divergence génétique des plantes.

4. Conditions d'extraction et de stockage

(Huang *et al.*, 1995) ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles. Le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. (Fantino 1990) a noté des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé 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 (Carette 2000), les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître.

IV. Les principales techniques d'extraction des huiles essentielles

De nombreuses techniques permettent d'extraire l'huile essentielle des plantes et de préserver leurs composés volatiles. Ces techniques d'extraction évoluent dans le but d'améliorer le rendement d'extraction ainsi que la qualité de l'huile essentielle obtenue.

1. Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur est l'un des procédés les plus anciens d'extraction des matières volatiles (Bernard *et al.*, 1988). Cette technique d'extraction est basée sur le fait que la plupart des composés odorants volatiles contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau. Cet entraînement dépend de plusieurs facteurs : le coefficient de partage des composés entre la vapeur d'eau et la plante, la vitesse de diffusion des composés, leur solubilité dans l'eau, la pression partielle de vapeur, la durée et la vitesse de transfert de chaleur (Boelens *et al.*, 1990).

Il existe des variantes à ce procédé qui traduisent la manière avec laquelle la vapeur d'eau est produite et mise au contact de la plante :

1.1. L'hydrodiffusion :

L'hydrodiffusion consiste à faire passer un courant de vapeur d'eau à très faible pression (0,1 bar) (Boelens *et al.*, 1990) à travers la masse végétale. Dans cette technique, la matière végétale n'est pas en contact direct avec l'eau en ébullition mais seulement avec sa vapeur qui est pleinement saturée et humide mais jamais super-chauffée (Sandra et Bicchi, 1987). Où le matériel végétal est introduit dans un cylindre de verre (long de 1 m) perforé aux deux extrémités de manière à permettre à la vapeur d'eau de circuler à travers le feuillage. Cette vapeur est générée par une réserve d'eau contenue dans un ballon de deux litres qui est amené à ébullition à l'aide d'une mante chauffante. L'ensemble générateur de vapeur-hydrodiffuseur est rattaché à un réfrigérant qui condense le distillât. Ce dernier est recueilli de la même manière que précédemment soit en solution dans un solvant organique soit directement sous forme d'huile.

1.2. La distillation à la vapeur sous pression

Cette méthode est très similaire à l'hydrodiffusion à l'exception de l'absence du réservoir d'eau sous l'hydrodiffuseur. La vapeur d'eau, saturée ou surchauffée et fréquemment à pression plus élevée que la normale avec l'aide d'un générateur de pression, est introduite dans l'alambic (distillateur) sous la masse végétale légèrement compactée et traverse le tout jusqu'à un collecteur situé au-dessus (Guenther et Ernest, 1948). Le distillât est recueilli à la sortie d'un condensateur juste après ce collecteur, soit en solution dans un solvant organique soit, plus souvent, directement sous forme d'huile.

1.3. L'hydrodistillation

Dans cette méthode, le matériel végétal est introduit directement dans l'eau et le mélange est porté à ébullition (figure 1). Des morceaux, plus ou moins déchiquetés, de la plante sont immergés complètement ou encore flottent sur l'eau, ceci étant fonction de la densité du feuillage et de la quantité de matériel par charge. La durée de distillation et l'acidité peuvent donner lieu à des réactions telles que l'hydrolyse des esters, la polymérisation des aldéhydes ou la décomposition d'autres composés (Nguemtchouin Mbouga, 2012).

Lors de la distillation des huiles essentielles, il existe des échanges de matière entre les phases solides, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production. Les expérimentations conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les plantes

ligneuses que pour les herbacées (Koedam, 1982). Cette différence est fortement liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des essences qui peuvent être superficielles ou internes. De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'hydrodistillation, notamment les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée (Nguemtchouin Mbouga, 2012).

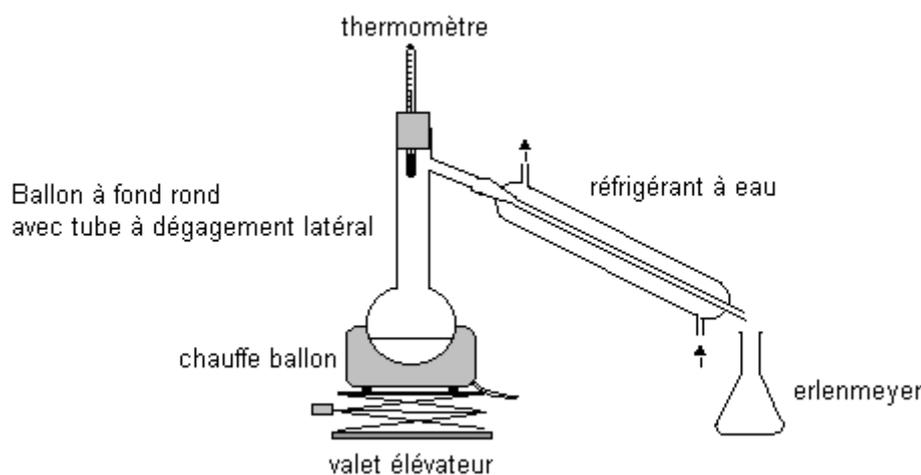


Figure 1: Montage d'hydrodistillation (Clevenger)

Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule qui constitue les seules barrières à la libération de l'huile essentielle, est vite rompue à ébullition, les composés volatils sont aussitôt évaporés. Lorsque les essences sont sous-cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur. Elles sont alors évaporées comme dans le cas des sécrétions superficielles (Koedam, 1982). Pour ce qui est de la localisation des sites producteurs d'essence, les molécules odorantes sont rencontrées dans tous types d'organes : racine, tige, bois, écorce, feuille, fleur, fruit, etc. Elles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables.

2. Extraction par des solvants organiques

Les huiles essentielles ont la propriété de se solubiliser dans la plupart des solvants organiques en particulier les hydrocarbures aliphatiques (n-pentane, n-hexane) (Bernard *et al.*, 1988). D'où l'utilisation des solvants organiques pour l'extraction des huiles essentielles des plantes. Les solvants, purs ou en mélange sont choisis en fonction de leurs propriétés, entre autre, la polarité, la température d'ébullition, la réactivité, la possibilité d'être recyclés (Luque de Castro *et al.*, 1999). L'extraction directe des plantes par des solvants organiques entraîne divers constituants avec les huiles essentielles. L'extrait récupéré est appelé concrète, il

contient des pigments, des matières grasses et d'autres composés. Le traitement à froid de la concrète par l'alcool absolu, et la distillation fractionnée, permettent d'obtenir, la phase dite «absolue » qui contient la majeure partie des composés volatils. (Nguemtchouin Mbouga, 2012).

3. Extraction par le dioxyde de carbone supercritique

L'extraction par le CO₂ fait partie des plus récents procédés d'extraction de substances naturelles. Cette technologie utilise le CO₂ à l'état liquide ou supercritique. Le CO₂ passe à l'état supercritique lorsqu'il est soumis à une pression supérieure à 73 bars et à une température supérieure à 31,4°C (Bernard *et al.*, 1988). Dans ces conditions, il possède un bon pouvoir dissolvant plus ou moins sélectif selon la température, la pression et la nature des solutés, qui vont déterminer le rendement d'extraction et la composition de l'extrait (Menaker *et al.*, 2004 ; Casas *et al.*, 2007 ; Kazazi *et al.*, 2007). D'après Bernard *et al.* (1988), on peut jouer sur la pression et le taux d'hydratation relatif de la plante pour séparer les huiles essentielles, mais aussi un composé odorant particulier d'une huile essentielle. L'extraction par le CO₂ se caractérise par une absence de toxicité et de résidus (Luque de Castro *et al.*, 1999) qui permet d'obtenir des produits de meilleure qualité comparée aux procédés classiques d'extraction des huiles essentielles (El Hattab *et al.*, 2007 ; Gomes *et al.*, 2007 ; Rout *et al.*, 2007). La principale limite de ce procédé d'extraction est liée au coût élevé de l'appareillage capable de travailler à des pressions élevées. Ce mode d'extraction est peu valorisable en milieu rural africain car il nécessite des procédés coûteux et difficiles à mettre en œuvre compte tenu des contraintes techniques et logistiques (Nguemtchouin Mbouga, 2012).

V. Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. Dans cette partie de notre travail, on cite certaines techniques performantes pour l'identification des huiles essentielle.

1. 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 (Arpino *et al.*, 1995). C'est la technique de séparation la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (Paris et Godon, 1979).

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (Skoog *et al.*, 2003).

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (Tranchant, 1995).

Le développement des phases stationnaires chirales (colonne de cyclodextrines) et de la CPG multidimensionnelle a permis de surmonter certaines difficultés rencontrées dans la séparation et l'identification des composés dans les huiles essentielles (Marriott *et al.*, 2000 ; Marriott *et al.*, 2001).

Les techniques de couplage de la CPG avec des techniques spectroscopiques (SM, IRTF) ont permis une approche beaucoup plus précise de l'identification.

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

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996). Il existe plusieurs analyseurs de masse mais les plus fréquents pour l'analyse des huiles essentielles sont le « quadripôle » et le piège à ions ou « ion trap ». Tous deux utilisent la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge m/z (McLafferty et Tureček 1993 ; De Hoffmann *et al.*, 1999).

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes (Pradeau et Cohen, 1992) :

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ ;
- **Accélération** : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation** : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge ;

- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées ;
- **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Les systèmes actuels de CPG/SM sont très performants pour la séparation, la détection et l'identification des molécules.

3. Le couplage de la CPG avec IRFT

Le couplage de la CPG avec un spectromètre infrarouge par transformée de Fourier (CPG/IRFT) est une technique particulièrement intéressante lorsqu'il s'agit d'analyser des composés fonctionnalisés en permettant d'identifier des molécules dont les spectres de masse ne sont pas suffisamment différenciés. A titre d'exemple, les quatre isomères du farnésol, ceux du menthol (Coleman *et al.*, 1989), les acétates de bornyle et d'isobornyle (Kubeczka *et al.*, 1988), les esters linéaires portant les groupements méthacrylate/crotonate et angélate/tiglate (Bicchi *et al.*, 1987) ou encore le nérol et le géraniol (Coleman et Gordon, 1991) sont distingués sur la base de leur spectre infrarouge. L'IRFT a aussi montré son efficacité dans l'identification de composés susceptibles de subir des transpositions sous l'effet de l'impact électronique. Le développement d'appareils permettant d'atteindre des seuils de sensibilité comparables à ceux de la CPG/SM (Winkler *et al.*, 1983 ; Winkler *et al.*, 1984) font du couplage CPG/IRFT une technique de plus en plus intéressante dans l'analyse des arômes.

4. La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN-¹³C)

Une alternative aux méthodes d'analyse décrites précédemment est la RMN du carbone-13 des mélanges, sans séparation préalable des constituants. Cette technique, initiée par Formáček et Kubeczka (Formáček *et al.*, 1982 ; Kubeczka *et al.*, 1988), développée ensuite par d'autres chercheurs, (Tomi *et al.*, 1995 ; Bradesi *et al.*, 1996) offre des potentialités fortement intéressantes.

Le principe consiste à attribuer les raies de résonance de chacun des carbones de chaque composé à partir du spectre unique du mélange et de les comparer à des produits de référence

répertoriés dans des bibliothèques (Bradesi *et al.*, 1996 a ; Bradesi *et al.*, 1996 b). Contrairement aux techniques chromatographiques, les constituants ne font pas l'objet d'une individualisation en RMN. Différents aspects sont à considérer, à savoir l'observation et l'individualisation des différentes raies de résonance dans le spectre du mélange et l'attribution de chacune de ces raies de résonance à un produit donné permettant son identification.

