



Université Sidi Mohammed Ben Abdellah  
Faculté des Sciences et Techniques  
[www.fst-usmba.ac.ma](http://www.fst-usmba.ac.ma)



**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

## **Titre**

Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles et fleurs de  
deux plantes aromatiques : la sauge et la lavande

**Présenté par :**

**Laraqui Fatim-Zahra**

**Encadré par :**

**Pr. ALILOU El Houssine**

**Soutenu Le 16 Juin 2016 devant le jury composé de :**

- Pr. OUAZZANI CHAHDI Fouad
- Pr. ALILOU El Houssine
- Pr. MELIANI Abdeslam
- Pr. MOUGHAMIR Khadija

**Stage effectué au : laboratoire de Chimie Organique Appliquée (LCOA) de la  
Faculté des Sciences et Techniques de Fès**

**Année Universitaire : 2015/2016**



## Résumé

La sauge officinale et la lavande stéchade sont des plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiacées, elles sont des plus anciennes plantes médicinales. En premier lieu nous avons extrait l'huile essentielle des deux plantes par l'hydordistillation à l'aide de l'appareil Clevenger.

On a calculé le taux d'humidité et le rendement de chaque plante : les feuilles de la sauge officinale de la région de Fès et de Taounate, les fleurs de la sauge officinale de la région de Fès ainsi que celui des feuilles de la lavande stéchade. Les rendements sont respectivement : 1.73%, 1.8%, 11.65% et 2.02%.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur les souches bactériennes *E. Coli* et *S. Aureus*. Les Diamètres d'inhibition illustrant l'activité antibactérienne des huiles essentielles se sont montrés importants sur les deux souches.

**Mots clés : sauge officinale, lavande stéchade, huile essentielle, activité antibactérienne.**



# Dédicace

**Je dédie ce rapport aux institutions les plus formatrices de ma vie :**

***A mes chers parents***

Rien au monde ne pourra vous exprimer mon amour, mon respect et ma reconnaissance pour la tendresse et les grands efforts et sacrifices que vous avez fait pour moi et pendant toute ma vie. Ma plus grande fierté est d'être votre fille.

***A mes sœurs***

Malgré nos différences, je tiens à exprimer que rien ne pourra jamais compenser votre amour et votre place dans mon cœur. Votre soutien est une dette que je ne pourrai jamais payer.

***A mon amie Kenza***

Merci d'être toujours là, malgré la distance qui nous sépare

***A mes cousines Khawla, Mouna et Fadwa***

Sachez que vous êtes très chères à mon cœur et merci d'être présentes dans ma vie.

***A toute ma famille ainsi que mes amis***



# Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Dieu de m'avoir donné la volonté pour réaliser ce travail.

La réalisation de ce projet a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier dans un premier temps *Monsieur OUAZZANI CHAHDI Fouad*, responsable du Master Chimie des Molécules Bio Actives, ainsi que toute l'équipe pédagogique du département chimique.

Je tiens à remercier mon encadrant *Mr le professeur ALILOU El Houssine* pour l'aide et les conseils concernant les missions évoquées dans ce rapport, qu'il m'a apporté lors des différents suivis, et pour son orientation, sa disponibilité tout au long de la période de stage et durant la préparation à la soutenance.

Je remercie *Mr le professeur FARAH Abdellah* pour sa disponibilité, ses informations et son aide durant toute la période de stage.

Mes remerciements s'adressent aussi à *Mr le professeur OUAZZANI CHAHDI Fouad*, *Mr le professeur MELIANI Abdeslam* et à *Mme le professeur MOUGHAMIR Khadija*, qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'être membres du jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères reconnaissances.

Je remercie également *Mlle le professeur FIKRI BENBRAHIM Kawtar* et *Mme CHRAIBI Marwa* du laboratoire de biotechnologie microbienne de m'avoir aidé à réaliser les tests biologiques.

Je remercie l'équipe du laboratoire de Chimie Organique Appliquée qui m'a vraiment très bien accueillie durant cette période. Elle a toujours été présente lorsque je rencontrais des problèmes, et toujours prête à répondre à mes questions.

Je remercie mes parents qui ont veillé à mon confort et qui m'ont toujours motivé et aidé.



## Liste des abréviations

<b>CMI</b>	: Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CPG</b>	: Chromatographie en Phase Gazeuse
<b>DMAPP</b>	: Diméthylallyl PyroPhosphate
<b>FID</b>	: Détecteurs à Ionisation de Flamme
<b>GGPP</b>	: GéranylGéranyl PyroPhosphate
<b>GPP</b>	: Géranyl PyroPhosphate
<b>H.E</b>	: Huile Essentielle
<b>IPP</b>	: L'Isoprenyl PyroPhosphate
<b>O.M.S</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>SM</b>	: Spectrométrie de Masse
<b>Tr</b>	: Trace



# Table de matières

Résumé .....	2
Remerciements .....	4
Liste des abréviations .....	5
Table de matières .....	6
Liste des tableaux .....	10
Liste des photos .....	10
Introduction .....	11
Partie I : Revue bibliographique .....	12
1. Plantes médicinales étudiées.....	13
1.1. La sauge officinale : <i>Salvia officinalis</i> .....	13
1.1.1. Classification .....	13
1.1.2. Description.....	13
1.1.3. Pays d'origine .....	15
1.1.4. Principales régions de culture .....	15
1.1.5. Odeur et saveur .....	15
1.1.6. Préparations et usages.....	15
1.1.7. Composition de l'huile essentielle de la sauge officinale.....	16
1.2. La lavande stéchede : <i>lavandula stoechas</i> .....	16
1.2.1. Classification .....	16
1.2.2. Description.....	17
1.2.3. Pays d'origine .....	18
1.2.4. Principales régions de culture .....	18
1.2.5. Odeur .....	18



1.2.6. Préparations et usages .....	18
1.2.7. Composition de l'huile essentielle de la lavande stéchade .....	19
2. Les huiles essentielles .....	19
2.1. Définition .....	19
2.2. Histoire de leur utilisation .....	20
2.3. Localisation des huiles essentielles .....	20
2.4. Rôle des huiles essentielles pour le règne végétal .....	21
2.5. Facteurs de variabilité des huiles essentielles .....	22
2.5.1. Origine botanique .....	23
2.5.2. L'organe producteur .....	24
2.5.3. Origine géographique .....	24
2.5.4. Conservation des plantes .....	24
2.6. De la plante à l'huile essentielle.....	24
2.6.1. Extraction par distillation.....	25
2.6.2. Hydrodiffusion.....	26
2.6.3. Extraction au CO <sub>2</sub> supercritique .....	27
2.6.4. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes .....	27
2.6.5. Enfleurage.....	28
2.6.6. Macération .....	29
2.7. Technique d'analyse de l'huile essentielle.....	29
2.7.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	29
2.7.2. Couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM).....	30
2.8. Composition chimique des huiles essentielles .....	30
2.8.1. Origine biogénique des huiles essentielles .....	30
2.9. Propriétés des huiles essentielles .....	37
2.9.1. Propriétés antimicrobiennes.....	37



2.9.2. Propriétés antioxydantes .....	37
2.9.3. Propriétés insecticides.....	38
2.9.4. Autres Activités .....	38
2.10. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne .....	38
2.10.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque).....	38
2.10.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution) .....	40
2.11. Utilisation des huiles essentielles .....	40
Partie II : Résultats et discussion .....	41
1. Matériel biologique.....	42
1.1. Matériel végétal.....	42
1.2. Matériel microbiologique.....	42
2. Méthode d'extraction .....	42
2.1. Calcul de l'humidité (H%).....	44
2.2. Calcul du rendement de l'huile essentielle (Rdt%).....	44
3. Activité antibactérienne .....	44
3.1. Repiquage de la bactérie .....	45
3.2. Préparation de l'inoculum .....	45
3.3. Préparation des disques .....	45
3.4. Application du test .....	46
4. Résultats de l'extraction (l'hydrodistillation) .....	46
4.1. Taux d'humidité .....	46
4.2. Rendement.....	47
5. Résultats du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle.....	48
Conclusion .....	51
Références .....	52



# Liste de figures

Figure 1 : Structure chimique des constituants majoritaires de l'H.E de la sauge officinale .....	16
Figure 2 : Structure chimique des constituants majoritaires de l'H.E de la lavande stéchade .....	19
Figure 3 : Provenance des huiles essentielles en fonction des différentes parties de plantes.....	21
Figure 4 : Montage Clevenger .....	25
Figure 5 : Montage d'extraction des H.E par l'entraînement à la vapeur d'eau.....	26
Figure 6 : Schéma explicatif de l'hydrodiffusion .....	26
Figure 7 : Schéma de principe d'extraction par CO <sub>2</sub> supercritique .....	27
Figure 8 : Montage de l'extraction par micro-ondes .....	28
Figure 9 : Schéma de la biosynthèse des terpènes.....	31
Figure 10 : Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des H.E. ....	32
Figure 11 : Structure chimique de quelques sesquiterpènes extraits des H.E. ....	32
Figure 12 : Structure chimique de quelques composés aromatiques extraits des H.E. ....	34
Figure 13 : Familles des flavonoïdes.....	35
Figure 14 : Structure d'autres types de flavonoïdes. ....	36
Figure 15 : Flavonols prédominant dans les feuillages des plantes vasculaires.....	36
Figure 16 : Méthode de la diffusion en disque. ....	39
Figure 17 : Méthode de stries des bactéries.....	45
Figure 18 : Teneur en eau des trois plantes. ....	46



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition de l'huile essentielle de la S. officinale dans différents pays .....	22
Tableau 2 : Composition de l'huile essentielle de la L.stechade dans différents pays.....	23
Tableau 3 : Quantité de la matière végétale fraîche hydrodistillée. ....	43
Tableau 4 : Taux d'humidité des trois plantes.....	47
Tableau 5 : Les rendements des H.E obtenus par l'hydrodistillation.....	47
Tableau 6 : les rendements des H.E de la sauge officinale des régions différents .....	48
Tableau 7 : les rendements des H.E de la lavande stéchade des régions différents .....	48
Tableau 8 : Diamètres d'inhibition (mm) illustrant l'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	49

## Liste des photos

Photo 1 : la sauge officinale .....	13
Photo 2 : La feuille de la sauge officinale .....	14
Photo 3 : la fleur de la sauge officinale .....	14
Photo 4 : La lavande stéchade .....	17
Photo 5 : L'appareillage de l'hydrodistillation.....	43
Photo 6 : L'appareil Clevenger.....	43
Photo 7 : Essai de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des quatre échantillons sur Escherichia Coli.....	48
Photo 8 : Essai de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des quatre échantillons sur Staphylocoque Aureus.....	49



# Introduction

Depuis la plus haute antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Qu'est-ce qui les a guidés à employer une plante plutôt qu'une autre ? Le hasard ? La religion ? La superstition ? L'expérience, certainement <sup>[1]</sup>.

L'être humain recherche dans son environnement de quoi soulager ses maux et traiter ses blessures. La médecine moderne occidentale a rejeté la plupart de ces recours pour développer des médicaments chimiques et une technique de soins sophistiquée. Elle continue cependant d'utiliser certains remèdes à base des plantes médicinales. Une tendance récente conduit même à rechercher dans les plantes de nouveaux produits de substitution pour certaines maladies : cancer, paludisme... Plus de 200 000 espèces végétales sur les 300 000 recensées de nos jours sur l'ensemble de notre planète vivent dans les pays tropicaux d'Afrique.

L'histoire de la médecine traditionnelle montre l'importance de ces espèces dans les thérapies, toutes les sociétés traditionnelles ayant puisé, pour leurs soins de santé, dans cette pharmacopée végétale d'une très grande richesse <sup>[2,3]</sup>.

De nos jours de nombreux travaux consacrés à la chimie et à la toxicologie des plantes aromatiques et médicinales ont contribué à améliorer la connaissance scientifique dans ce domaine et à l'élaboration de protocoles standards de phytochimie et de screening biologique.

Ces derniers ont tenu une place prépondérante dans l'art de guérir. Selon les cultures et les époques, elles ont été exploitées sous différentes formes, de diverses manières et pour les usages les plus variés <sup>[4]</sup>. Les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît, aussi à cause du coût élevé des produits pharmaceutiques de synthèse, la plupart des populations mondiales ne sont pas en mesure de s'offrir les soins de santé modernes, et c'est pourquoi elles se tournent vers la médecine populaire et les plantes médicinales, ou simples, pour se soigner <sup>[1,5-8]</sup>.

Le Maroc, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y poussent spontanément <sup>[9]</sup>. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits aromatiques obtenus par différentes méthodes d'extraction à partir de deux plantes aromatiques : *Salvia officinalis* et *Lavandula stoechas*.



# Partie I : Revue bibliographique



## 1. Plantes médicinales étudiées

### 1.1. La sauge officinale : *Salvia officinalis*

Le nom scientifique de la sauge indique clairement l'importance de son rôle en phytothérapie : *Salvia* vient de *salvare* qui, en latin, signifie «guérir». Un dicton médiéval n'affirmait-il pas : «Pour quelle raison un homme devrait-il mourir alors que la sauge pousse dans son jardin ? »<sup>[1]</sup>.