L'apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse d'un mélange complexe est intéressant en ce sens qu'elle permet, dès lors que leur teneur est supérieure à 0,5% et qu'ils sont présents dans les bibliothèques de référence, d'identifier rapidement et sans ambiguïté, certains composés dont l'analyse par les techniques conventionnelles est problématique.

La RMN du carbone-13 des mélanges est efficace particulièrement pour la différenciation et l'identification de molécules structurellement très proches (ie : stéréoisomères) comme le montrent les travaux réalisés sur les isomères du menthol, du dihydrocarvéol et sur leurs acétates (Bradesi *et al.*, 1994 ; Bradesi, 1995) ou ceux portant sur les cédrènes et les funébrènes qui ne diffèrent que par la jonction des cycles (Tomi *et al.*, 1993). De même, les énantiomères du camphre et de la fenchone ont été différenciés dans l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* (Ristorcelli *et al.*, 1998). L' α -bisabolol et l'épi- α -bisabolol, deux alcools sesquiterpéniques, ont des spectres de masse identiques et des indices de rétention très proches ; seuls leurs spectres de RMN du carbone-13, très différents, permettent leur identification même si l'un seulement des isomères est présent dans l'huile essentielle (Tomi et Casanova, 2000).

VI. Propriétés physicochimiques et biologiques des HE

1. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bernard *et al.*, 1988). Où selon Desmares *et al.*, (2008) leurs principales caractéristiques sont :

- ✓ Liquides à température ambiante et possèdent une température d'ébullition variant de 160°C à 240°C.
- ✓ N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- ✓ Volatiles et très rarement colorées ;
- ✓ Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;

- ✓ Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- ✓ Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;
- ✓ Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- ✓ Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

2. Propriétés biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Plusieurs huiles essentielles ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Valnet, 2005).

2.1. Effet antioxydant

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (Richard, 1992). Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation (Multon, 2002). En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc. (Madhavi *et al.*, 1996).

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

2.2. Effet antimycosique

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les

champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (Lis-Balchin, 2002). Pour les Levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycelium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Oussalah *et al.*, 2007). De même, certaines huiles présentent une activité antifongique. On peut citer celles de *Eucalyptus globulus*, *Thymus vulgaris* et *Lavandure officinalis* (Tchoumboungang, 1997).

Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou *et al.*, 1988). Ils concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique et hydrocinnamique). Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative.

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique : **Phénols** > **Alcools** > **Aldéhydes** > **Cétones** > **Ethers** > **Hydrocarbures** (Utree *et al.*, 2002).

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol > thymol > isoeugénol > eugénol) (Utree *et al.*, 2002). L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique.

2.3. Effet antibactérien

Dans le domaine microbiologique, plusieurs travaux ont été effectués dans le but de montrer leur activité anti-microbienne (Boakye *et al.*, 1977 ; Thomas, 1989 ; Garry *et al.*, 1997 ; Amvam Zollo *et al.*, 1998 ; Andriantseferana *et al.*, 1998). Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Leur activité

antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Oussalah *et al.*, 2007).

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002). De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson, 1997). Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (Cox *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2002). Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée (Wendakoon et Sakaguchi, 1995). Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides (Cox *et al.*, 1991). Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides pariétales grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (Dorman et Deans, 2000).

Selon Oussalah *et al.* (2007), les différents effets des huiles essentielles sur les bactéries, se déroulent d'une manière générale en trois phases :

- ❖ Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires ;
- ❖ Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ;
- ❖ Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Partie II :

Matériel & Méthodes

I. Matériel végétal

Les huiles essentielles du Géranium rosat : *Pelargonium graveolens* ont été isolées des parties aériennes (feuilles) des plantes par hydrodistillation. L'extraction a été réalisée au Laboratoire « Physiologie Végétale » de la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz, Fès, Maroc.

1. Description de la plante

Pelargonium graveolens (**géranium rosat**) est une espèce de plante de la famille des Geraniaceae. Originnaire d'Afrique, cette plante vivace, pouvant atteindre 1,20 m de haut, est pleine de suc en début de végétation, puis ligneuse, à écorce brun clair. Ses fleurs sont petites, de couleur rose pâle, en ombelles denses. On en connaît plus de trois cents variétés et hybrides.

La taxonomie de cette plante

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Geraniales

Famille : Geraniaceae

Genre : *Pelargonium*

Espèce : *Pelargonium graveolens*



Photo 1 : *Pelargonium graveolens* (géranium rosat)

2. Récolte de la plante

Les plantes de *Pelargonium graveolens* ont été récoltées durant la période de Mars 2013, du jardin de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, située dans la région de Fès-Boulemane.

La région de Fès-Boulemane est située au Centre-Nord du Royaume du Maroc, elle est considérée comme un carrefour entre l'est et le Nord-Est d'une part, et le Sud-Ouest du Royaume d'autre part. Cette région d'Est soumise à 3 types de climats:

- un climat continental dans la partie Nord, sec en été et tempéré en hivers. La moyenne des précipitations y est de 450 mm et les vents y sont secs et froids en hiver et chauds en été (Chergui) ;
- un climat humide en zone montagneuse, froid en hiver et tempéré en été. La moyenne des précipitations dépasse les 600 mm avec des grêles et des inondations suite aux averses;
- un climat semi-aride dans les hautes collines de Boulemane, où la moyenne des précipitations n'excède pas le cap de 250 mm.

3. Conservation des plantes

Les feuilles de *Pelargonium graveolens* fraîchement recueillies, sont séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant environ 15 jours. Devenues sèches, elles sont récupérées dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction de l'huile essentielle. Comme le recommande la plupart des travaux, nous avons travaillé sur la matière sèche. Car il a l'avantage une détermination plus rapide du rendement sans ambiguïté particulière.

4. Détermination de l'humidité

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale. Le contenu en humidité des feuilles de *Pelargonium graveolens*, a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve à $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (Twidwell *et al.*, 2002). **Où la masse du matériel végétal est pesé avant et après séchage.** Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = \frac{\text{Masse sèche}}{\text{Masse fraîche}} \times 100$$

II. Extraction des huiles essentielles

1. Description du dispositif d'extraction

L'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* a été obtenue par la technique d'hydrodistillation. Cette technique met directement en contact le matériel végétal avec l'eau. Le tout est ainsi porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par la différence de densité.

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, il est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place le matériel végétal séché et l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, un collecteur (erlen) en verre pyrex également qui reçoit les extraits de la distillation (Photo 2).



Photo 2 : Dispositif d'hydrodistillation des huiles essentielles

2. Procédé d'extraction des huiles essentielles

200 g des feuilles de *Pelargonium graveolens* fraîches, finement découpées afin de réduire la surface d'échange vapeur-feuilles, sont mises dans un ballon à fond rond de 250 ml, additionnées de 100 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant environ 2 heures. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide.

3. Conservation de l'huile essentielle obtenue

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables. C'est pour cela nous les avons conservées à une température voisine de 4 °C, dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière.

4. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement en huiles essentielles pour chaque échantillon correspond à la quantité d'huile obtenue par rapport à la masse de matière sèche servie à l'extraction. Autrement dit, le volume d'huile recueilli doit être quantifié en liaison avec la masse placée dans le ballon. Il faut savoir que plusieurs calculs existent et diffèrent selon qu'il s'agisse de matière fraîche ou sèche. En conséquence, la détermination du rendement peut s'effectuer en deux temps.

✓ Soit en calculant d'abord le taux d'humidité relative avant le rendement proprement dit (voir formules ci-dessous). Dans ce cas, la masse fraîche introduite dans le ballon devra équivaloir à la même quantité mise à l'étuve pendant 48 heures à 60°C pour les besoins de l'expérience. Le placement à l'étuve permet aux feuilles de s'assécher complètement.

$$H(\%) = \frac{MF - MS}{MF} \times 100$$

Avec :

H(%) : taux d'humidité
MF: Matière Fraîche
MS: Matière Sèche

Ensuite on calcule le rendement en huile essentielle selon la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{V \times 10^4}{(MF - MS) \times H}$$

Avec :

R : Rendement en huile essentielle en pourcentage (%)
V: volume de l'huile (ml) recueilli

✓ Soit par une simple lecture directe sur l'instrument où l'on recueille les huiles. De surcroît, le rendement en huile essentielle est le rapport entre le volume de l'huile extrait et la matière sèche de la plante à traiter. Où le rendement est exprimé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{V}{MS} \times 100$$

Avec :

R : Rendement en huile essentielle en pourcentage (%)
V : volume de l'huile (ml) recueilli
MS: Matière Sèche (g)

C'est cette dernière formule qui nous a permis de déterminer le rendement en huile essentielle de *Pelargonium graveolens*.

III. Evaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle

1. Souches microbiennes étudiées

Cinq souches bactériennes ont été choisies pour leur pathogénicité et pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires au Maroc (*Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*). Elles sont isolées du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Hassan II, de Fès.

Le tableau 1 représente certaines caractéristiques de ces souches.

Tableau 1: certaines caractéristiques des souches bactériennes étudiées

Bactéries	Gram négatifs	Bacilles	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
			<i>Acinetobacter baumannii</i>
			<i>Escherichia coli</i>
			<i>Klebsiella pneumonia</i>
	Gram positifs	Coccies	<i>Staphylococcus aureus</i>

2. Méthode d'analyse

Pour tester l'effet de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* sur cinq souches bactériennes, nous avons utilisé la méthode des disques, appelée aussi «Méthode Pasteur » rapportée par Bendjilali *et al.*, (1986) ; Menghindi *et al.*, (1987). C'est une méthode très utilisée pour tester l'action antimicrobienne des huiles essentielles (Cavar *et al.*, 2008 ; Ebrahimi *et al.*, 2008 ; Mahboubi et Haghi, 2008).

Elle consiste à placer un disque imprégné d'huile essentielle sur une gélose nutritive inoculée par le microorganisme test (diffusion en disque). L'ensemencement est effectué par étalement, à partir de l'inoculum fraîchement préparé, pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Une zone d'inhibition est produite autour du disque quand l'huile essentielle est active contre le microorganisme test (figure 2).

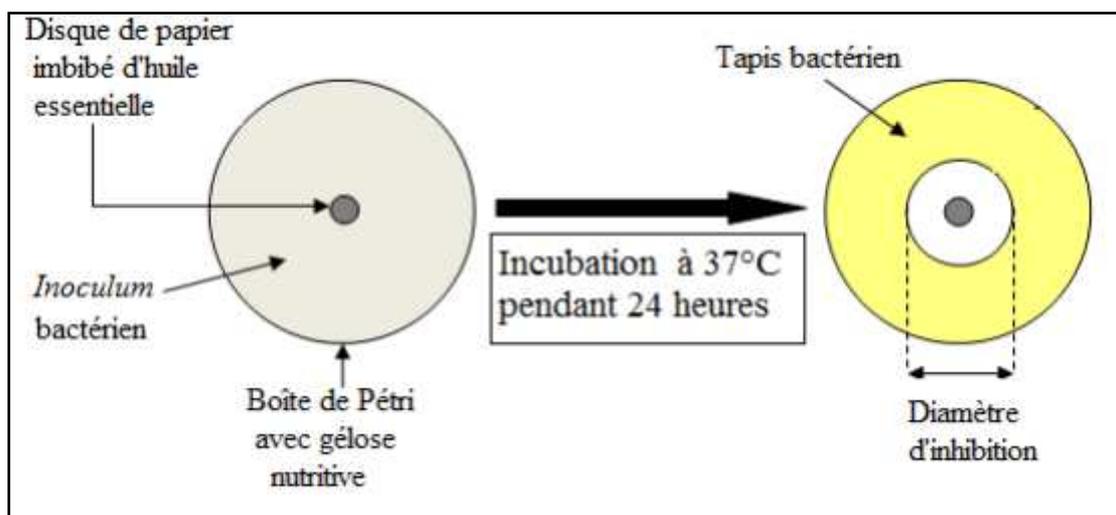


Figure 2 : Principe de la méthode de diffusion par disque

Des antibiogrammes sont effectués en parallèle avec les aromatoigrammes. Les tests sont répétés trois fois pour avoir des résultats fiables.