#### 1.1.1. Classification

- Règne : plante
- Embranchement : spermaphytes
- Sous embranchement : angiospermes
- Classe : dicotylédones Ordre : tubiflorales
- Famille : labiées ou lamiacée
- Genre : *Salvia*
- Espèce : *Salvia officinalis*

- Noms communs : Sage officinale, herbe sacrée, thé d'Europe, nom vernaculaire en arabe « salmiya »

#### 1.1.2. Description

Sous-arbrisseau buissonnant et persistant, formant une touffe ligneuse pouvant atteindre jusqu'à 80 cm de haut et dont les tiges émettent de nombreux rameaux dressés, quadrangulaires et laineux, présentant des nœuds saillants sur lesquels sont insérées les feuilles<sup>[10]</sup> (photo 1).



*Photo 1 : la sauge officinale*



Celles-ci sont ovales, de 3 à 10 cm de long et 3 cm de large, elles sont de la couleur vert grisâtre et l'aspect velouté par la présence d'un revêtement laineux visible sur les deux faces <sup>[10]</sup> (Photo 2).



*Photo 2 : La feuille de la sauge officinale*

Les fleurs sont regroupées par 4 à 12 en une inflorescence située à l'extrémité des rameaux, leurs pétales sont de couleur violet clair, parfois rose ou plus ou moins blanchâtre <sup>[10]</sup> (photo 3).



*Photo 3 : la fleur de la sauge officinale*



### 1.1.3. Pays d'origine

L'espèce est naturalisée dans le nord et le centre de l'Espagne, dans le sud de la France, à l'ouest des Balkans, en Europe centrale et méridionale ainsi qu'au Proche-Orient <sup>[10]</sup>.

### 1.1.4. Principales régions de culture

Originaire des pourtours de la Méditerranée, la sauge affectionne les lieux ensoleillés. On la cultive par semis au printemps. Les plantes sont remplacées tous les 3 ou 4 ans et les feuilles sont récoltées en été <sup>[1]</sup>.

### 1.1.5. Odeur et saveur

La sauge a une odeur forte, aromatique et balsamique ; sa saveur est chaude, aromatique, légèrement amère et brûlante, camphrée et astringente.

### 1.1.6. Préparations et usages

- ✓ Infusion à partir des feuilles utilisées en gargarisme jusqu'à 3 fois par jour en cas de coup de froid, toux et rhumatisme <sup>[9]</sup>.
- ✓ Elle réduit la transpiration lorsqu'elle est prise sous forme de thé, l'action commence environ deux heures après avoir bu le thé et peut durer plusieurs jours <sup>[11]</sup>...
- ✓ Indigestion : la sauge officinale a une certaine valeur dans le soulagement de l'indigestion avec du gaz ou la douleur spasmodique <sup>[12]</sup>.
- ✓ Soins de la peau : pour les grands pores, la sauge peut être utile comme compresse ou infusion. Elle peut être utilisée pour effet similaire à un masque. Une crème à base de sauge peut être utilisée pour les boutons de fièvre près de l'embouchure <sup>[13]</sup>.
- ✓ Baignade et lavage : elle est également utilisée dans des bains pour traiter les problèmes de peau <sup>[14]</sup>. D'autres études citent les propriétés suivantes : cicatrisante, antiseptique, tonifiante, antirhumatisme dans des bains, pour les plaies atones, des plaies, les ulcères, les dermatoses (eczéma) <sup>[15,16]</sup>.

### 1.1.7. Composition de l'huile essentielle de la sauge officinale

Les principales molécules contenues dans l'huile essentielle, qui donnent à la sauge son odeur typique, sont les thuyones ( $\alpha$ -thuyone 18-43% et  $\beta$ -thuyone 3-8,5%), qui peuvent représenter jusqu'au 50% de la composition chimique de l'huile essentielle <sup>[17]</sup>, et le camphre (4,5-24,5%).

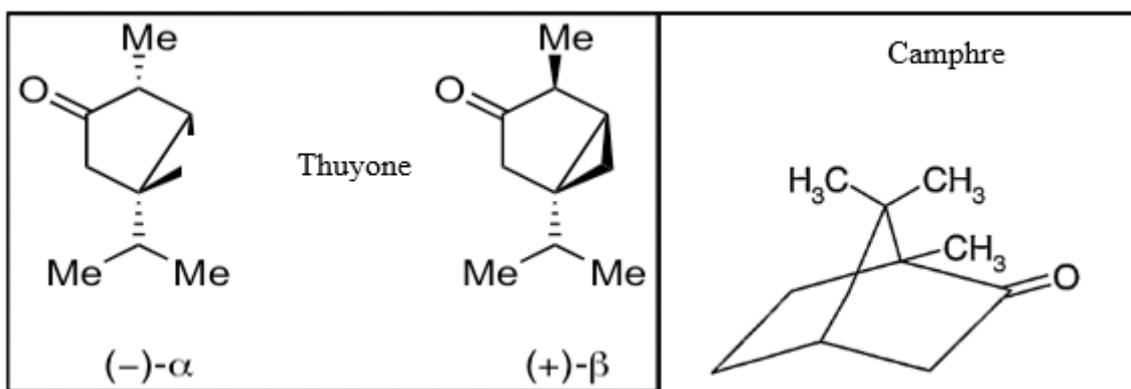


Figure 1 : Structure chimique des constituants majoritaires de l'H.E de la sauge officinale

### 1.2. La lavande stéchnade : *lavandula stoechas*

La lavande est une plante aux propriétés apaisantes, plus réputée pour son parfum délicat que pour ses vertus thérapeutiques. D'origine française, elle est très ancienne et son huile essentielle est plus pure que celle des espèces voisines (*Lavandula spica*, *Lavandula angustifolia*, *lavandula officinalis*) <sup>[1]</sup>.

#### 1.2.1. Classification

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



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

### 1.2.2. Description

La lavande stéchade fait partie également de la famille des Lamiacées ou Labiées. Elle possède donc les mêmes caractéristiques morphologiques caractéristiques et communes à l'ensemble de cette famille. Le genre *lavandula* présente les caractères suivants :

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



*Photo 4 : La lavande stéchade*



### 1.2.3. Pays d'origine

Les lavandes poussent dans quelques pays du bassin méditerranéen, îles Canaries, Afrique du nord, Inde, Asie du sud-est.

### 1.2.4. Principales régions de culture

La lavande stéchade se développe sur tout le pourtour méditerranéen, notamment en Andalousie et dans la partie sud du Portugal.

La culture débute, en mars, par la plantation de jeunes plantes produites en pépinières situées en altitude ou de jeunes plantes sauvages. D'avril à mai, il faut effectuer le désherbage et l'apport d'engrais organique. Mi-juin, les plantes commencent à fleurir. Toute opération de désherbage est stoppée afin de ne pas abîmer les jeunes fleurs.

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

### 1.2.5. Odeur

La lavande stéchade a une odeur aromatique mais peu utilisée en parfumerie parce qu'elle dégage une odeur camphrée.

### 1.2.6. Préparations et usages

La lavande a une longue histoire en usage médicinal, employée comme expectorant, antispasmodique, carminative, désinfection des plaies, contre les problèmes dermiques, psoriasis, possède des propriétés antimicrobiennes, anti-carcinogènes et anti-inflammatoires <sup>[18]</sup>.

### 1.2.7. Composition de l'huile essentielle de la lavande stéchade

L'huile des feuilles de *L. stoechas* est riche en monoterpènes, les constituants majoritaires sont : Fenchone (27.6%), Cinéole (18.9%) et Camphre (18.1%). On rencontre aussi de l'acétate de Bornyl (3.2%), du Camphène (1.3%) et du Viridiflorol (1.1%)<sup>[18]</sup> (figure 2).

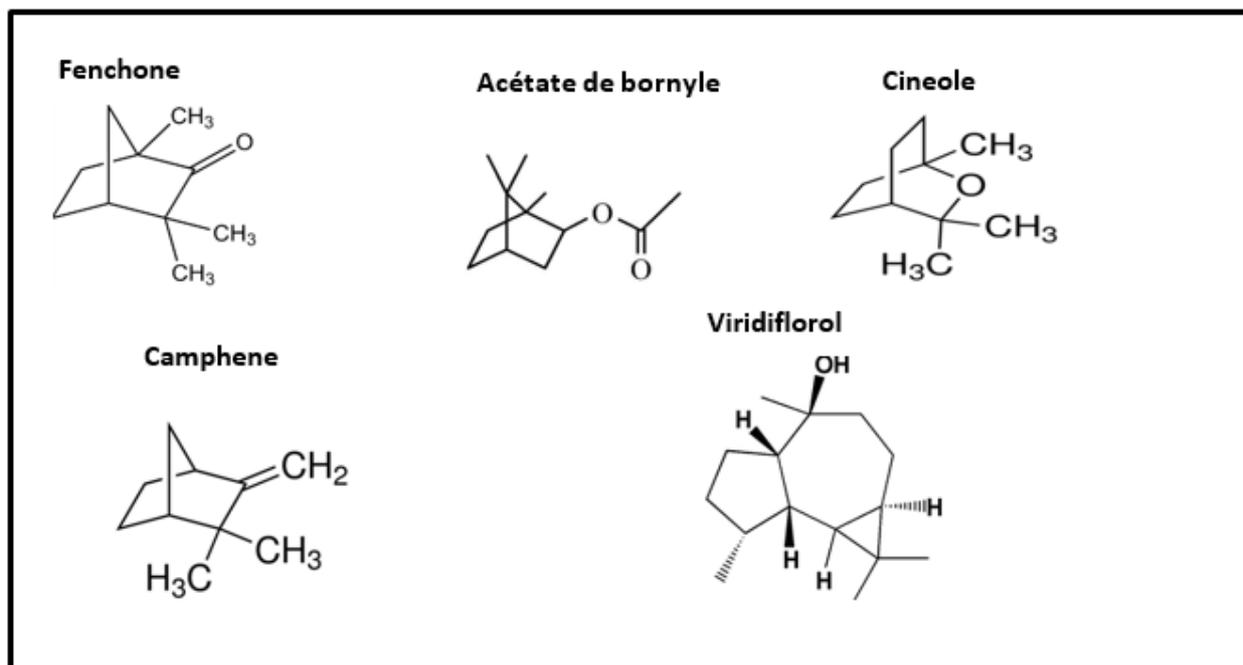


Figure 2 : Structure chimique des constituants majoritaires de l'H.E de la lavande stéchade

## 2. Les huiles essentielles

### 2.1. Définition

Les huiles essentielles sont des extraits volatils et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, pressage ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie<sup>[19]</sup>.

Une huile essentielle est un produit vivant. Cela veut dire que la composition moléculaire d'une huile issue des plantes de la même espèce, par exemple la lavande stéchade ne sera pas la même d'une année à l'autre, ni même d'un lot à l'autre. Cette différence est due, d'une part au



biotope dans laquelle la plante a évolué, (la nature du sol, la période d'ensoleillement, l'altitude, son environnement, etc..) mais également à la façon dont elle a été récoltée, stockée puis distillée.

Les huiles sont constituées de molécules chimiques définies et clairement identifiées et quantifiées lors de la distillation, c'est un mélange de molécules très complexe constitué par :

Les acides, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les coumarines, les esters, les éthers, les lactones, les oxydes, les terpènes...