3. Incubation et lecture des résultats

Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, la lecture et l'interprétation se feront par mesure des diamètres d'inhibition.

IV. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle

1. La méthode analytique utilisée

L'identification des divers constituants de ces huiles a été réalisée par couplage d'un chromatographe en phase gazeuse à un spectromètre de masse (GC/MS) au Centre Régional d'Interface (C.U.R.I) de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah.

Une analyse sur CPGCC fournit une très grande résolution dans la séparation des composés d'un mélange. Il arrive donc très souvent de séparer à l'aide de cette technique des molécules de structure très voisine et de ne pouvoir les identifier avec précision. L'adjonction d'un spectromètre de masse au chromatographe résout en général l'identification définitive des composés présents dans le mélange étudié.

Outre, l'identification des constituants, la technique analytique utilisée permet aussi d'avoir leurs concentrations respectives et leurs ordres de sortie qui renseignent sur la volatilité, c'est-à-dire à leurs masses moléculaires, et leurs polarités. Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux répertoriés dans une bibliothèque de type (NIST-MS) (Adams, 2001).

2. Caractéristiques de l'appareil de CG/SM utilisé

La séparation et l'identification des différents composés chimiques des huiles essentielles extraites des feuilles de *Pelargonium graveolens* ont été réalisées par la chromatographie en phase gazeuse (Ultra GC Trace), couplée à un spectromètre de masse de type (PolarisQ) (Photo 7), Trappe d'ions en mode impact électronique (EI) avec une énergie d'ionisations de 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire apolaire en silice de type (Wcot Fused Silica), phase stationnaire (CP-SIL5CB), 50 m de longueur, 0,32 mm de diamètre et 1,25 μm d'épaisseur. La température de la colonne est programmée de 40 à 280 °C à raison de 3 °C/min. La température de l'injecteur est fixée à 240 °C et celle de détecteur (source d'ionisation) est de 200°C. Le débit du gaz vecteur (Hélium) est fixé à 1 ml/min. Le volume de l'échantillon injecté est de 1 μl de l'huile diluée dans l'hexane.

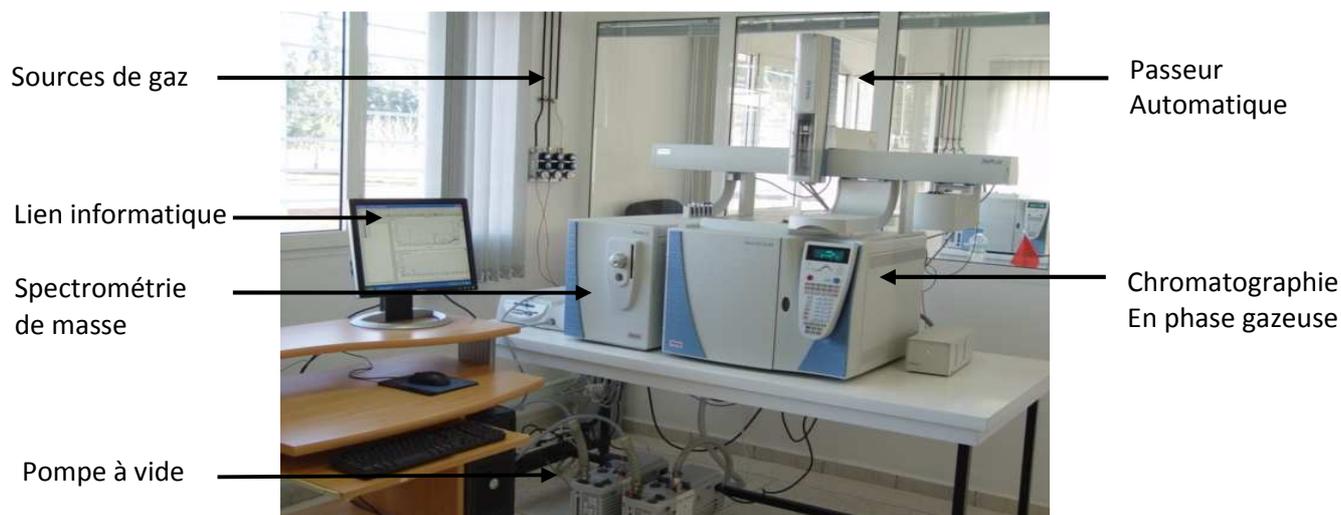


Photo 3 : Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS) (CURI)

Partie III :

Résultats & discussions

I. Rendement en huiles essentielles

1. Taux d'humidité

Le taux d'humidité dans les feuilles de *Pelargonium graveolens*, représente la masse de l'eau contenue dans cet échantillon par rapport à sa masse sèche. Il est calculé selon la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{MF - MS}{MF} \times 100$$

Avec :

H(%) : taux d'humidité

MF: Matière Fraîche

MS: Matière Sèche

D'après cette étude, le taux d'humidité des feuilles de *Pelargonium graveolens*, récoltées du jardin de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, est de 77,5 %.

2. Rendement

Le rendement en huiles essentielles, extraites des feuilles de *Pelargonium graveolens* par hydrodistillation, a été calculé en fonction de la matière sèche de la plante. Selon la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{V}{MS} \times 100$$

Avec :

R : Rendement en huile essentielle en pourcentage (%)

V : volume de l'huile (ml) recueilli

MS: Matière Sèche (g)

Les échantillons des feuilles de *Pelargonium graveolens*, récoltées en Mars 2013, du jardin de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, ont fourni un rendement élevé d'environ 0,8%. Une valeur très proche du rendement en huiles essentielles de *Lavandula stoechas*, extraites par le même dispositif expérimental dans notre laboratoire par Mharti (2009).

Sachant que le rendement en huiles essentielles est influencé par plusieurs facteurs, tels que la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles comme les pélargoniums odorants (Demarne, 1985). Ce rendement élevé, que nous avons

obtenu, pourrait être due non seulement à l'origine de la plante mais également à l'intervention d'une multitude de facteurs comme l'entretien réservé à ce jardin, où les écartements entre plants (Rajeswara, 2002), le désherbage (Rodolfo *et al.*, 2006), ainsi que l'arrosage régulier (Boira et Blanquer, 1998), ont des effets positifs. En plus, l'extraction que nous avons effectuée a été faite au mois de Mars caractérisé par une photopériode optimale propice à la biosynthèse des huiles essentielles.

II. Effet antimicrobien de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*

1. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii est une bactérie fréquemment résistante à de nombreux antibiotiques, qui est responsable d'épidémies d'infections nosocomiales le plus souvent dans des services accueillant des patients fragilisés (réanimation par exemple). Chez les patients fragilisés, elle est à l'origine d'infections variées parfois sévères (infections pulmonaires, septicémies, infections de plaies ou de brûlures...). La létalité des infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* varie entre 17 et 46% pour les septicémies et peut atteindre 70 % pour les pneumopathies (Allen, *et al.*, 200).

L'étude de l'effet de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* sur la croissance d'*Acinetobacter baumannii*, montre qu'elle inhibe la croissance de cette souche (Photo 4). Nos résultats concordent avec ceux de Haddouchi *et al.* (2009), qui ont montré que la croissance de cette souche est largement inhibée par une huile essentielle celle de *Thymus fontanesii*.

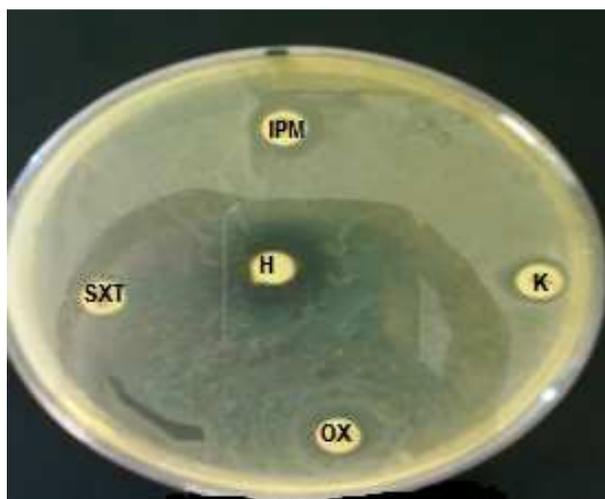


Photo 4 : Taux d'inhibition *Acinetobacter baumannii* par HE de *Pelargonium graveolens* (**H**) vis à vis des antibiotiques : Imipenème (**IPM**) ; Kanamycine (**K**) ; Oxacillin (**OX**) ; Sulpha (**SXT**).

La comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition d'*Acinetobacter baumannii* par l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* avec celui de quatre antibiotiques (Figure 3), montre que cette huile essentielle représente la zone d'inhibition la plus importante avec un diamètre de $27 \pm 1,7$ mm, alors que le diamètre d'inhibition des antibiotiques varie de 16 ± 2 mm pour Kanamycine, $12 \pm 2,6$ mm pour Imipenème, 18 ± 1 mm pour Sulpha et $20 \pm 1,3$ mm pour Oxacillin.

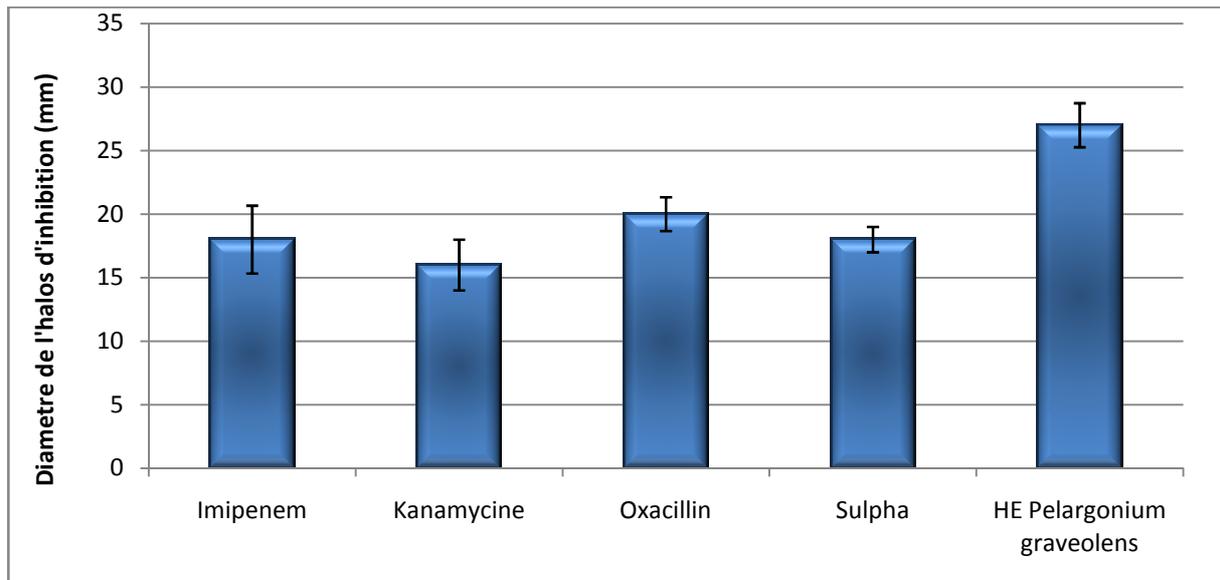


Figure 3 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition d'*Acinetobacter baumannii* par HE de *Pelargonium graveolens* avec celui des antibiotiques : Imipenème, Kanamycine, Oxacillin et Sulpha.