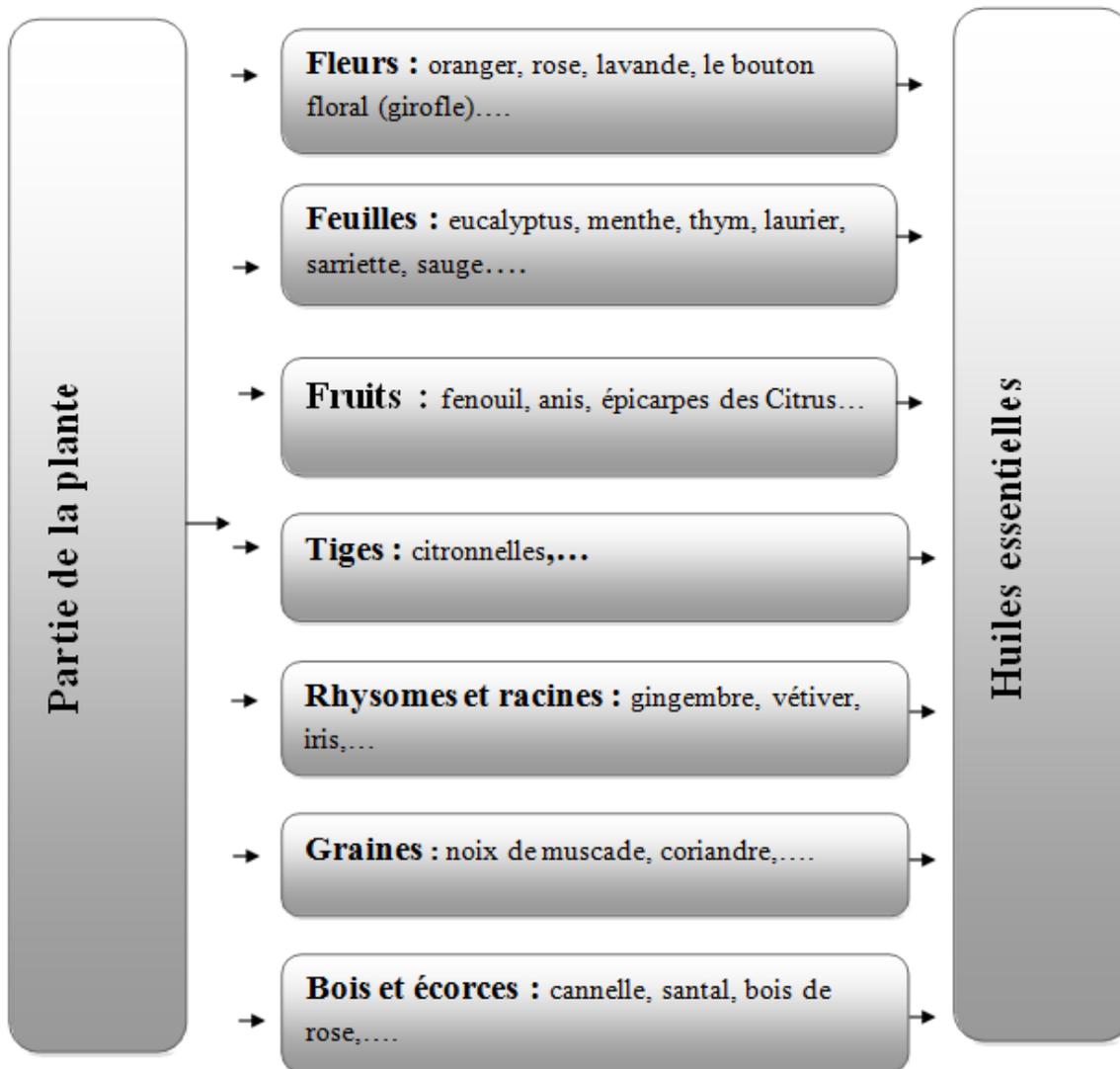
## 2.2. Histoire de leur utilisation

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis des millénaires en Chine, en Inde, au Moyen Orient, en Egypte, en Grèce, en Amérique Latine (Azèques, Mayas, Incas) et en Afrique, les huiles essentielles tombent dans l'oubli au Moyen Age. A ce moment, l'Europe connaît un retour à la barbarie avec un déclin général du savoir. Il faudra attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouvent alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque.

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps. Dans certaines régions d'Afrique du Sud, les feuilles de tabac malaxées dans l'eau étaient utilisées pour lutter contre les moustiques. Au Maroc, l'utilisation de plantes contre les invasions de moustiques est une pratique très courante, surtout dans les régions rurales.

## 2.3. Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'existent quasiment, que dans les végétaux, elles peuvent être stockées dans tous les organes des plantes aromatiques <sup>[20,28]</sup> (Figure 3).



*Figure 3 : Provenance des huiles essentielles en fonction des différentes parties de plantes*

#### 2.4. Rôle des huiles essentielles pour le règne végétal

Nous ne savons pas exactement ce que représentent les huiles essentielles pour le règne végétal. Les plantes les utilisent pour se protéger contre les virus et tous pensent qu'il s'agit d'hormones végétales. D'autres considèrent que les huiles sont des messagers entre sorte de parasites et de microbes <sup>[29]</sup>, des travaux ont montré que les monoterpènes et les sesquiterpènes peuvent jouer des rôles importants dans la relation des plantes avec leur environnement, par exemple, le 1,8-cinéole et le camphre inhibent la germination des organes infectés ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes <sup>[30,31]</sup>.



## 2.5. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce, à titre d'exemple nous donnons la composition chimique de la sauge (tableau 1) et de la lavande (tableau 2) dans des différentes régions.

*Tableau 1 : Composition de l'huile essentielle de la S. officinale dans différents pays* <sup>[32-34]</sup>

Composition	France	Hongrie	Belgique	Russie	Grèce	Ukraine	Portugal	Maroc (Taounate)
Salvene	0.2	0.6	0.2	0.2	0.1	0.2	0.04	
Tricyclene	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.07	
$\alpha$ -Thujene		0.1	tr	tr	0.3	0.1	0.14	
$\alpha$ -Pinene	3.5	5.8	5.1	4.4	5.1	3.7	4.22	3.8
Camphene	5.3	5.1	6.8	7.1	5.9	3.6	2.57	2.2
$\beta$ -Pinene	0.2	2.4	0.3	0.4	4.9	1.6	2.22	5.04
Myrcene	1.0	0.8	0.9	0.9	4.2	0.7	0.92	3.07
$\alpha$ -phellandrene	tr	tr	tr	0.1	0.1	tr	0.04	1.23
$\alpha$ -Terpinene	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.2	0.12	2.44
p-Cymene	0.9	0.7	1.0	1.0	0.6	0.5	0.11	
1,8-Cineole	11.9	14.6	12.6	17.0	45.3	13.7	6.47	5.27
Limonene							1.59	1.02
(Z)- $\beta$ -Ocimene	tr	0.1	tr	tr		0.1	0.14	
$\gamma$ -Terpinene	0.1	0.2	0.1	0.1	0.7	0.3	0.29	
Terpinolene	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.47	
$\alpha$ -Thujone	21.0	18.6	19.6	16.2	3.0	22.4	25.50	
$\beta$ -Thujone	10.1	6.6	5.4	7.1	1.5	11.6	3.89	
Camphor	23.9	13.7	19.2	28.5	11.3	12.9	19.51	5.87
Citronellal	tr	0.1	0.1	0.1				
Borneol	2.6	5.0	2.0	2.8	1.6	3.0	0.06	3.34
Terpinen-4-ol	0.3	0.3	0.3	0.3	0.6	0.5	0.23	2.47
$\alpha$ -Terpineol	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1	0.26	1.4
Bornyl acetate	2.6	1.2	1.7	1.9	0.1	1.9	1.15	3.36
(Z)-Sabinyl acetate	0.1	0.1	0.1	0.1	tr	0.1	0.18	
Thymol	0.1	0.5	0.1	0.1	tr	0.1		
(E)- $\beta$ -Caryophyllene	3.4	2.9	1.1	0.9	4.9	2.7	3.17	4.54
$\alpha$ -Humulene	3.3	2.6	1.4	2.0	0.4	2.1	7.46	3.64
$\delta$ -Cardinene	tr	tr	0.1		0.2	tr	0.11	
Spathylenol	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1		
Caryophyllene oxide	0.2	0.6	0.5	0.2	0.8	0.9	0.21	
Viridiflorol	5.6	8.3	10.4	4.5	1.1	7.9	6.29	4.16
Humulene epoxide	0.1	1.0	1.1	0.6	0.2	1.1		
T-Cardinol		0.2		0.9	0.2			



Tableau 2 : Composition de l'huile essentielle de la *L.stéchade* dans différents pays <sup>[34-40]</sup>

Composition	Portugal	Espagne	Grèce	Algérie	Turquie	Tunisie	Maroc(Taounate)
$\alpha$ -pinene	2.8	1.31	2.2	1.0	1.2	0.4	0.25
Camphene	0.7	1.4	0.4		0.4	0.8	0.41
$\beta$ -pinene	0.1		0.1	tr	3.2		
Myrcene	0.1		tr	tr	0.3		
$\beta$ -phellandrene	Tr		tr	0.1	0.1		
$\alpha$ -terpinene	Tr		0.1	0.2	0.1		
<i>p</i> -cymene	0.3		0.4	6.5	1.4	0.4	0.25
Limonene	1.2		0.6		1.3		
1,8-cineole	0.8	8.03	16.7	tr	3.9	4.9+limonene	0.59
$\gamma$ -terpinene	tr		0.1	0.2	0.4		
$\alpha$ -terpinolene			tr	0.4	0.1		
Fenchone	41.9	55.79	44.8	31.6		68.2	10.33
Linalool	2.7	0.29	tr	0.1	tr	0.3	0.5
Endo-fenchol	1.2		0.4	0.4		1.9	
Camphor	34.6	18.18	6.2	22.4		11.2	17.85
Borneol	0.3		tr	tr	0.5	0.6	0.24
Terpinen-4-ol	tr		0.3	0.8		0.2	
<i>p</i> -cymen-8-ol	1.4		0.2	0.2		0.4	
Myrtenol		0.25	0.5	tr		0.6	1.0
Trans-carveol	0.1	0.73	0.9				
Carvone	0.3	0.33	0.1	0.1	0.9	0.3	
Bornyl acetate	0.1	1.32	tr	tr	0.1	1.4	
Lavandulyl acetate	0.2			3.0			3.13
Myrtenyl acetate		6.25	3.6			1.2	11.98
$\beta$ -caryophyllene	0.2			0.9	0.1		
$\alpha$ -humulene	0.02	0.33	0.1				
$\alpha$ -cadinol			7.4	tr			1.49
Pulegone					40.4		
Menthol					18.1		
Menthone					12.6		

Cette variation peut être due à de nombreux facteurs, dont nous citons les plus importants

### 2.5.1. Origine botanique

La composition d'une H.E varie en fonction de l'espèce productrice. En effet, l'extraction de l'H.E d'un même organe de deux plantes différentes ne donne pas la même composition chimique <sup>[41,42]</sup> par exemple deux espèces de sauge : la sauge officinale (*Salvia officinalis*) et la sauge sclarée (*Salvia sclarea*), qui peuvent être vendues toutes les deux sous l'appellation d'essence de sauge. La première, riche en cétones neurotoxiques, peut provoquer des crises d'épilepsie, alors que la seconde possède des esters aromatiques anti-épileptisants <sup>[43]</sup>.



Les H.E sont constituées par les molécules et leurs proportions qui constituent l'identité propre à chaque huile, et qui déterminent leurs propriétés, leurs champs d'action, leurs toxicités et donc leurs précautions d'emploi.

Il est donc fondamental de savoir précisément ce que contient une huile essentielle pour l'utiliser en sécurité et surtout pour se garantir le meilleur résultat en fonction de ce que l'on attend d'elle. C'est cela que le chémotype est indispensable.

### 2.5.2. L'organe producteur

La composition et le rendement d'une H.E varient selon la partie de la plante à partir de laquelle est extraite <sup>[44]</sup>.

### 2.5.3. Origine géographique

Cela permet de connaître l'environnement dans lequel grandit la plante et de caractériser ainsi l'huile essentielle obtenue. Il y a des différences de composition chimique selon le pays d'origine.

Une même plante grandissant dans des lieux différents avec changement de situation géographique (altitude et latitude), avec variation de la nature du sol, peut produire des huiles essentielles différentes <sup>[45]</sup>. Par exemple, le thym vulgaire à géraniol ne produit cette molécule de géraniol qu'en hiver alors que l'acétate de géranyl la remplacera en été <sup>[46]</sup>.

### 2.5.4. Conservation des plantes

Les plantes doivent être séchées à l'air et à l'ombre. En effet, des modifications chimiques, physiques et biochimiques dues à l'action de la lumière et de la température peuvent influencer sur la qualité d'huile <sup>[44]</sup>.

## 2.6. De la plante à l'huile essentielle

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles sont très variées, elles s'étalent des plus traditionnelles à celles qui font appel aux techniques récentes. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physicochimiques du produit voulu et son utilisation ultérieure. Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction des H.E dont voici les principales :

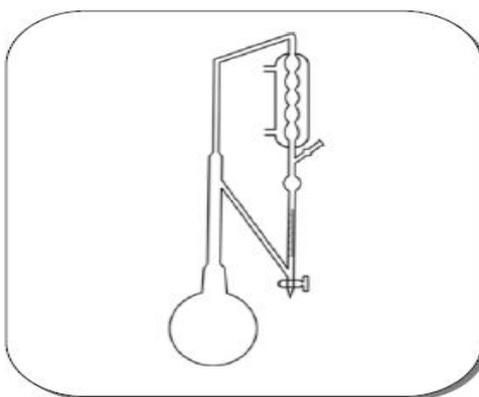


### 2.6.1. Extraction par distillation

Deux méthodes sont décrites ci-dessous :

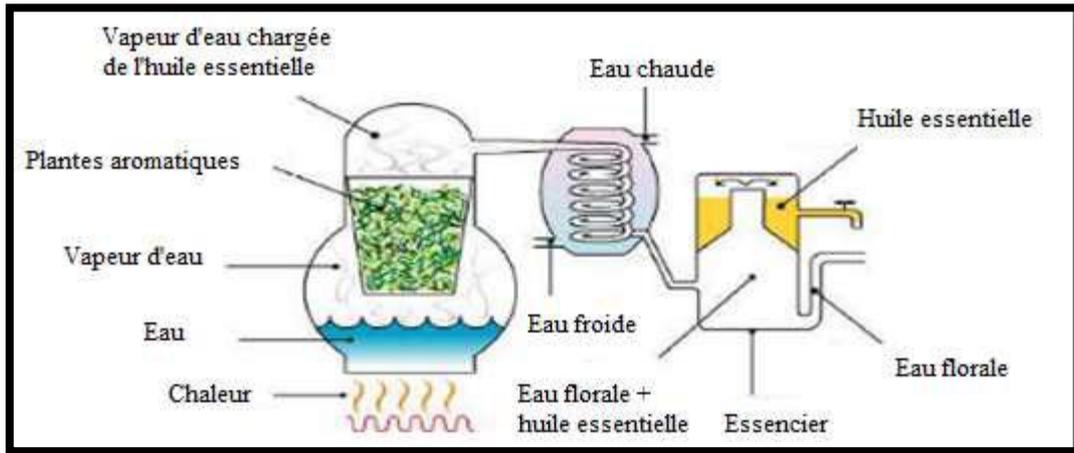
La méthode de Moritz : il s'agit d'une hydrodistillation simple qui consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau. L'ensemble est, ensuite, porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile se sépare par différence de densité.

L'hydrodistillation peut s'effectuer sans ou avec retour d'eau dans le ballon. Ce recyclage est dit cohobage et le système conçu pour l'opération est appelé Clevenger (Figure 4). Son intérêt majeur réside dans l'utilisation du système de cohobation permettant une distillation en continu sans modifier la quantité en eau du ballon.



**Figure 4 : Montage Clevenger**

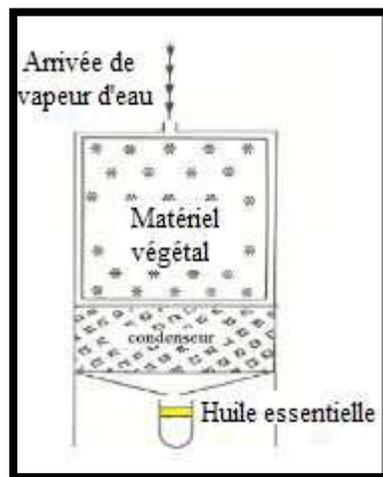
La méthode de Parnas-Wagner : dans la distillation à vapeur saturée, la matière végétale est placée sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic et n'est pas en contact avec l'eau. Les principes volatils sont entraînés par les vapeurs d'eau puis refroidis et enfin séparés de la phase par décantation <sup>[23,25]</sup> (figure 5).



*Figure 5 : Montage d'extraction des H.E par l'entraînement à la vapeur d'eau*

### 2.6.2. Hydrodiffusion

Contrairement à la distillation à la vapeur, la vapeur injectée dans ce système est du haut de l'alambic vers le bas. Le mélange de vapeur-huile essentielle est condensé directement en dessous du support de la plante à travers un plateau perforé. Ce procédé permet de réduire la consommation en vapeur, réduire le temps de distillation et d'obtenir un meilleur rendement en comparaison avec distillation à la vapeur.



*Figure 6 : Schéma explicatif de l'hydrodiffusion*

### 2.6.3. Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique

Dans cette technique, un courant de CO<sub>2</sub> à forte pression fait éclater les poches à essence, et entraîne les huiles essentielles qui seront, ensuite, récupérées [27]. Le CO<sub>2</sub> sous pression et à température supérieure à 31°C, se trouve dans un état "supercritique", la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO<sub>2</sub> est introduit sous pression. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO<sub>2</sub> reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé.

Les avantages de ce procédé est que le CO<sub>2</sub> est inerte chimiquement, naturel, non toxique et bon marché et facilement séparable de l'extrait. L'extraction au CO<sub>2</sub>, est une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives, cependant son installation reste coûteuse et l'appareillage et encore envahissant.

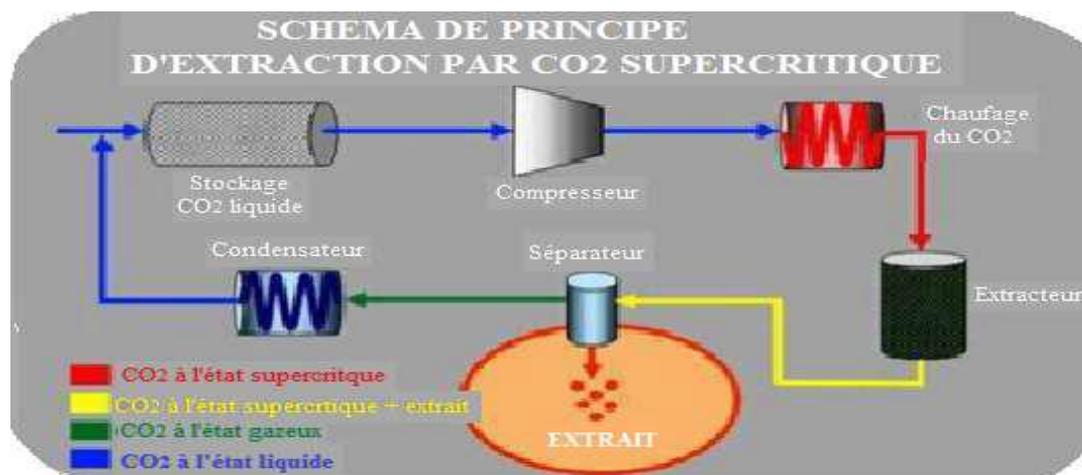


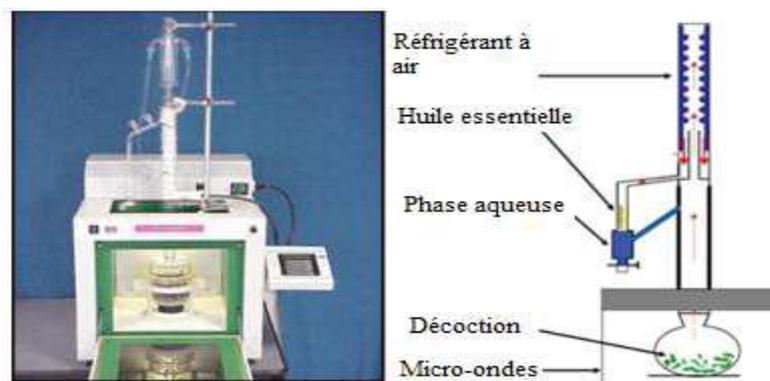
Figure 7 : Schéma de principe d'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique [47]

### 2.6.4. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes

Le montage obtenu se rapproche sensiblement d'un montage d'hydrodistillation classique. Le réacteur contenant seulement le matériel végétal est chauffé par les micro-ondes à l'intérieur du four. Les vapeurs sont ensuite entraînées dans le col de cygne avant d'être condensées dans le réfrigérant puis recueillies dans un essencier. Les graines sont en permanence humides, ce qui ne laisse aucune chance à la réalisation d'éventuelles réactions secondaires, néfastes à la qualité du produit obtenu [48].

Le protocole expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes s'articule autour de trois points importants :

- ✓ La quantité de matière végétale traitée,
- ✓ La puissance micro-ondes appliquée,
- ✓ La durée totale de l'extraction.



**Figure 8 : Montage de l'extraction par micro-ondes**

### 2.6.5. Enfleurage

Cette technique est employée en parfumerie. Elle est fondée sur l'affinité qui peut exister entre les corps gras et les huiles essentielles. En effet les huiles essentielles sont absorbées par les corps gras, souvent à froid (enfleurage à froid) ou à l'état fondu (liquide) par chauffage (enfleurage à chaud). B. M. Lawrence donne des indications précises sur cette technique <sup>[49]</sup>.

L'enfleurage à froid est particulièrement adapté aux fleurs fragiles (jasmin, tubéreuse, ...), alors que l'enfleurage à chaud est réservé aux fleurs moins fragiles, comme la rose centifolia, la violette, la fleur d'oranger et le cassis. Le corps gras utilisé est souvent de la graisse animale raffinée. Le produit obtenu dans les deux cas est appelé pommade florale, qui peut subir, par la suite, une extraction par l'alcool afin d'avoir une absolue <sup>[49,50]</sup>.



### 2.6.6. Macération

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

#### ✓ *Délipidation par l'hexane*

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

#### ✓ *Macération par le méthanol*

La matière végétale délipidée a été ensuite mélangée avec du méthanol. Le mélange a été agité pendant 10 h à température ambiante, après filtration le solvant a été évaporé sous vide, et on obtient l'huile essentielle.

## 2.7. Technique d'analyse de l'huile essentielle

L'analyse chimique des huiles essentielles permet d'identifier et de quantifier ses constituants. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de composés. En effet, la CPG est la méthode de référence utilisée pour analyser les huiles essentielles <sup>[51]</sup>, elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très complexes, de nature et de volatilité très variées <sup>[52]</sup>.

### 2.7.1. 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. C'est la technique de séparation la plus utilisée pour l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du millilitre voire du microlitre. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs à ionisation de flamme (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles <sup>[53]</sup>.



Chaque constituant est caractérisé par un indice calculé à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, dans les mêmes conditions d'analyse des échantillons (indice de Kováts) <sup>[54]</sup> ou en programmation de température (indices de rétention) <sup>[55]</sup>. Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes <sup>[53]</sup>.

## 2.7.2. Couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectres de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatisants. La CPG sur colonne capillaire constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation en impact électronique <sup>[56]</sup>.

## 2.8. Composition chimique des huiles essentielles

### 2.8.1. Origine biogénique des huiles essentielles

Comme toutes les plantes sont classées en familles, les produits naturels sont aussi classés en deux familles. Les majeures parties des composés des huiles essentielles sont: le groupe des terpénoïdes d'une part, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phényle propane d'autre part.

#### 2.8.1.1. Groupe des terpénoïdes

C'est le groupe le plus important. Il comprend des monoterpènes, des sesquiterpènes, des diterpènes..... Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiple de cinq atomes de carbone de formule générale  $[C_5H_8]_n$ . La molécule de base est l'isoprène. Ce dernier, sous sa forme réactive est l'isoprenyl pyrophosphate IPP qui se transforme en diméthylallyl pyrophosphate DMAPP. Les composés IPP et DMAPP réagissent ensemble pour former le géranyl pyrophosphate GPP, précurseur des monoterpènes en C10. On trouve dans la nature plus de 900 composés.

Une deuxième molécule d'IPP réagissant sur le GPP, fournit farnésyl pyrophosphate FPP, précurseur des sesquiterpènes en C<sub>15</sub>, puis une troisième molécule d'IPP réagissant sur FPP fournit le géranylgéranyl pyrophosphate GGPP, précurseur des diterpènes en C<sub>20</sub> (figure 9). Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines, ainsi que dans les champignons. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cycliques [57,58].

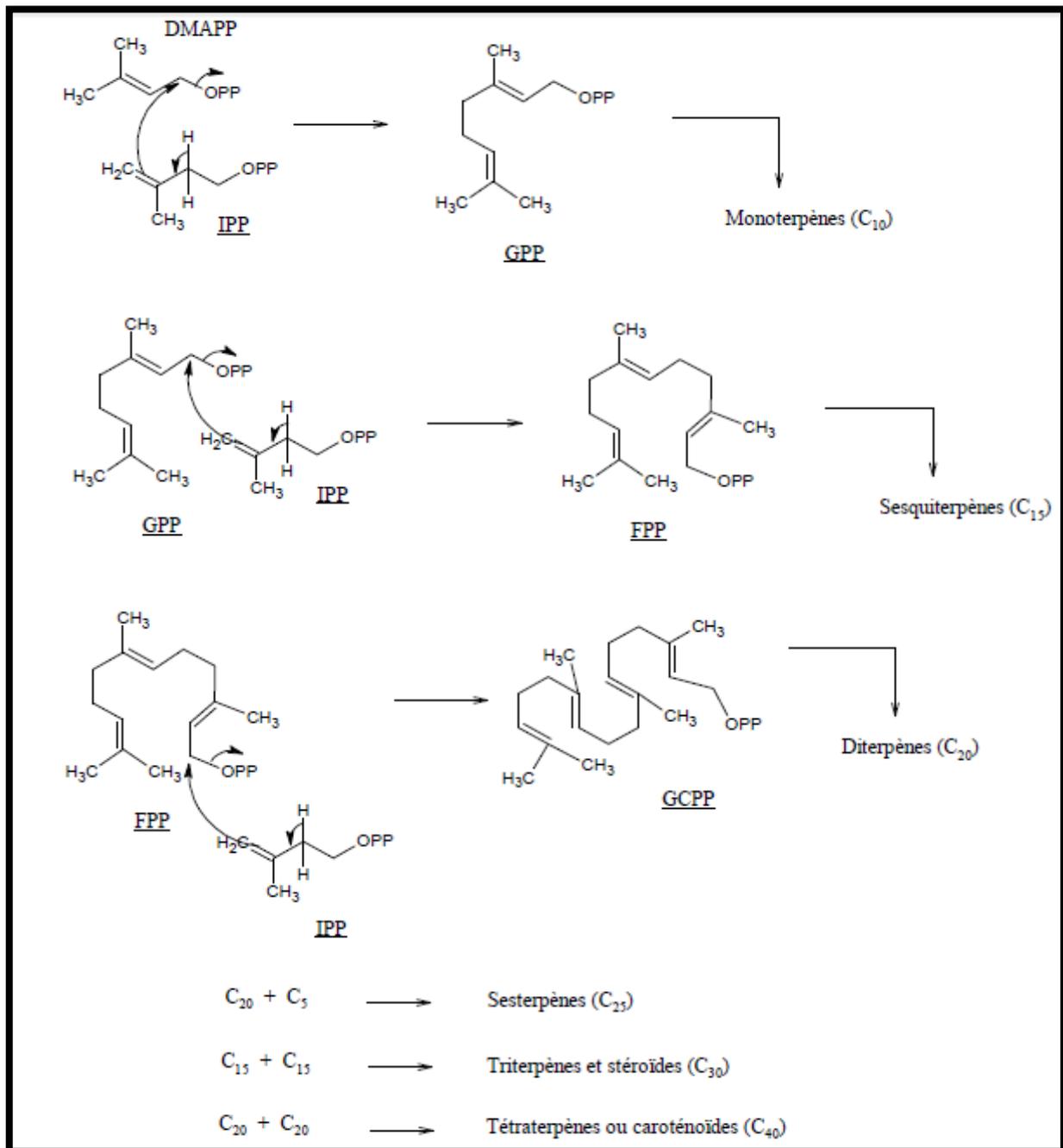


Figure 9 : Schéma de la biosynthèse des terpènes

### ✓ Les monoterpènes

Ce sont des hydrocarbures aliphatiques, saturés ou insaturés. Ils peuvent être acycliques comme le myrcènes, ocymène..., ou cycliques comme le pinène, camphène..., et même aromatiques comme le p-cymène, aussi, ils peuvent contenir des atomes d'oxygènes (figure 10).