2. *Staphylococcus aureus*

Le germe *Staphylococcus* comprend des cocci Gram-positifs, asporulés, immobiles et de $0,5$ à $1,5$ μm de diamètre. Ils se disposent en amas réguliers (Manuel Bergey, 1984). *Staphylococcus aureus* est considérée comme le principal germe pathogène de ce genre. Il est responsable de la plupart des infections purulentes, y compris les furoncles et les coupures et égratignures infectées (Evans, 1977). Seyfried (1973) a signalé un cas d'infection de l'oreille associée à la baignade dans une piscine dont l'eau était contaminée.

L'étude de l'effet de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* sur la croissance de *Staphylococcus aureus*, montre qu'elle inhibe la croissance de cette souche (Photo5).

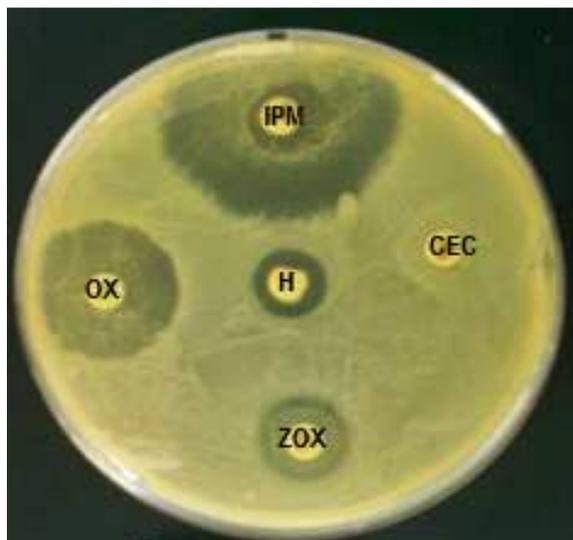


Photo 5 : Taux d'inhibition *Staphylococcus aureus* par HE de *Pelargonium graveolens* (**H**) vis à vis des antibiotiques: Imipenème (**IPM**) ; Oxacillin (**OX**) ; Ceftizoxine (**ZOX**) ; Cefaclor (**CEC**).

Selon Kalebra *et al.* (2013), *Staphylococcus aureus* est résistante à l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*. Alors que notre échantillon l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, a un effet inhibiteur important sur *Staphylococcus aureus* (Photo 5). Résultats qui concordent avec les travaux de Ghannadi *et al.* (2012), qu'ont mis en évidence l'effet inhibiteur très important de cette huile essentielle contre *Staphylococcus aureus*. Alors que Selon Haddouchi *et al.* (2009), cet effet est moins important pour l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*.

La comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition de *Staphylococcus aureus* par l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* avec celui de quatre antibiotiques (Figure 4), montre que cette huile essentielle représente le taux d'inhibition le plus faible avec un diamètre d'inhibition de $19 \pm 2,2$ mm, alors que le taux d'inhibition des antibiotiques varie de $46 \pm 3,7$ mm pour imipenème, $32 \pm 3,7$ mm pour Oxacillin, $22 \pm 1,4$ mm pour Ceftizoxine et 22 ± 2 mm pour Cefaclor.

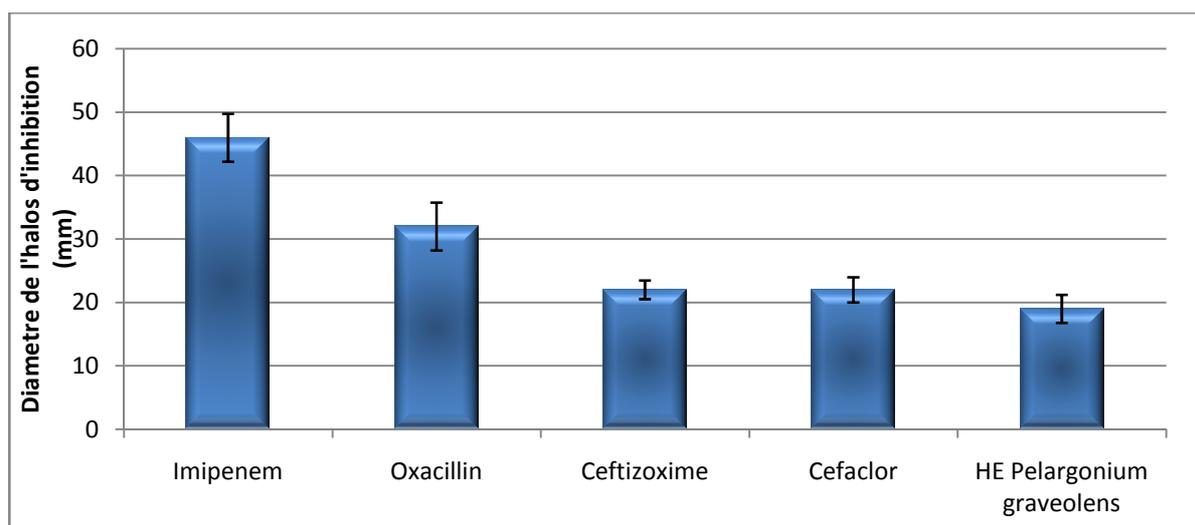


Figure 4 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition de *Staphylococcus aureus* par HE de *Pelargonium graveolens* avec celui des antibiotiques : Imipenème, Oxacillin, Ceftizoxime, Cefaclor.

3. *Pseudomonas aeruginosa*

Ces germes sont des bacilles Gram négatifs, mobiles par flagelles polaires (Collins et al, 1991) *Pseudomonas aeruginosa* est la principale espèce de cette famille qui revêt une importance dans la pollution microbienne du milieu aquatique. *Pseudomonas aeruginosa* provoque des éruptions cutanées (Kush et Hoadley, 1980) et des infections de l'œil (Wilson et Ahearn, 1977) et qu'il constitue le principal responsable des otites externes (Cassisi et coll., 1977). Dans certains cas rares ils peuvent engendrer des septicémies (Brisou et Denis, 1978). *P. aeruginosa* constitue l'espèce type du genre *Pseudomonas* posant de graves problèmes thérapeutiques.

L'étude de l'effet de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*, montre qu'elle inhibe la croissance de cette souche (Photo 6).

Selon Haddouchi *et al.* (2009), de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* n'a pas d'effet inhibiteur sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. Kalebra *et al.* (2013), ont montré que *Pseudomonas aeruginosa* est résistante à l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*. D'après Ghannadi *et al.* (2012), cette huile essentielle a un effet inhibiteur moins important contre *Pseudomonas aeruginosa*. Alors que notre échantillon l'huile essentielle de *P. graveolens*, a un effet inhibiteur important sur *Pseudomonas aeruginosa* (Photo 6). Ces différences peuvent être dues à la différence des compositions chimiques d'une huile à l'autre, sachant que l'activité d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique, qui peut varier d'un échantillon à l'autre et évoluer au cours du temps (Burt, 2004).

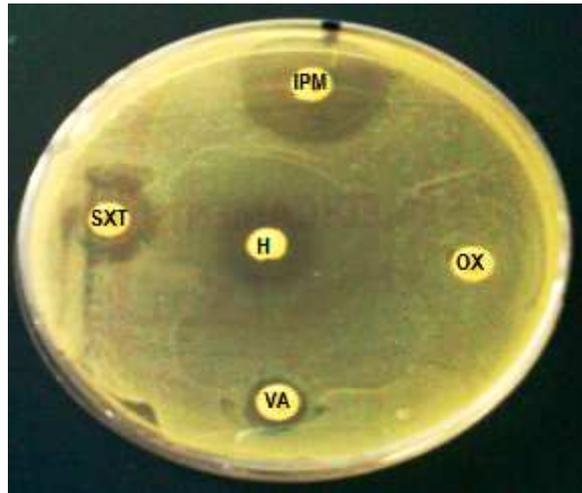


Photo 6 : Taux d’inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* par HE de *Pelargonium graveolens* (**H**) vis à vis des antibiotiques: Imipenème (**IPM**) ; Oxacillin (**OX**) ; Vancomycine (**VA**) ; Sulpha (**SXT**).

La comparaison du diamètre de l’halo d’inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* par l’huile essentielle de *Pelargonium graveolens* avec celui de quatre antibiotiques (Figure 5), montre que contrairement à l’Oxacillin pour lequel cette souche a développé une résistance, cette huile essentielle inhibe sa croissance, avec un diamètre d’inhibition de $22 \pm 1,8$ mm, légèrement inférieur à celui de l’imipenème ($32 \pm 3,3$ mm), proche de celui de sulpha ($24 \pm 2,4$ mm), et légèrement supérieur à celui du vancomycine ($17 \pm 1,8$ mm).

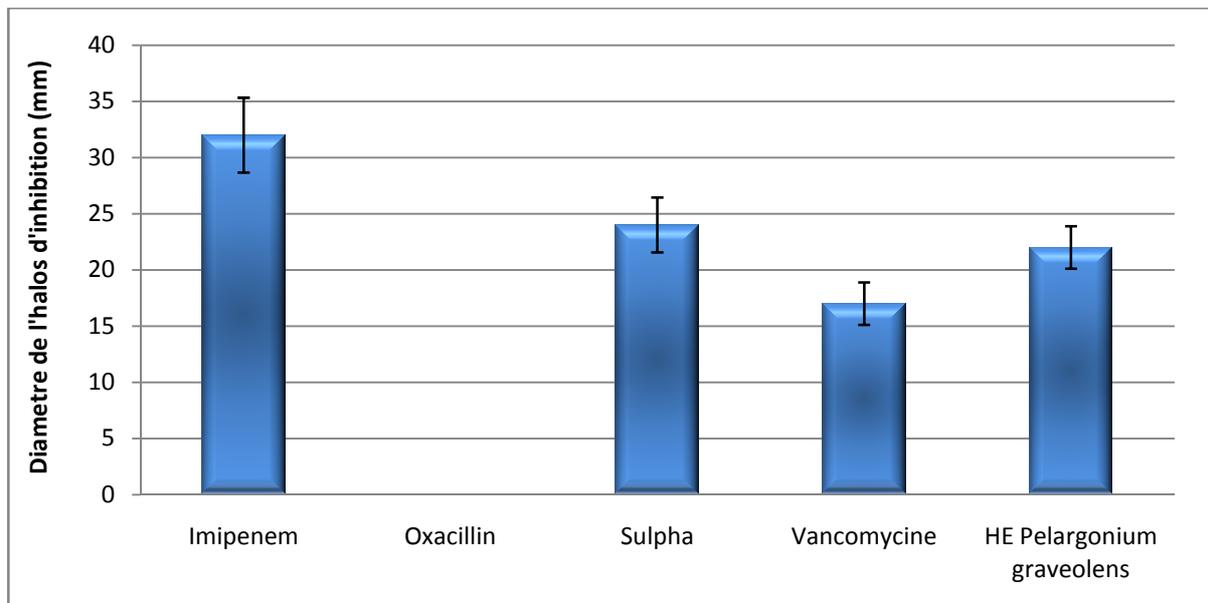


Figure 5 : Comparaison du diamètre de l’halo d’inhibition de *Pseudomonas aeruginosa* par HE de *Pelargonium graveolens* avec celui des antibiotiques: Imipenem, Oxacillin, Vancomycine, Sulpha.

4. *Klebsiella pneumonia*

Les espèces du genre *Klebsiella* sont d'importants pathogènes communs, à l'origine de pneumonies nosocomiales (7 à 14 % de tous les cas), de septicémies (4 à 15 %), d'infections urinaires (6 à 17 %), d'infections de plaies (2 à 4 %), d'infections survenant dans les unités de soins intensifs (4 à 17 %) et de septicémies néonatales (3 à 20%) (Janda *et al.*, 2006) Elles peuvent également causer des bactériémies et des infections hépatiques. (Janda *et al.*, 2006).

L'étude de l'effet de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* sur la croissance de *Klebsiella pneumonia*, montre qu'elle inhibe la croissance de cette souche (Photo7).

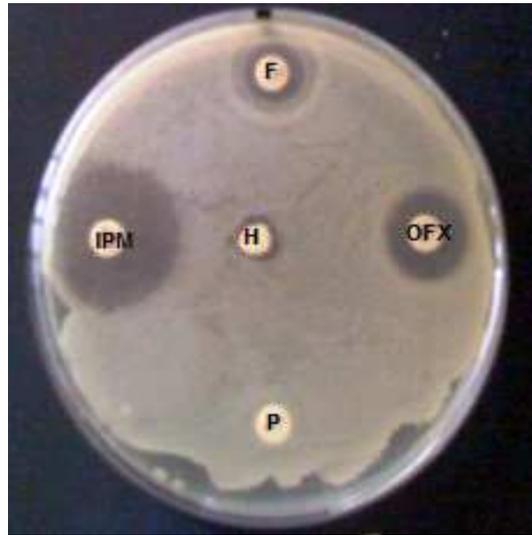


Photo 7 : Taux d'inhibition de *Klebsiella pneumonia* par HE de *Pelargonium graveolens* (**H**) vis à vis des antibiotiques: Imipenem (**IPM**) ; Sulpha (**SXT**) ; Ofloxacin (**OFX**) ; Pénicilline (**P**).

La comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition *Klebsiella pneumonia* par l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* avec celui de quatre antibiotiques (Figure 6), montre que à l'exception de pénicilline pour lequel cette souche est résistante, l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, représente un diamètre d'inhibition le plus faible (16 ± 2 mm), par rapport aux trois autres antibiotiques. Ce diamètre varie de $32 \pm 3,5$ mm pour Imipenème, $22 \pm 1,3$ mm Sulpha, et $24 \pm 3,1$ mm pour Ofloxacin.

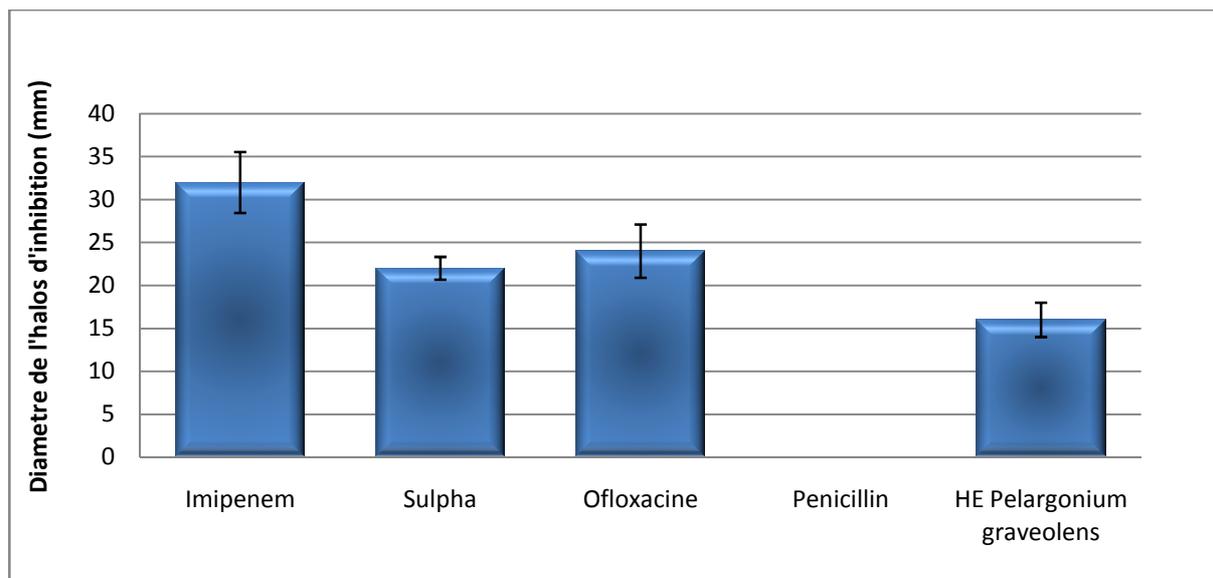


Figure 6 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition de *Klebsiella pneumoniae* par HE de *Pelargonium graveolens* avec celui des antibiotiques: Imipenème, Sulpha, Ofloxacine, Pénicilline.

5. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille, Gram négatif. Parmi les *E. coli*, le sérotype *E. coli* O157:H7 qui cause des douleurs abdominales, une diarrhée sanglante et le syndrome urémique hémolytique (SUH). On estime que de 2 à 7 % des infections par *E. coli* O157:H7 provoquent un SUH qui détruit les érythrocytes et entraîne une insuffisance rénale aiguë (Moe, 1997).

L'étude de l'effet de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* sur la croissance d'*Escherichia coli*, montre qu'elle inhibe faiblement la croissance de cette souche (Photo7). Résultats semblables à ceux de Ghannadi *et al.* (2012), montrant que l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* a un effet inhibiteur moins important contre cette souche microbienne. Haddouchi *et al.* (2009), ont aussi montré que la croissance de cette souche est faiblement inhibée par une autre huile essentielle, celle de *Thymus fontanesii*.

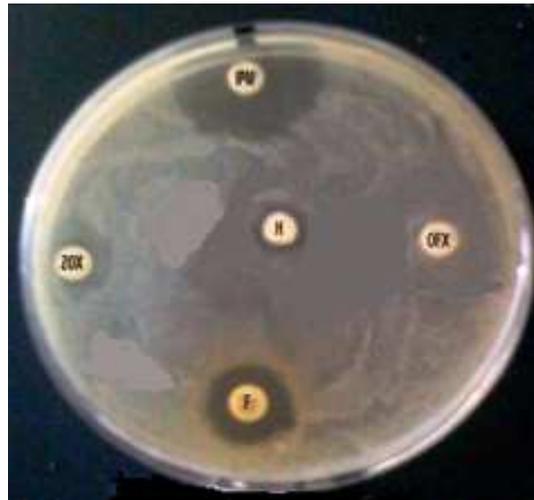


Photo 8 : Taux d'inhibition d'*Escherichia coli* par HE de *Pelargonium graveolens* (**H**) vis à vis des antibiotiques: Imipenème (**IPM**) ; Ceftizoxine (**ZOX**) ; Ofloxacine (**OFX**) ; Nitrofuranoïn (**F**).

La comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition *Escherichia coli* par l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* avec celui de quatre antibiotiques (Figure 7), montre que à l'exception de ofloxacine pour lequel cette souche est résistante, l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, représente un diamètre d'inhibition de $12 \pm 1,8$ mm, très inférieur à celui d' Imipenème ($33 \pm 3,1$ mm), proche de celui de Ceftizoxime (13 ± 2 mm) et légèrement inférieur de celui de Nitrofuranoïn ($22 \pm 3,3$ mm).

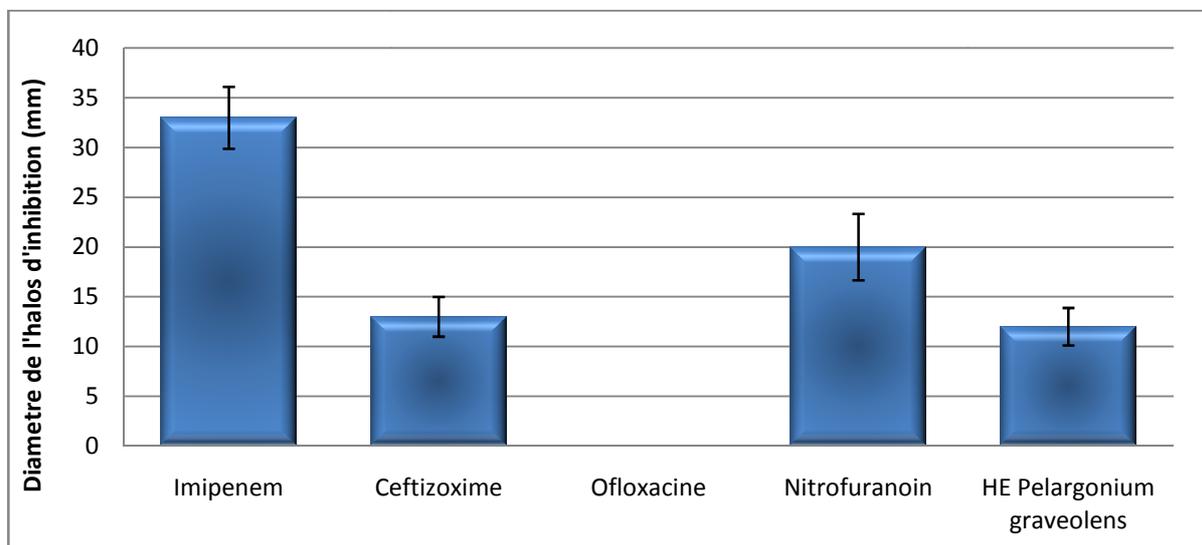


Figure 7 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition d'*Escherichia coli* par HE de *Pelargonium graveolens* avec celui des antibiotiques : Imipenème, Ceftizoxime, Ofloxacine, Nitrofuranoïn.

6. Comparaison de la sensibilité des souches étudiées

Les diamètres d'inhibition moyens, générés par l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, sur les différentes souches bactériennes testées, sont présentés dans la figure 8. Les barres d'erreurs représentent les erreurs standards de la moyenne pour chaque test.