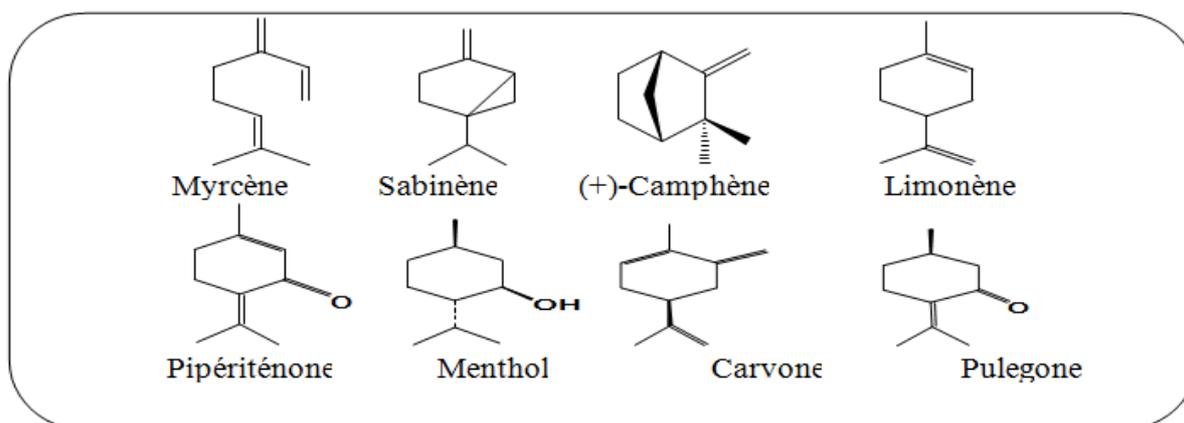


Figure 10 : Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des H.E

### ✓ Les sesquiterpènes<sup>[59]</sup>

Les variations structurales dans cette série sont de même nature que dans le cas précédent, hydrocarbures, alcools, cétones étant les plus fréquents. On trouvera ci-dessous quelques exemples de sesquiterpènes caractéristiques des huiles essentielles (figure 11).

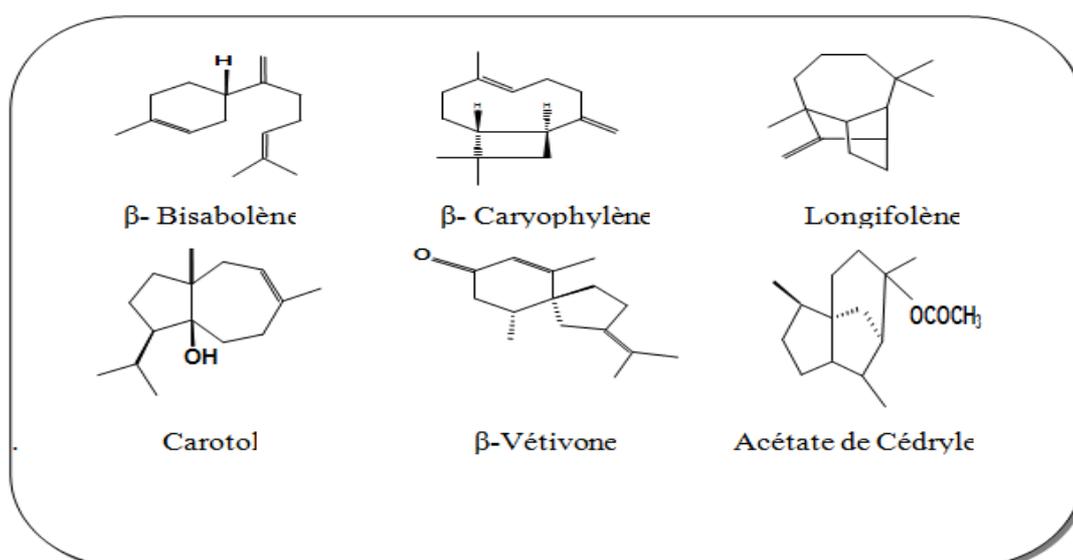


Figure 11 : Structure chimique de quelques sesquiterpènes extraits des H.E



Les dérivés aromatiques des huiles essentielles sont surtout des dérivés de l'acide cinnamique (C6-C3), celui-ci provient de l'acide shikimique obtenue à partir du phospho-énol-pyruvate et du D-rythrose-4-phosphate <sup>[60]</sup>.

#### 2.8.1.2. Les composés aromatiques

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

Parmi ces constituants les polyphénols sont réputés pour leurs excellentes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancérigènes, et antimicrobiennes <sup>[61]</sup>.

#### ✓ *Les phénols simples*

Ce sont des phénols de structure simple, dont le squelette est basé sur le C6-C1 et au maximum C6-C2 (figure 12). Dans les plantes supérieures, ces composés dérivent de la voie biosynthétique des phénylpropanes suivies par une dégradation du squelette C6-C3 initialement formé.

Une voie directe représentée par aromatisation de l'acide shikimique semble être la voie principale vers l'acide gallique, le précurseur des tanins hydrolysables <sup>[61]</sup>.

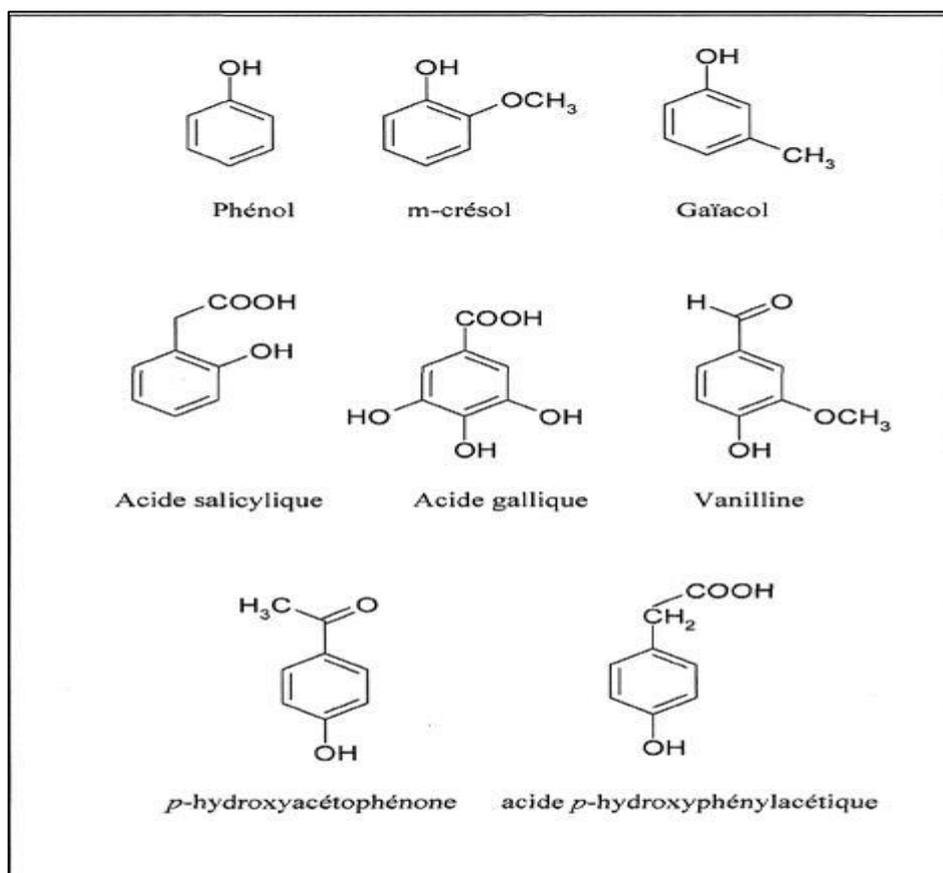


Figure 12 : Structure chimique de quelques composés aromatiques extraits des H.E

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

### ✓ Les flavonoïdes

L'évolution des plantes vasculaires est directement liée au développement de la capacité de lignification ou plus précisément à l'expansion du métabolisme phénylpropane (impliquant l'acide shikimique comme intermédiaire obligatoire). Les flavonoïdes partagent la même voie de biosynthèse que la lignine et sont représentés par des composés avec des squelettes C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, c'est-à-dire à la base de phénylpropane. Leur structure moléculaire est caractérisée par un squelette carboné de type diphényl 1,3-propane qui comprend 15 atomes de carbone répartis en deux cycles benzéniques notés A et B reliés entre eux par la structure chromane à trois carbones (C) [61].

Plusieurs sous-groupes de flavonoïdes existent selon le degré d'insaturation et d'oxydation de l'hétérocycle : flavone, flavanone, flavane, isoflavones [62].

Les flavonoïdes existent généralement dans la nature sous forme hydroxylée et combinés à diverses molécules, ce qui explique la grande variété de ces composés (figure 13). La présence de glucides ou de groupements méthyle sur les hydroxyles phénoliques est très fréquente. Pour la plupart des flavonoïdes, la chaîne aliphatique propane est incluse dans un hétérocycle pyrane. Toutefois, il existe d'autres molécules pour lesquelles la chaîne propane, qui relie les deux cycles A et B, présente des squelettes différents à savoir : chalcones, auronnes, isoflavones (figure 14).