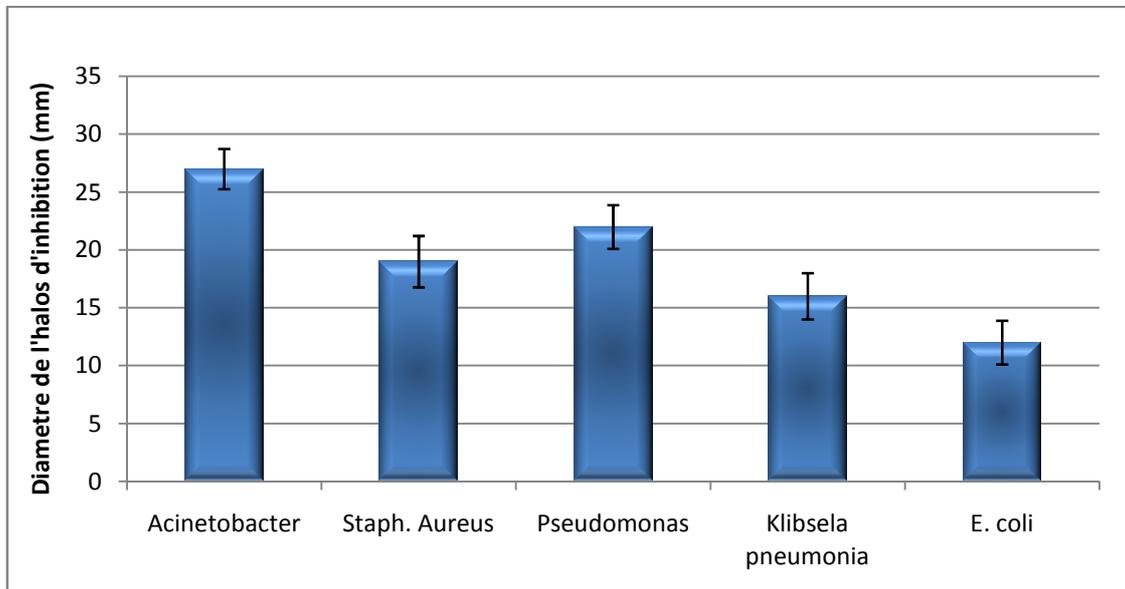


Figure 8 : Comparaison du diamètre de l'halo d'inhibition des souches bactériennes étudiées par HE de *Pelargonium graveolens*.

La comparaison de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* sur les différentes souches bactériennes testées, montre bien qu'*Acinetobacter baumannii* est la souche la plus sensible, où le diamètre de l'halo d'inhibition est $27 \pm 1,7$ mm. Suivie par *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de $23 \pm 1,8$ mm. L'effet inhibiteur de cette huile essentielle sur *Klebsiella pneumonia* et *Staphylococcus aureus* sont les plus rapprochés, car ils sont respectivement 16 ± 2 mm et $19 \pm 2,2$ mm. Cet effet sur *Escherichia coli* est le plus faible, où le diamètre d'inhibition n'est que $12 \pm 1,8$ mm.

Selon Rossi *et al.*, (2007a), une huile essentielle est considérée comme active contre un microorganisme, si elle produit des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 15 mm. Donc, d'après nos résultats (figure 8), l'huile essentielle que nous avons extrait des feuilles de *Pelargonium graveolens*, est significativement active contre *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumonia*, car les diamètres d'inhibitions sont supérieurs à 15 mm. Contrairement à *Escherichia coli* où le diamètre d'inhibition n'est que $12 \pm 1,8$ mm.

En se basant sur la classification de Moreira *et al.*, (2005), pour la détermination de la sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles (tableau 2) et d'après les résultats obtenus de l'étude de la sensibilité des cinq souches bactériennes étudiées à l'huile de *Pelargonium graveolens* (figure 8). On peut déduire que *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* sont extrêmement sensibles à cette huile essentielle, car leurs diamètres d'inhibition sont supérieurs à 20 mm. *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumonia* sont très sensibles. Quant à *Escherichia coli*, elle peut être considérée comme sensible.

Tableau 2 : Classification de la sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles selon Moreira *et al.*, (2005).

Diamètre (Ø) de la zone d'inhibition	La sensibilité à huile essentielle
Ø <8 mm	Non sensible
9 mm <Ø <14 mm	Sensible
15 mm <Ø <19 mm	Très sensible
20 mm <Ø	Extrêmement sensible

Nos résultats se contrarient à ceux des travaux de Kalebra *et al.* (2013), montrant que l'huile essentielle de *P. graveolens* inhibe la croissance d'*Escherichia coli*, alors que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont résistantes à cette huile. Car, selon la figure 8, la croissance de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est plus inhibée que celle d'*Escherichia coli*.

D'une part, nos résultats concordent avec ceux de Ghannadi *et al.* (2012), montrant que *Staphylococcus aureus* est plus sensible à l'huile essentielle de *P. graveolens* qu'*Escherichia coli*. D'autre part ils ne se concordent pas avec les travaux de Ghannadi *et al.* (2012), indiquant que *Staphylococcus aureus* est plus sensible à l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* que *Pseudomonas aeruginosa*, car selon la figure 8, la différence entre l'effet de cette huile essentielle sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* n'est pas statistiquement significative (hypothèse vérifiée à l'aide du test ANOVA par le logiciel SPSS version 17).

Ce qui confirme une conclusion citée par Oussalah *et al.* en 2007, indiquant que chaque espèce microbienne réagit de façon particulière aux différents huiles essentielles, et certaines huiles ont des effets inhibiteurs spécifiques d'une bactérie (Oussalah *et al.*, 2007).

III. Composition chimique des huiles essentielles

1. Résultats d'analyse chimique

L'analyse de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, par la technique de chromatographie en phase gazeuse (CPG), nous a permis d'obtenir la figure 9, qui montre les différents pics des composants chimiques de cette huile essentielle.

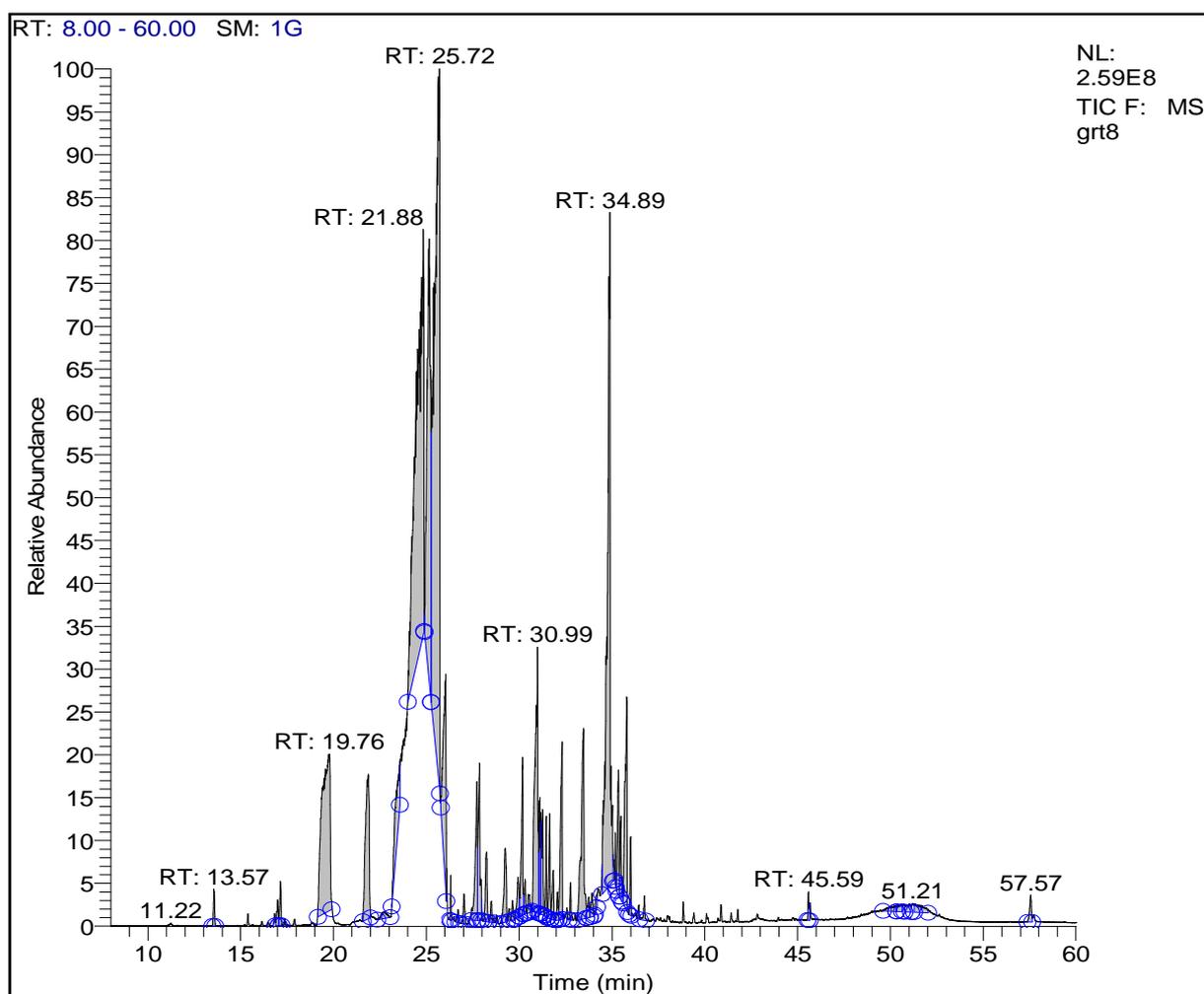


Figure 9 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*.

L'étude des résultats de l'analyse par Chromatographie gazeuse - Spectrométrie de masse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, nous a permis d'identifier 48 composés chimiques dans cette huile essentielle. Dont les composés majoritaires sont ordonnés dans le tableau 3, selon l'ordre de prédominance.

Le nombre des composés majoritaires, constituant l'huile essentielle, que nous avons extrait des feuilles de *Pelargonium graveolens*, est de dix composés chimiques différents,

constituant un pourcentage de 92,77 % de l'ensemble des composants de cette huile essentielle (tableau 3). Alors que le pourcentage de chacun des 38 composés chimiques restants, ne dépasse plus 0,37 % et ils peuvent être considérés comme des composés minoritaires et éléments en trace. Nos résultats concordent avec plusieurs travaux, où selon Belaiche (1979), le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable et d'après Pibiri (2006), à côté des composés majoritaires, on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces.

Tableau 3 : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*

Temps de Rétention (min)	Nom du composé	Pourcentage (%)
25,72	Citronellol	55,77
35,83	Geraniol	18,43
19,76	3-Carene	8,56
30,99	Isoledene	6,79
21,88	α -Pinene	3,22
33,46	α -Guaiene	2,46
30,2	3,3'-Dimenthol	2,03
32,32	Aristolene	1,52
31,65	Germanicol	0,74
31,46	Longifolene-(V4)	0,48
Somme des pourcentages (%) des composés		92,77 %

Le nombre des composés majoritaires, constituant l'huile essentielle, que nous avons extrait des feuilles de *Pelargonium graveolens*, est de dix composés chimiques différents, constituant un pourcentage de 92,77 % de l'ensemble des composants de cette huile essentielle (tableau 3). Alors que le pourcentage de chacun des 38 composés chimiques restants, ne dépasse plus 0,37 % et ils peuvent être considérés comme des composés minoritaires et éléments en trace. Nos résultats concordent avec plusieurs travaux, où selon

Belaiche (1979), le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable et d'après Pibiri (2006), à côté des composés majoritaires, on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces.

Selon le tableau 3, le Citronellol apparaît comme le constituant majoritaire de cette huile essentielle (55,77 %), suivi de Geraniol, (18,43 %), 3-Carene (8,56 %), de l'Isolédène (6,79 %). Trois autres composants ont des pourcentages moins élevés : 3,22 % pour α -Pinène 2,46 % pour α -Guaiène et 2,03 % pour 3,3'-Diméthol. Alors que le pourcentage d'Aristolène n'est que 1,52 %, celui de Germanicol est 0,74%. Longifolène-(V4) est le moins représenté parmi ces composants avec seulement un pourcentage de 0,48%.

2. Comparaison des résultats

Les composés chimiques les plus majoritaires de l'huile essentielle de *Pélargonium graveolens*, que nous avons extrait, sont proches de ceux trouvés dans les huiles essentielles en provenance de Rwanda et d'Algérie étudiées respectivement par Kalebra *et al.* (2013), Ntezurubanza *et al.* (2010) et Boukhatem *et al.* (2010) (tableau 4). Cependant, quantitativement, on constate une différence significative entre le pourcentage de chacun de ces deux constituants, avec les résultats obtenus par ces auteurs (tableau 4). En effet, l'huile essentielle de géranium en provenance de Rwanda est plus riche en geraniol 36,6% trouvé par Kalebra *et al.* (2013) et 53,3% trouvé par Ntezurubanza *et al.* (2010), que celle d'Algérie et du Maroc, dont les concentrations sont respectivement 5,42 % et 18,43%. La teneur en citronellol de l'essence *Pélargonium graveolens* est de 55,77% contre 16% et 11,6 % pour celle d'origine de Rwanda et 33,21 % pour celle d'origine Algérie

Tableau 4 : Comparaison des pourcentages (%) des composants les plus majoritaires de l'huile *Pélargonium graveolens* de notre étude avec celle d'autres chercheurs.

	Résultats de cette étude	Résultats d'autres chercheurs		
		Kalebra <i>et al.</i> , (2013)	Ntezurubanza <i>et al.</i> , (2010)	Boukhatem <i>et al.</i> , (2010)
Geraniol	18,43	36,6	53,3	5,42
Citronellol	55,77	16	11,6	33,21

Ces différences peuvent être expliquées par des différences des conditions de sol et de climat de la région, où nous avons récolté cette plante, par rapport à celles rencontrées dans

les autres pays. Confirmant ainsi les travaux de Loziene *et al.* (2004), citant que la provenance, les conditions climatiques et édaphiques, la période de récolte et la technique de séchage peuvent, avec le temps, modifier le profil chimique des huiles essentielles. Car la composition chimique dépend de tous ces facteurs qui peuvent orienter la biosynthèse en faveur de certaines molécules terpéniques au dépend d'autres constituants dont la synthèse peut être arrêtée (Rajeswara *et al.*, 1996 ; Boira *et al.*, 1997 ; Barnola *et al.*, 1999 ; Rajeswara *et al.*, 1993 ; Rajeswara *et al.*, 1994).

Conclusion et Perspectives

La comparaison de l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, que nous avons extrait, avec celui de plusieurs antibiotiques, nous a permis de déduire que cet effet varie en fonction des souches, où :

- ✓ Pour *Acinetobacter baumannii* : l'effet de cette huile essentielle dépasse largement celui des antibiotiques imipénème, kanamycine, oxacilline et sulpha ;
- ✓ Pour *Staphylococcus aureus* : cette huile essentielle a un effet semblable à celui de ceftizoxime et de cefaclor ;
- ✓ Pour *Pseudomonas aeruginosa* : qui est résistante à l'oxacilline, l'effet de cette huile essentielle est supérieur à celui de vancomycine ;
- ✓ Pour *Klebsiella pneumonia* : cette huile essentielle présente un effet inhibiteur, contrairement à la pénicilline pour lequel cette souche est résistante ;
- ✓ Pour *Escherichia coli* : l'effet inhibiteur cette huile essentielle est semblable à celui de ceftizoxime.

L'étude de la composition de l'huile essentielle de *Pélargonium graveolens* par la méthode de chromatographie phase gazeuse /spectrométrie de masse, nous a permis de déterminer les 48 constituants de cette huile, dont 10 sont majoritaires. Parmi lesquels, citronellol et géraniol sont prédominants avec un pourcentage de 74,2 %, ce qui représente une spécificité de cette huile, par rapport à d'autres travaux internationaux. L'effet antimicrobien de cette huile peut être due à l'action de ces composants.

Ces résultats sont prometteurs, et ouvrent de nouveaux horizons, pour l'exploitation de cette huile essentielle pour lutter contre les germes nosocomiaux.

Les travaux menés au cours de ces études ont aboutit à plusieurs résultats et ils ouvrent de nombreux axes de recherche, parmi lesquels on peut citer :

- ↪ Approfondir l'étude l'effet de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, sur ces cinq souches microbiennes, en déterminant si ces inhibitions constatées au cours de cette étude, sont elles dues à des activités bactéricides ou bactériostatiques de cette huile essentielle. A l'aide du réensemencement des échantillons prélevés de l'halo d'inhibition de chaque souche microbienne.
- ↪ L'étude la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, pour chaque souche microbienne. Par lecture des résultats d'incubation de ces bactéries en des dilutions de l'huile essentielle, avec des concentrations décroissantes.
- ↪ Tester l'effet de cette huile essentielle sur d'autres bactéries pathogène et très graves tels que *Salmonella typhi* ; *Legionella*.
- ↪ Tester l'effet de cette huile essentielle sur d'autres bactéries isolées du milieu hospitalier et représentant une résistance très élevée aux antibiotiques.
- ↪ Tester l'effet de cette huile essentielle sur d'autres groupes de microorganismes représentant des risques sanitaires comme les levures et les champignons microscopiques.
- ↪ Etude des modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, contre ces germes.
- ↪ Etude de l'effet antioxydant de cette huile essentielle.

Références bibliographiques

- Adams RP., 2001.** Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. Carol Stream, Allured, IL.
- AFNOR, 1986.** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- AFNOR, 2000.** Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- Allen DM, Hartman BJ., 2000.** Acinetobacter species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R Ed. Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th Edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000: 2339-44.
- Anton R. & Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522p.
- Arpino P., Prévôt A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Witier P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Masson, Paris, 1995.
- Ascensao L., Marques, N. and pais M. S., 1995.** Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *leonotis leonurus* (Lamiaceae).
- Azevedo N. R., Campos L.F.P., Ferreira H. D., Portes T. S. A., Santos S. C., Seraphin J. c., Paula J. R. and Ferri P. H., 2001.** Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry* 57.733-736.
- Baba-Moussa F., Koumaglo K., Ayedoun A., Akpagana K., Moudachirou M., Bouchet P., 1997.** Antifungal activity of essential oils extracted in the African states of Togo and Benin. *Cryptogamie, Mycologie* 165-168.
- Banchio E., Valladares G., Zygadlo J., Bogino P.C., Rinaudi L. V. and Giordano W., 2007.** Changes in composition of essential oils and volatile emissions of *Minthostachys mollis*, induced by leaf punctures of *Liriomyza huidobrensis*. *Biochem. Syst. Ecol*, 35, -68-74.
- Banthorpe D.V., 1994.** Terpenoids. In Mann J., Davidson R.S., Hobbs J., Banthorpe D., Harborne J. *Natural Products: Their chemistry and biological significance*. Longman Scientific and Technical, England, pp 289-359.
- Barnola L.F. and Cedeno A., 1999,** *Inter-population differences in the essential oils of Pinus caribaea needles*. *Biochem. and systematics ecology*, 28, 923-931.
- Barrata T., Dorman D., Deans S., Figueiredo C., Barroso J. & Ruberto G., 1998.** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*.13, p:235-244.
- Belaiche P., 1979.** L'aromatogramme. *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. M.S.A. Editeur, Paris. Tome 1, p: 204.

- BENDJILALI. B- TANTAOUI. E- AYADE. A ., 1986.** Méthodes d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. Plantes médicinales et phytothérapie .Tome 20 n°2 pp 155-167
- Bergey's Manuel of determinative Bacteriology.1984.** 9eme edition.Williams and Wilkins.Baltimore
- Bernard T., Periau F., Brav O., Delmas M. & Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles. Chimie et Technologie. Information chimie, 298 : 179-184.
- Bicchi C., Frattini C., Raverdino V., 1987.** Considerations and remarks on the analysis of *Anthemis nobilis* L. essential oil by capillary gas chromatography and "hyphenated" techniques, *J. Chromatogr.*, 411, 237-249.
- Boelens M.H., Valverde F., Sequeiros L. & Jimenez R., 1990.** Ten years of hydrodistillation of oils. *Perfumer and Flavorist*, 15 : 11-14.
- Boira H. and Blanquer A. 1998.** Environmental factors affecting chemical variability of essential oil in *Thymus piperella* L. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 8116-822.
- Boira H. and Blanquer A., 1997,** *Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in Thymus piperella L.* *Biochem. Systematics and Ecology*, 26, 811-822.
- Boukhatem Mohamed Najib, Hamidi Mohamed Said, Saidi Fairouz, Hakim Yahya, 2010.** Extraction ,composition et propriete physic chimique de l'huile essentielle du Géranium Rosat(*Pelargonium graveolens*L.) cultivé dans la plaine de Mitidja(Algerie)revue « Nature et Technologie » n°03 :juin 2010 page 37à 45
- Bradesi P., 1995.** Apport de la RMN du carbone-13 à l'analyse des mélanges naturels dans le domaine de l'agroalimentaire : huiles essentielles et autres productions végétales, Thèse de doctorat de l'Université de Corse.
- Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J., 1996 a.** L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13 – Partie 1., *Can. J. Appl. Spectrosc.*, 41(1), 15-24.
- Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J., 1996 b.** L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13 – Partie 2., *Can. J. Appl. Spectrosc.*, 1996, 41(2), 41-50.
- Bradesi P., Tomi F., Casanova J., 1994.** Identification of dihydrocarveol stereoisomers and their acetates using carbon-13 NMR spectroscopy, *Spectroscopy Letters*, 27, 921-933
- Brisou ,J.F.& F.A.Denis.1978.** Hygiène de l'environnement maritime. 197p. Edition Masson. Paris.
- Carette A.S., 2000.** La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. p :100.
- Casas L., Mantell C., Rodríguez M. M., Torres A., Macías F.A. & Martínez D.L.O.E. ,2007.** Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *Journal of Supercritical Fluids*, 41: 43-49.

- Cassisi, N., Cohn, A., Davidson, T. et Witten, B.R., 1977.** «Diffuse otitis externa: Clinical and microbiologic findings in the course of a multicenter study on a new otic solution». *Ann. Otol. Rehnol. Laryngol.* 86:1.
- Ciccarelli D., Garbari F. and Pagni A. M., 2008.** The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae) : secretory structures, unicellulair papillae, and their ecological role. *Flora* 203,85-93.
- Coleman II W.M., Gordon B.M., Lawrence B.M., 1989.** Examinations of the matrix isolation fourier transform infrared spectra of organic compounds: part XII, *Applied Spectroscopy*, 43(2), 298-304.
- Coleman III W.M., Gordon B.M., 1991.** Gas chromatography-matrix isolation-Fourier transform-infrared spectrometry of natural products, *J. Chromatogr. Sci.*, 29(9), 371-376.
- Collins, C.H, Lyne, P.M & JM.Grange.1991.** Collins and Lyne's microbiological methods. Sixth edition. Butterworths. London Boston Singapore Sydney. Toronto. Wellington.
- Constantin E., 1996. Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris, 1996, 1-14.**
- D. L. O. E., 2007.** Effect of the addition of cosolvent on the supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L. *Journal of Supercritical Fluids*, 41 : 43-49.
- De Feo V., De Simone F. and Snatore F., 2002.** Potential allelochemicals from the essential oils of *Rutagraveolens*. *phytochemistry* 61,573-578.
- De Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., 1999.** Spectrométrie de Masse, 2 e édition, Librairie Dunod, Paris, 1999.
- DEMARNE FE, 1985.** « Le géranium rosat ». *Parfums, Cosmétiques et Arômes*, n°62, 1985.
- Deroin T., 1988.** Biologie florale d'une Annonaceae introduite en Côte D'Ivoire : *Cananga* diagnosis and epidemiology of fungal infections. 36 (1), p: 249-257.
- Desmares C., Laurent A. and Delerme C., 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Cedex : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, pp.12.
- Evans, J.B., 1977.** «Coagulase-positive staphylococci as indicators of potential health hazards from water». *Am. Soc. Test. Mater. Spec. Tech. Publ.* 635: 126-130.
- Fantino N.S., 1990.** Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia* Mill.)- Détermination de critères précoces de sélection. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle.p :41-45.
- Ferrer B. S. d., 1998.** Composition of denezuelan lemon essential oil *Citrus limon* (L.) Burm. f. *Rev. Fac. Argon (LUZ)*. 15. 343-349.
- Figuerido A. C., Barroso J. G., Pedro L. G. and Scheffer J. J. C, 2008.** Factors affecting secondary metabolite production in plants; volatile components and essential oils *Flavour Fragr.J.*23,213-226.