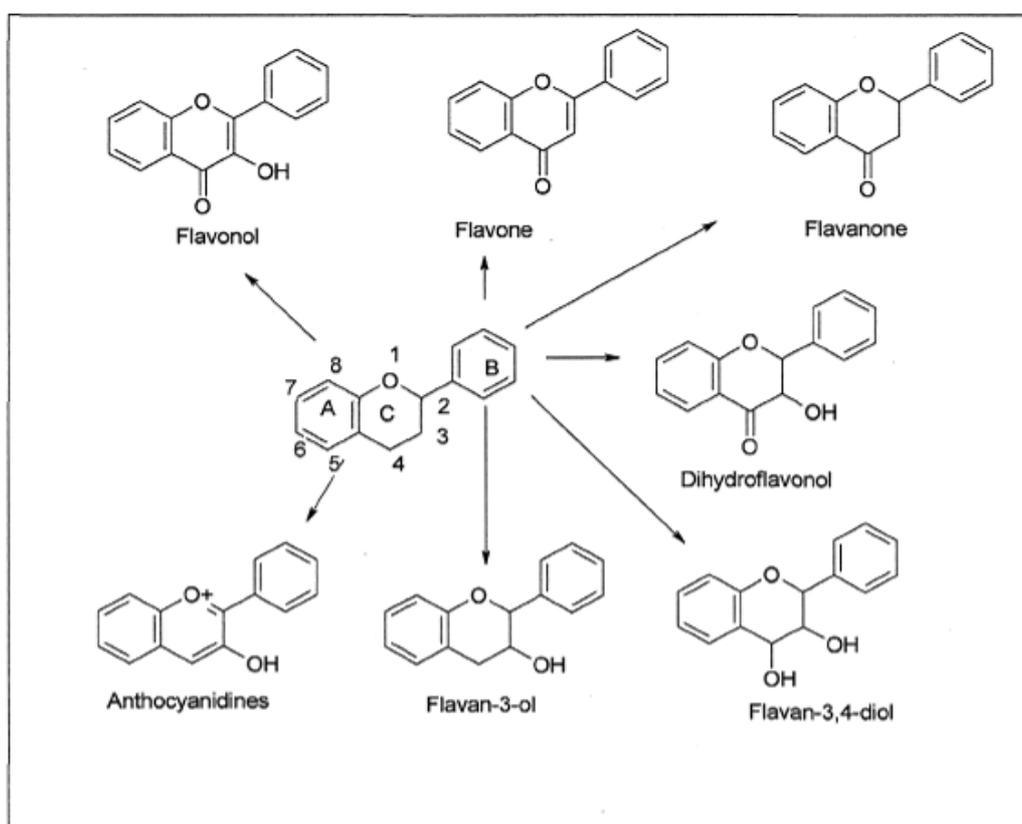
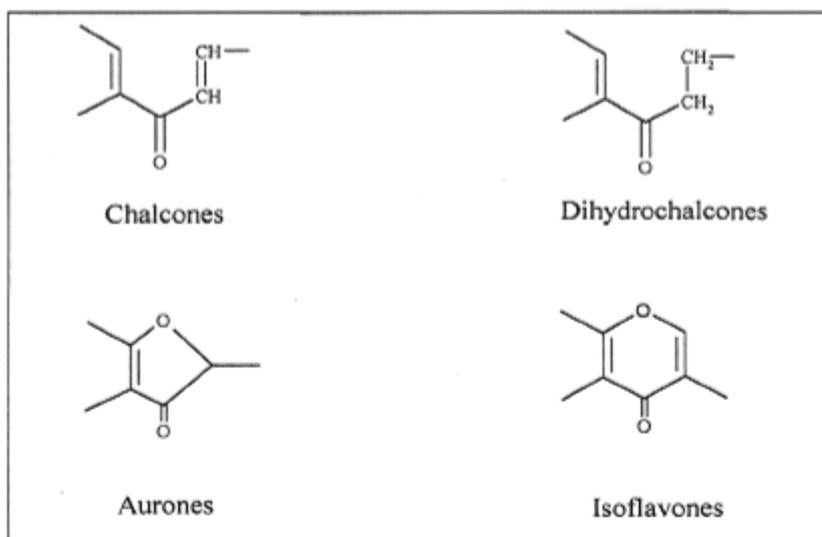
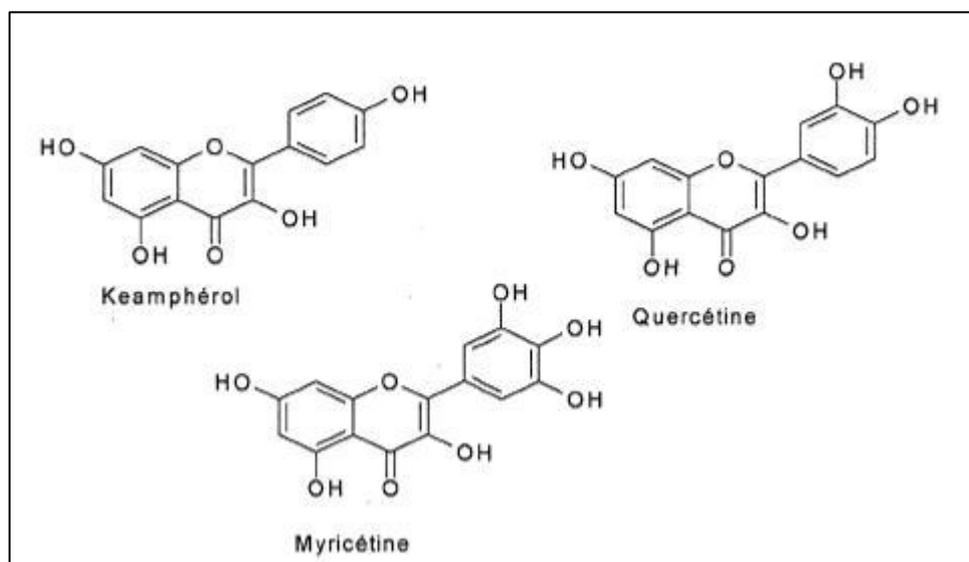


Figure 13 : Familles des flavonoïdes



**Figure 14 : Structure d'autres types de flavonoïdes**

Les glycosides (héterosides) des flavonols, principalement ceux du kaempférol, de la quercétine et de la myricétine représentent les polyphénols prédominants dans les feuillages des plantes vasculaires <sup>[63]</sup> (Figure 15).



**Figure 15 : Flavonols prédominant dans les feuillages des plantes vasculaires**

Les flavonoïdes jouent un rôle dans la pigmentation des plantes, la fixation du diazote atmosphérique par les plantes légumineuses, la défense chimique contre les prédateurs (phytoalexines) et la reproduction des plantes <sup>[61]</sup>.



### ✓ *Les tannins*

Les tannins sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau. En plus de présenter les réactions caractéristiques des phénols en général, ils sont capables de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines <sup>[63]</sup>. Cette réactivité avec les protéines est à l'origine des propriétés tannantes qu'ils exercent sur le collagène de la peau au cours de la transformation de la peau en cuir, la rendant imputrescible et moins perméable à l'eau. Les tannins sont très répandus dans le monde végétal, leur teneur et leur nature varient d'une espèce à l'autre.

## 2.9. Propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires que les plantes généralement synthétisent en situation de stress ou pour combattre les agents infectieux ou parasitaires <sup>[57]</sup>.

La commercialisation des huiles essentielles peut être orientée selon leur bio-activité.

### 2.9.1. Propriétés antimicrobiennes

Les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent une forte activité antibactérienne. Le carvacrol est le plus actif de tous, reconnu pour être non toxique, il est utilisé comme agent de conservation et arôme alimentaire dans les boissons, friandises et autres préparations. Le thymol et eugénol sont utilisés dans les produits cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries : *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp*, *Helicobacter pylori*...

### 2.9.2. Propriétés antioxydantes

Avec la préoccupation croissante sur l'utilisation de ces agents de conservation et la demande croissante des consommateurs pour des produits naturels verts sans additifs, les industriels sont forcés à envisager l'incorporation de substances non chimiques dans leurs produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques. Les huiles essentielles sont considérées comme des ressources potentielles de molécules bioactives naturelles, qui ont été étudiées pour leurs propriétés antioxydantes. Elles sont généralement utilisées comme arômes et additifs alimentaires.



### 2.9.3. Propriétés insecticides

Les premiers composés d'origine végétale ont été identifiés et isolés au 19<sup>ème</sup> siècle, même si leur utilisation comme insecticide pourrait remonter au 17<sup>ème</sup> siècle. Plusieurs travaux ont révélé que les huiles essentielles exposent des propriétés insecticides, nématocides, acaricides et larvicides.

### 2.9.4. Autres Activités

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers

Des travaux tentent également d'analyser les effets des huiles essentielles sur le comportement ou d'évaluer la possibilité de les utiliser dans la lutte contre l'addiction à certaines drogues, comme la nicotine.

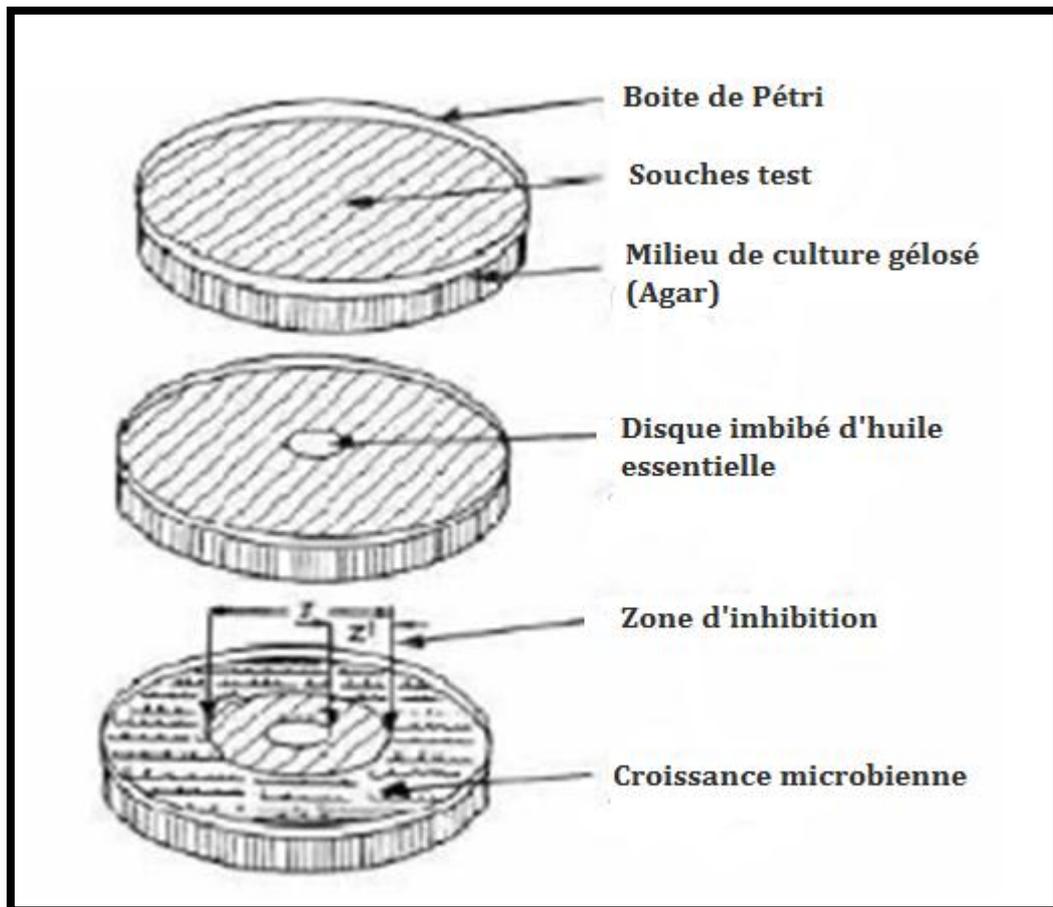
Les huiles essentielles et leurs monoterpènes affectent le métabolisme osseux lorsqu'elles sont ajoutées à la nourriture des rats. Il a été démontré que ces composés lipophiles inhibent la résorption osseuse <sup>[60]</sup>.

## 2.10. Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne

### 2.10.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque) <sup>[64]</sup>

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition n'est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones

d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose (Figure 16).



*Figure 16 : Méthode de la diffusion en disque*



### 2.10.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution)

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/ml ou mg/l). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate. Concernant les huiles essentielles, les techniques de détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI sont décrites par plusieurs études <sup>[65, 66]</sup>.

### 2.11. Utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles s'utilisent selon différentes voies. Nous pouvons les avaler, les respirer ou les utiliser en application directes sur la peau :

#### ✓ *La voie orale*

Elle doit être utilisée uniquement sur conseils du médecin aromathérapeute. Nous conseillons de ne jamais prendre une huile pure dans la bouche sous peine de désagréments qui peuvent aller jusqu'à la brûlure. Aussi, il ne faut jamais prendre plus de trois gouttes <sup>[27-67]</sup>.

#### ✓ *La voie respiratoire*

Les huiles essentielles sont, très vite, absorbées par toutes les petites cellules ciliaires qui tapissent notre arbre respiratoire depuis les fosses nasales jusqu'au bout de nos alvéoles pulmonaires.

#### ✓ *La voie cutanée*

C'est la voie idéale car efficace et sans danger. Généralement, les huiles sont utilisées à des concentrations très diluées (trois gouttes dans une cuillerée à café). Nous pouvons les employer pour massage ou simplement en application selon la zone et l'affection à traiter. D'autres formes sont aussi possibles : pommades, bain, etc. <sup>[68]</sup>.

Dans tous les cas, les huiles essentielles pénètrent dans notre corps pour atteindre la circulation sanguine afin d'être acheminées jusqu'au site malade <sup>[69]</sup>.



# Partie II : Résultats et discussion



## 1. Matériel biologique

### 1.1. Matériel végétal

Trois plantes aromatiques et médicinales faisant l'objet de notre étude qui ont été sélectionnées sur la base des recherches bibliographiques, à savoir :

- La sauge officinale de la FST Fès.
- La sauge officinale de la région de Taounate.
- La lavande stéchade de la région de Taounate.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés uniquement des parties aériennes de ces plantes (feuilles et fleurs). La récolte a été effectuée durant le mois de Février dans les trois localités de la région de Fès : sauge (FST), sauge (Taounate), lavande (Taounate).

Les spécimens ont été déposés dans l'herbier de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

### 1.2. Matériel microbiologique

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été évaluée sur la souche *Escherichia Coli* et *Staphylocoque Aureus*.

*E. coli* est une bactérie qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, germe que l'on trouve le plus communément dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud.

Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles (patient immunodéprimé, prothèses cardiaques)

## 2. Méthode d'extraction

Trois lots d'échantillon préalablement séchés à l'ombre (100g), à une température maximale de 25°C, sont soumis à l'extraction de l'huile essentielle par la méthode d'hydrodistillation (photo 5) ; à l'aide de l'appareil Clevenger (photo 6).



L'extraction est effectuée durant 3 heures, à la température de 100°C. La vapeur d'eau enrichi de constituants volatils est condensée puis décantée à 20°C. Les essais ont été répétés 3 fois. Le volume de l'huile essentielle obtenu est déterminé.



*Photo 5 : L'appareillage de l'hydrodistillation*



*Photo 6 : L'appareil Clevenger*

Cette opération a été menée sur les feuilles et les fleurs (*Salvia officinalis*) et sur les feuilles (*Lavandula stoechas*) comme est indiqué dans le tableau 3 :

*Tableau 3 : Quantité de la matière végétale fraîche hydrodistillée*

	Salvia officinalis de Fès		Salvia officinalis de Taounate	lavandula stoechas
Partie distillée	Les feuilles	Les fleurs	Les feuilles	Tiges et feuilles
Masse (g)	100	100	100	100

Les extractions fournissent des huiles végétales essentielles de couleur jaunâtre avec une très forte et persistante odeur de la sauge, et de la lavande.

L'extraction a été optimisée par hydrodistillation successive en utilisant des conditions opératoires strictement identiques.

L'huile essentielle obtenue a été mise à l'obscurité et à une température de 4°C.



## 2.1. Calcul de l'humidité (H%)

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

L'humidité est calculée selon la relation :

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

Avec :

$M_f$  : masse de la plante à l'état frais

$M_s$  : masse de la plante à l'état sec

## 2.2. Calcul du rendement de l'huile essentielle (Rdt%)

Le rendement de l'huile essentielle est donné par la relation suivante :

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

Avec :

Rdt (%): rendement en huile essentielle en (ml/g)

V: volume d'huile essentielle recueilli

$M_s$ : masse de la matière végétale sèche

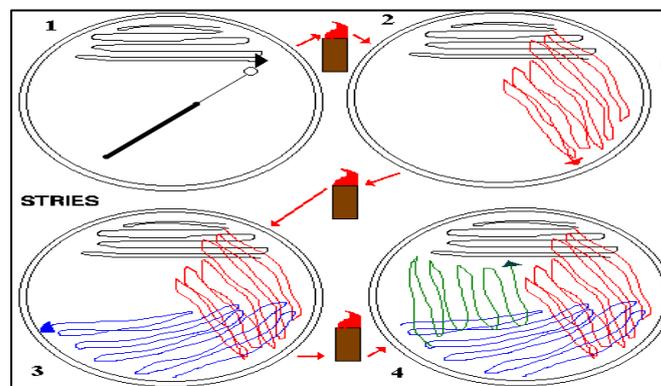
## 3. Activité antibactérienne

Pour étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles, on a choisi la méthode de diffusion sur disques, ou méthode de Vincent, appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme <sup>[70]</sup>. Dans cette méthode, on a utilisé des disques de papier Wathman de 5 mm de diamètre, imprégnés par un volume connu de l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface par la suspension bactérienne. Après incubation, la lecture des résultats a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm.

### 3.1. Repiquage de la bactérie

Les souches E. Coli et S. Aureus ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 24h afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

Explication du repiquage par la méthode des stries : on dispose la solution microbienne avec l'anse dans le premier tiers de la boîte. On fait des stries avec des mouvements de va et vient au long de toute la boîte en prenant soin de ne pas traverser, arracher ou creuser le milieu.



*Figure 17 : Méthode de stries des bactéries*

### 3.2. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure de 24 heures sur milieu LB, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse stérile. Ensuite, le contenu de l'anse a été transféré dans 10 ml d'eau physiologique stérile et la suspension bactérienne a été homogénéisée à l'aide du vortex. L'opacité de cette suspension doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique comprise entre 0,08 et 0,12 lue à une longueur d'onde de 625 nm qui correspond à 108 UFC/ml.

### 3.3. Préparation des disques

Des disques de 6 mm de diamètre en papier Whatman N°=1 ont été préparés et autoclavés pendant 20 minutes à 120°C.



### 3.4. Application du test

Dans chaque boîte de Pétri contenant le milieu LB stérile, 1 ml de suspension bactérienne de densité équivalente au standard de 0,5 de Mc Farland (108 UFC/ml) a été ensemencé. L'excédent de l'inoculum a été ensuite éliminé par aspiration. Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre ont été déposés à la surface de la gélose puis imbibés de 5 µl de l'huile essentielle. Ensuite, les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C durant une durée de 18 à 24 heures. Après l'incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres, disque inclus.

Chaque test a été réalisé en deux répétitions.

## 4. Résultats de l'extraction (l'hydrodistillation)

### 4.1. Taux d'humidité

Les taux d'humidité obtenus varient entre 24% et 54% selon l'espèce, cela signifie que la plante est constituée de plus de la moitié d'eau. Le tableau 4 donne les valeurs d'humidité obtenues.

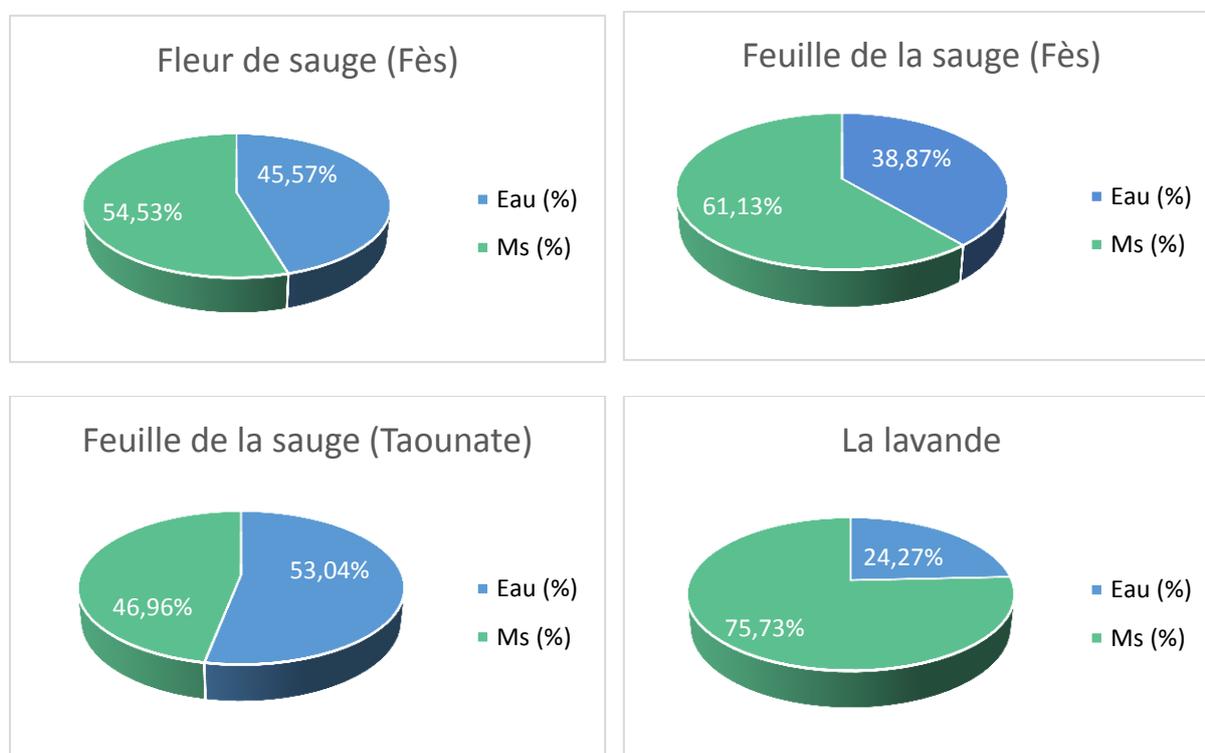


Figure 18 : Teneur en eau des trois plantes



Ces graphiques ci-dessus montrent la teneur en eau dans chacune des plantes :

Les fleurs de la sauge officinale et les feuilles de la sauge officinale de Taounate présentent une proportion considérable en eau (45,57% et 53,04), environ la moitié du poids frais de la plante, par contre la teneur en eau de la sauge officinale de Fès représente le tiers du poids frais. Quant à la lavande stéchade présente une teneur en eau de 24,27% donc un quart du poids frais.

*Tableau 4 : Taux d'humidité des trois plantes*

La plante	Taux d'humidité (%)
La sauge de Fès (la fleur)	45.57
La sauge de Fès (les feuilles)	38.87
La sauge de Taounate (les feuilles)	53.04
La lavande	24.27

Les études bibliographiques montrent que le taux d'humidité des feuilles de la sauge officinale vari d'une région à l'autre comme par exemple les feuilles de la sauge officinale de l'Algérie qui ont un taux d'humidité de 35,47%, comparé à celui des sauges officinales faisant l'objet de notre étude qui est de 38,87% pour la sauge de Fès et 53,04% pour la sauge de Taounate.

Cette différence est dû à de nombreux facteurs, citant par exemple : le climat, la température, le sol, l'altitude,...etc.

## 4.2. Rendement

Les rendements moyens en huiles essentielles obtenus, qui ont été calculés en fonction de la masse du matériel végétal sec, varient sensiblement entre les différentes plantes (tableau 5).

*Tableau 5 : Les rendements des H.E obtenus par l'hydrodistillation*

La plante	Le rendement (%)
La sauge de Fès (la fleur)	1.65
La sauge de Fès (les feuilles)	1.73
La sauge de Taounate (les feuilles)	1.81
La lavande	2.02



- ✓ La lavande stéchade a un rendement plus élevé que la sauge officinale que ça soit la fleur ou la feuille.
- ✓ La sauge de Taounate a un rendement plus important que celle de Fès.
- ✓ Les feuilles de la sauge sont plus riches que les fleurs en huile essentielle.

*Tableau 6 : les rendements des H.E de la sauge officinale des régions différents [72]*

Pays	Tunisie	France	Hongrie	Portugal	Iran
Rendements (%)	1.01	2.05	2.5	2.9	0.9

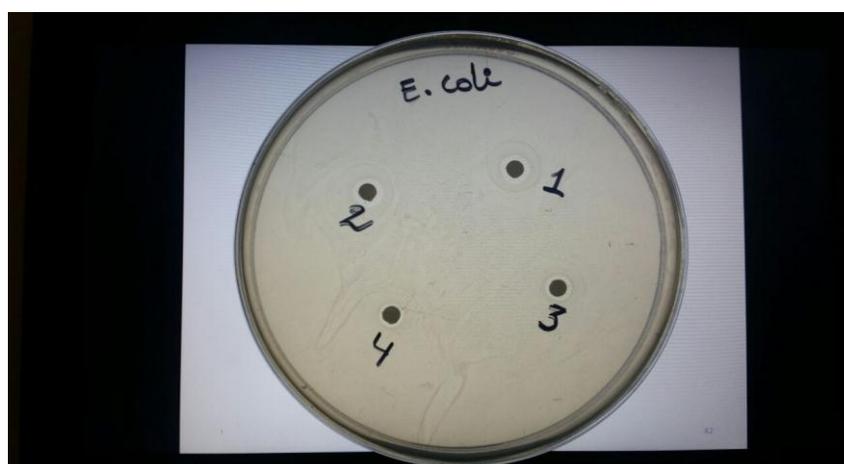
*Tableau 7 : les rendements des H.E de la lavande stéchade des régions différents [73-74]*

Pays	Italie	Turquie
Rendements (%)	2.7	2.16

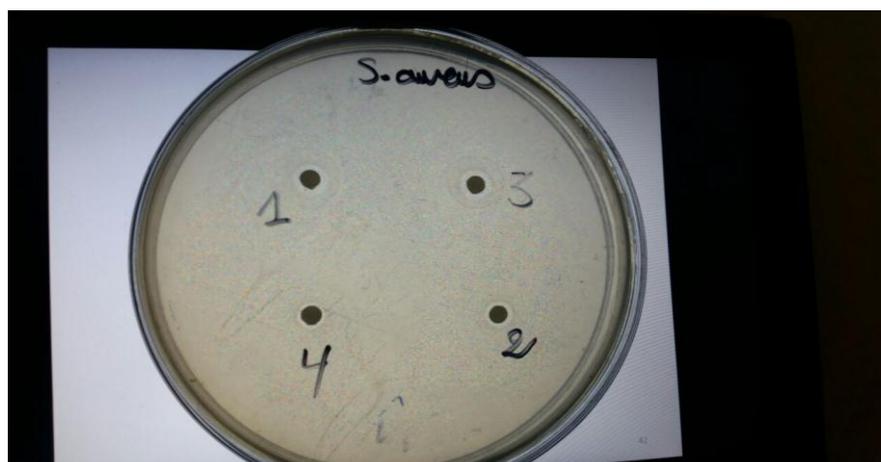
La différence du rendement constatée sur les huiles essentielles investiguées est vraisemblablement à mettre en rapport avec les facteurs abiotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, des facteurs géographique comme l'altitude de la mature du sol.

## 5. Résultats du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles, *S. officinalis* et *L. stoechas*, sont résumés dans le tableau 8.



*Photo 7 : Essai de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des quatre échantillons sur Escherichia Coli*



*Photo 8 : Essai de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des quatre échantillons sur Staphylocoque Aureus*

*Tableau 8 : Diamètres d'inhibition (mm) illustrant l'activité antibactérienne des huiles essentielles*

H.E	E.Coli	S.Aureus
1- <i>L. stoechas</i> de Taounate	10	10
2- <i>S.Officinalis</i> de Fès (les feuilles)	10	9
3- <i>S.Officinalis</i> de Fès (les fleurs)	8	10
4- <i>S.Officinalis</i> de Taounate (les feuilles)	7	8

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *S. officinalis* s'est montrée importante.