- Formáček V., Kubeczka K.H., 1982.** Essential oils analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy, Ed. John Wiley & Sons, Chichester.
- Gerbach P. V., 2002.** The essential oil secretory structures (Lamiaceae).Ann. Bot. 89, 255-60.
- Ghannadi A, Bagherinejad MR, Abedi D., Jalali M. , Absalan B., Sadeghi N., 2012.** Antibacterial activity and composition of essential oils from Pelargonium graveolens L'Her and Vitex agnus-castus L. iranian microbiology journal Volume 4 Number 4 (December 2012) 171-176.
- Guenther, Ernest, 1948.** The essential oils, Volume I: History-Origin in plants production-Analysis : © Litton Educational Publishing, INC; 1948, 427 pages.
- Guignard J. L. & Cosson L., Henry L., 1985.** Abrégé de phytochimie. Masson, Paris, 224 p.
- Haddouchi Farah, Hamadi Abderrahmane Lazouni, Abdelkader, MEZIANE et Abdelhafid Benmansour, 2009.** Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de Thymus fontanesii Boiss & Reut. Afrique SCIENCE 05(2) (2009) 246 - 259 ISSN 1813-548X.
- Huang H. S.,Chang L. H., Jong T. T., Nien Y. F.& Chang C. M. J.,1995.** Supercritical carbon dioxide extraction of turmetic oil from Curcuma longa Linn. ,and purification of turmerones. Separation and Purification Technology. 47, p:119-125
- Isman M. B., 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. Crop Prot.19, 603-608.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L., 2006.** The Genera Klebsiella and Raoultella. The interobacteria (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.
- Kalebra Justin, Mugiraneza Jean Pierre, Chalchat Jean Claude, Ugirinshuti Viateur, 2013.** Journal of Microbiology Research 2013, 3(2): 87-91 DOI: 10.5923/ j. microbiology. 20130302.05. Chemical Composition and Antimicrobial Effect of the Essential Oil of Pelargonium graveolens (Geranium Rosat) Grown in Butare (Rwanda) Towards Formulation of Plant-based Antibiotics.
- Kalachanis D. and Psaras G. K., 2005.** Structure and developpement of the secretory cavities of Myrtus Communis leaves Biol.Plantarum 49, 105-110.
- Kazazi H., Rezaei K., Ghotb-Sharif S.J., Emam-Djomeh Z. & Yamini Y., 2007.** Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from Hyssopus officinalis L. cultivated in Iran. Journal of Food Chemistry, 105 (2): 805-811.
- Kesselmeier J. & Staudt M., 1999.** Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. Journal of Atmospheric Chemistry, 33 : 23-88.
- Koedam A., 1982.** The influence of some distillation conditions on essential oil composition in aromatics plants: basic and applied aspects. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands, 229-236.

- Kubeczka K.H., Schultze W., Formáček V., Herres W., 1988.** New developments in essential oils analysis by Fourier-Transform spectroscopy, 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours, Washington, 16-20 Nov., 1986, Proceedings, Ed. Elsevier Science, 1988, 931-950.
- Kush, B.J. et Hoadley, A.W., 1980.** «A preliminary survey of the association of *Pseudomonas aeruginosa* with commercial whirlpool bath waters». Am. J. Public Health 70:279.
- Longevialle P., 1981.** Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris. p:32-35.
- Loziene K. and Venskutonis P.R., 2004.** *Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of Thymus pulegioides.* Biochemical systematics and ecology, **33**, 517-525.
- Luque de Castro M. D., Jiménez C. M. M. & Fernández P., 1999.** Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. Trends in Analytical Chemistry, 18 (11): 708-716.
- Madhavi D. L., Deshpande S. S. & Salunkhe D. K., 1996.** Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. P: 65
- Maihebiau P., 1994.** La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. P: 635.
- Mann J., 1987.** Secondary metabolism. Clarendon Press, Oxford, 374 p.
- Marriott P., Shellie R., Cornwell C., 2001.** Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, J. Chromatogr. A, 936, 1-22.
- Marriott P., Shellie R., Fergeus J., Ong R., Morrison P., 2000.** High resolution essential oil analysis by using comprehensive gas chromatographic methodology, Flavour Fragr. J., 15, 225-239.
- Mazen K.E.T., 2002.** Molecular regulation of plant monoterpenes biosynthesis in relation to fragrance. Thesis, Proefschrift Wageningen, University, Netherland, 206 p.
- McLafferty F.W., Tureček F., 1993.** Interpretation of mass spectra, Fourth edition, University Science Books, Sausalito, California, 1993.
- Menaker A., Kravets M., Koel M. & Orav A., 2004.** Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs. C. R. Chimie, 7 : 629-633.
- MENGHINDI .A. – LOUINIA –CAPRIO.A ., 1987.** Activité anti microbienne en contact direct et en microatmosphère de certaines huiles essentielles. Plantes médicinales et phytothérapie Tome 21 n° 1 pp 36-42.
- Mharti Fatim Zohra, 2009.** Valorisation des huiles essentielles de *Lavandula dentata* et *Lavandula stoechas* du haut atlas (Maroc). Mémoire de fin d'étude MASTER, P : 57. Faculté des Sciences Dhar El Mehraz, Fès.

- Moe, C.L., 1997.** Waterborne transmission of infectious agents. Dans : Manual of environmental microbiology. Sous la direction de C.J. Hurst, G.R. Knudsen, M.J. McInerney, L.D. Stetzenbach et M.V. Walter. ASM Press, Washington, DC.
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., Roura, S.I., 2005** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT. 38: 565-570.
- Multon J. L., 1982.** Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique & Documentation, Paris Apria. Volume 1, 576 p.
- Nguemtchouin Mbouga Marie Goletti, 2012.** Formulation d'insecticides en poudre par adsorption des huiles essentielles de *Xylopiya Aethiopica* et de *Ocimum Gratissimum* sur des argiles camerounaises modifiées. Thèse de Doctorat en Cotutelle, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier et École Nationale Supérieure des Sciences Agroindustrielles de l'Université de Ngaoundere.
- Ntezurubanza L., 2000.** Essential oils of Rwanda, LASEVE, University of Québec, Chicoutimi, Canada, pp 247.
- Nishida N., Tarnotsu S., Nagata N., Saito C., and Sakai A., 2005.** Allelopathie effects of volatile monoterpenoids produced by salvia leucophylla: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of brassica campestris seedlings. J.Chem.Ecol.31,1187-1203
- Orav A., Raal A., Arak E., Mùurisep M., and Kailas T., 2006.** Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* L. of different geographical origin. Proc. Estonian Acad. Sci. Chem. 55, 155-165.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. et Lacroix M., 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 18 (5), 414-420.
- Paris R. & Godon M., 1979.** Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.
- Pibiri M. C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p : 177.
- Pradeau D. & Cohen Y., 1992.** L'analyse pratique du médicament, Ed. médicales internationales. P : 418-428
- Rajeswara Rao B.R., Bhattacharya A. K., Kaul P.N., Chand S. and Ramesh S., 1993.** *Changing in profiles of essential oil rose scented geranium (Pelargonium sp.) during leaf ontogeny.* Journal of Essential Oil Researc., 5, 301-304.
- Rajeswara Rao B.R., Kaul P.N, Mallavarapu G.R., and Ramesh S., 1996.** *Effect of seasonal climatic changes on biomass yield and terpenoid composition of rosescented geranium.* Biochemical systematics and ecology, 24, 627-635.

- Rajeswara Rao B.R., Sastry K.P., Prakasa Rao E.V.S., and Ramesh S.,(1994),** *Variation in yield and quality of geranium (Pelargonium graveolens) under varied climatic and fertility conditions.* Journal of Essential Oil Research, **2**, 73-79.
- Rajeswara Rao Br., 2002.** « Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (Pelargonium species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (Mentha arvensis L.f. piperascens Malinv. ex Holmes) ». Industrial Crops and Products **16**, 133–144.
- Richard F., 1992.** Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec. & Doc., p : 1228-1242.
- Ristorcelli D., Tomi F., Casanova J., 1998.** 13C-NMR as a tool for identification and enantiomeric differentiation of major terpenes exemplified by the essential oil of Lavandula stoechas L. ssp. stoechas, Flavour Fragr. J., **13**, 154-158.
- Rodolfo J, Koroch A, Simon J, Hitimana N., 2006.** « Quality of geranium oils: case studies in southern and eastern Africa ». Journal of essential oil research (JEOR), Sept-Oct 2006.
- Rodriguez G. O. D., Godoy V. M. D., Colmenares N.G.D., Salas L.C. and Richard F., 1992.** Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec. & Doc., p : 1228-1242.
- Sandra, P.; Bicchi, C., 1987.** Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis i © Dr Alfred Huethig Verlag Heidelberg ; Basel ; New York ; 1987, 435 pages.
- Sebai Mohamed et Boudali Mohamed, 2012.** La phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel infirmier de la sante publique, Institut de Formation Paramédical CHETTIA, Algérie. 56p.
- Seyfried, P.L., 1973.** The Examination of Recreational Waters for the Incidence
- Skoog D. A., Holler F. J. & Nieman T. A., 2003.** Principes d'analyse instrumentale. 1 Ere édition, Ed. De Boeck Université, p: 945.
- Tomi F, Casanova J., 2000.** Contribution de la RMN du carbone-13 à l'analyse des huiles essentielles, Annales Fals. Expertise Chim., **93**, 313-330.
- Tomi F., Bighelli A., Casanova J., 1993.** Carbon-13 chemical shift assignment of b-cedrene and some derivatives, Spectroscopy Letters, **26**, 1661-1671.
- Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J., 1995.** Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy, J. Magn. Reson. Anal., **1**, 25-34.
- Tranchant J., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson. Paris.
- Turner G., Gershenzon J., Nielson E. E., Frochlich J.E., Croteau R., 1999.** Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpenes biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. Plant physiol. **120**, 879-886.
- Valnet M., 2005.** Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth International. Journal of Food Microbiology.**85**, p: 73-81.

- Wilson, L.A. et Ahearn, D.G., 1977.** «*Pseudomonas* induced corneal ulcers associated with contaminated eye mascara». Am. J. Ophthalmol. 84:112.
- Winkler F.J., Gulaçar F.O., Mermoud F., Bushs A., 1983.** Temperature dependence of the isobutane chemical ionization of open-chain and cyclic alcohols; structural, stereochemical and molecular-size effects. A reevaluation of the chemical ionization of alcohols, Helv. Chim. Acta, 66, 929-941.
- Winkler F.J., Gulaçar F.O., Mermoud F., Bushs A., 1984.** Ammoniac chemical ionization mass spectrometry of alcohols; structural, stereochemical, molecular-size and temperature effects, Helv. Chim. Acta, 67, 488-501.
- Zizovic L., Staminie M., Orlovié A. and Skala D., 2007.** Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts; Matimatical modeling on the micro-scale. J. Supercrit. Fluids39, 338-346.