D'après les données bibliographiques, les composés majoritaires ( $\alpha$  et  $\beta$  pinène, 1.8 cineole, borneol, limonene, 4- terpinol,  $\alpha$ -terpinol) sont les agents responsables de l'activité antibactérienne de *S. officinalis*.

Le 4- terpinol, l' $\alpha$ -terpinol, le borneol et le linalol sont des alcools terpéniques, ils possèdent une activité antimicrobienne importante après les phénols terpéniques, ils sont connus par leur activité bactéricide plutôt que bactériostatique, car ils agissent comme dénaturants des protéines [75]. Ils sont actifs sur la plupart des bactéries Gram positif et Gram négatif.



Le maximum de l'activité de ces alcools est représenté par 4-terpinol et l' $\alpha$ -terpinol. Le borneol est le moins actif [76].

L' $\alpha$  et  $\beta$ -pinène, limonène sont des hydrocarbures aliphatique monoterpènes, qui ont une activité antibactérienne modérée sur la plupart des bactéries telles que *E.coli* et *S. aureus*.

Les huiles essentielles extraites des feuilles de la *L. stoechas* ont montré une activité inhibitrice plus importante que celle de *S. officinalis*.



## Conclusion

La phytothérapie est une pratique millénaire basée sur un savoir empirique qui s'est transmis et enrichi au fil d'innombrables générations. Selon l'O.M.S, plus de 22000 espèces végétales ont été inventoriées comme plantes médicinales. Leur usage a eu un déclin avec le développement de la chimie de synthèse, toutefois les effets indésirables des médicaments ont ravivé l'intérêt des scientifiques pour les plantes médicinales. C'est aussi que de nouvelles recherches ont vu le jour, notamment de l'espoir de traiter certaines maladies infectieuses par les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques. Parmi lesquelles, la sauge officinale ou *Salvia Officinalis L.* et la lavande stéchade ou *Lavandula stoechas*. Afin d'apporter les preuves de ses innocuités et de rendre ses utilisations plus efficaces, une investigation phytochimique des principes actifs majeurs de cette espèce a été effectuée, l'activité biologique antimicrobienne a été également déterminée. Les résultats obtenus ont montré le fort pouvoir biologique antimicrobien des extraits isolés contre un large panel de souches (*Escherichia Coli* et *Staphylocoque Aureus*) considérées parmi les plus résistants et responsables d'infections graves souvent mortelles.



## Références

- [1] Larousse, Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, Préparation, Soins, **2001**, p.9- 10.
- [2] Sofowara A., Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Ed. Karthala, **2010**, p.5.
- [3] Roulier G., Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes, Ed. Dangles, France, **1992**.
- [4] Bassene E., Initiation à la recherche sur les substances naturelles : Extraction- Analyse- Essais Biologiques, Presses universitaires de Dakkr, **2012**, p.10, ISBN 2-913184-74-2.
- [5] Small E., Catling P.M., Les cultures medicinales canadiennes, NRC Research Press, **2000**, p.2.
- [6] Garreta R., Des simples à l'essentiel: De l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales, Presses Universitaire du Mirail, **2007**, p.1.
- [7] Boisvert C., Plantes et remèdes naturels, Ed. Aubanel, **2003**, p.20.
- [8] Girre L., Les plantes et les médicaments, L'origine végétale de nos médicaments, Ed. Paris. **2006**, p.1.
- [9] El-Hilaly. J, Hmammouchi. M, Lyoussi. B; Ethnobotanical, studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco); Journal of Ethnopharmacology 86 **2003** p.149–158
- [10] Eberhard.T, Robert. A, Annelise. L. plantes aromatiques p. 444, 445, 446
- [11] Fluck, Hans Medicinal Plants. W.Foulsham & Co. Ltd. **1988** ISBN 0-572-00996-8
- [12] Evans, W.C Trease and Evans, Pharmacognosy. 13th edition. Balliere Tindall **1989** ISBN 0-7020-1357-9
- [13] Brown. P, O (A reprint of the long-lost classic) The Complete Herbalist. Newcastle Publishing (Van Nuys, California). Originally published 1875. **1993** ISBN No.0-87877-184-0
- [14] Stuart, M The Encyclopaedia of Herbs and Herbalism. Orbis **1986** ISBN 0-85613-700-6
- [15] Valnet, J. The Practice of Aromatherapy. C.W.Daniel Co. Ltd. **1986** ISBN 0-85207-143-4
- [16] Spiridon E.K ; SAGE, The Genus Salvia, Department of Plant Physiology ,Faculty of Agricultural Biotechnology, Agricultural University of Athens, Greece , copyright **2000**
- [17] Catizone P., Marotti M., Toderi G. & Tétényi P., Coltivazione delle piante medicinali e aromatiche. Pàtron Editore, Bologna **1986**. p.399
- [18] Mohammedi Zohra, ATIK Fawzia. Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de Lavandula stoechas L. **2011**
- [19] Benayad, N. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche au laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse Eclair, Faculté des Sciences de Rabat. **2008**



- [20] Festy D., 100 Réflexes AROMATHERAPIE : Je me soigne avec les huiles essentielles, Pratiques Efficaces et Faciles, Ed Leduc. S, **2008**, p. 6-20.
- [21] René Maurice G., « Aromathérapie- Les huiles essentielles hormones végétales », Librairie des sciences, Giradot &Compagnie, Paris, **1937**.
- [22] Kaloustian J., Hadji- Minaglou F., La connaissance des huiles essentielles : entre sciences et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer-verlag France, Paris, **2012**, p. 5-10
- [23] Fabrocini V&C., Comment se soigner avec L'AROMATHERAPIE et guérir : agitation, anxiété, allergie, asthme, déprime, insomnie, lombalgie, mal de dos, migraines, palpitations, etc. Ed. de vecchi, **2007**, p. 4-17.
- [24] Besombes C., Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Thèse de doctorat, Université de La Rochelle, **2008**, p.289.
- [25] Moro - Buronzo A., Grand guide des huiles essentielles : Santé, Beauté, Bien- Etre, HACHETTE pratique, **2008**, p.14.
- [26] Belaiche P., Traité de la phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1, l'aromatogramme, **1979**, p. 135-147, ISBN 2-224-00520-2.
- [27] Scimeca D., Les plantes du bonheur, Ed. Alpen, **2007**, p.12-17.
- [29] Willem J.P., 60 maux soignés par les huiles essentielles : l'aromathérapie au quotidien pour toute la famille, Les minipockets de santé, **2009**, p.7-17.
- [30] Holley A., Eloge de l'odorat, Ed. Odile Jacob, **1999**, p. 276.
- [31] Nicholas H. J., Phytochemistry Organic Metabolites, Yonkers, New York, Vol. 2, **1973**.
- [32] Paula C. Santos-Gornes and Manuel Fernandes-Ferreira, J. Agric Food Chem. **2001**, 49, 2908-2916.
- [33] Ain Raal Anne Orav and Elmar Arak, Natural Product Research, Vol. 21, No. 5, 1 May **2007**, 406-411.
- [34] Mémoire de fin d'études, Balouiri Mounyr, Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne de trois extraits de Plantes Médicinales et Aromatiques cultivées dans le jardin de l'institut national des plantes médicinales et aromatiques –Taounate, **2011**
- [35] Fabíola Matos, Maria G. Miguel\* and João Duarte et al..., Essential Oil Research, **2009**, Vol. 21, p 327-336
- [36] Itir D and Gulsin.A ; J.Agric. Food Chem. **2004**, 52, 8255-8260
- [37] Melpomni.S, Chedl.A and Eugene.K; Biochemical Systematics and Ecology, **1966**, Vol.24, No.3, pp. 255-260,
- [38] T. Dob, D. Dahmane, M. Agli, and C.Chelghoum; Pharmaceutical Biology, **2006**, Vol. 44, No. 1, pp.60-64.
- [39] Ahmet C. Goren, et al..., Z. Naturforsch. 57c, **2002**, 797-800
- [40] N. Bouzouita et al...; J. Essent. Oil Res., 17, (September/October **2005**), 584-586
- [41] Martinetti P., Mon guide des huiles essentielles, Ed. Lanore, **2013**, p.5-6, ISBN : 978285157733.
- [42] Padrini F., Leucheroni M., La nature des huiles essentielles, Ed. Dexechi, **1997**, p.124.



- [43] Franchomme P., Jollois R., L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles, Ed. Jollois, **2001**.
- [44] Roulier G., Les huiles essentielles pour votre santé, Ed. Dangles, **2000**, p.336.
- [45] Joy Bowes E., The chemistry of Aromatherapeutic Oils, 3rd Edition, **2003**, p. 56.
- [46] Viaud H., Les huiles essentielles et leur distillation. Thérapeutique naturelle, **1993**, p.924.
- [47] L. Duval, "Les huiles essentielles à l'officine," thèse du doctorat, Université de Rouen de médecine et de pharmacie de Rouen, **2012**.
- [48] Sanchez-Moreno C., Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. Food Science and Technology International, **2002**, 8(3): 121- 137
- [49] BESOMBES. C . Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat, **2008**
- [50] LUCCHESI. M. E ; Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes ; Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles ; thèse de doctorat **2005**
- [51] Lehotay, S.J. et Hajslova, J "Application of gas chromatography in food analysis." Trends in Analytical Chemistry, **2002**, 21 : 686-697
- [52] Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A. et Witier, P "Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse." Ed. Masson, Paris, **1995**
- [53] PAOLINI. J; Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone 13 de *Citrus albidus* et de deux *Asteracea* endémiques de corse : *Eupatorium* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*. thèse doctorat **2005**
- [54] Kováts E., Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, in Advances in Chromatography, Chap. 7, **1965**, 229-247
- [55] Van Den Dool H., Kratz P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography, J. Chromatogr., **1963**, 11, 463-471
- [56] FERNANDEZ. X et Daniel CABROL-BASS ; Analyse des arômes ; techniques d'ingénieur
- [57] Benzie I.F.F., Strain J.J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry, **1996**, 239: 70-76.
- [58] Pinchuk I., Shoal H., Dotan Y., Lichtenberg D., Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. Chemistry and Physics of Lipids, **2012**, 165: 638– 647.
- [59] Alam M. N., Bristi N. J., Rafiquzzaman M., Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, **2013**, 21:143–152.
- [60] Badarinath A.V., K. Mallikarjuna R.A., Madhu Sudhana Chetty C., Ramkanth S., Rajan T.V.S, Gnanaprakash K., A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. International Journal of Pharmaceutical Technology, 2(2): 1276-1285.
- [61] PEREZM .E.G ; caractérisation de composés phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune : étude de leur capacité antioxydant ; Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences du bois pour l'obtention du grade de maîtres sciences (M.Se.), **2008**



- [62] Fengel, D., Wegener, G. Wood chemistry ultrastructure reactions. Walter de Gruyter. Berlin. New York. **1984** p 85
- [63] Stevanovic T. Automne. Chimie du bois. CHM-22170. Université Laval. Québec. Canada, **2005** p 6.6-6.20
- [64] Alawa C.B.I., Adamu A.M., Gefu J.O., Ajanusi O.J., Abdu P.A., Chiezey N.P., Alawa J.N., Bawman D.D., In vitro screening of two Nigerian medicinal plants, *Ve rnonia am ygdalina* and *Annonase ne gale nsis*, for anthelmintic activity. Else vie rScie nce , **2003**, 73-81.
- [65] Chaker E.K., Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, Thèse de Doctora université de Toulouse, **2010**, p.70-71.
- [66] Bendahou M., Muselli A., Grignon- Dubois M., Benyoucef M., Desjobert JM., Bernardini AF., Costa J., Antimicrobial activity and Chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential Oil and Extract Obtained by Microwave extraction: Comparison with Hydrodistillation. Food chemistry, **2008**, 106: 132-139.
- [67] Garreta R., Des simples à l'essentiel: de l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales, Presses Université, **2007**, p.308-312.
- [68] Scimeca D., Tétau M., Votre santé par les huiles essentielles : Le guide pratique pour prévenir et guérir tous les maux quotidiennes, les huiles essentielles pour le corps et l'esprit, leur mode d'utilisation, les meilleures associations, Ed. Alpen, **2005**, p.24-26.
- [69] Festy D., Les huiles essentielles ça marche ! Avec 78 formules à commander en pharmacie, LEDUC.S EDITION, **2011**, p. 22-26, ISBN : 978-2- 84899-316-4
- [70] Rhayour. K ; Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, **2002**
- [71] Thèse doctorale, présenté par mme Taleb, extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques de la région de Kabylie (Nord Algérien), **2015**
- [72] FELLAH. S et al : extraction et étude des huiles essentielles de la *salvia officinalis*.l cueillie dans deux régions différentes de la tunisie ; J.Soc.Alger.Chim., **2006**, 16(2), 193-202
- [73] Alberto. A et al...., J. Agric. Food Chem. **2006**, 54, 4364-4370
- [74] Ilhami. G et al...., Food Chemistry 87 (**2004**) 393-400
- [75] Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. In Microbiology. New York: McGraw-Hill International, **1988**, p p. 469-509
- [76] Dorman H.J.Det al: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils; Journal of Applied Microbiology **2000**, 88, 308-316.