



Fès, le 13/10/2012

N° d'ordre 06/12

## THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

M<sup>lle</sup> Nazik MANSOURI

Discipline : Biologie

Spécialité : Biotechnologie

TB  
255

### VALORISATION DES QUATRE PRINCIPALES ESPÈCES DE GENÉVRIERS DU MAROC : CARACTÉRISATION CHIMIQUE ET BIOACTIVITÉ DES HUILES ESSENTIELLES

Thèse présentée et soutenue le Samedi 13 Octobre 2012 à 10h devant le jury composé de :

<b>Pr. Said HALOTI</b>	Faculté des Sciences et Techniques - Fès	<b>Président</b>
<b>Pr. Lahsen EL GHADRAOUI</b>	Faculté des Sciences et Techniques - Fès	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Dr. Badr SATRANI</b>	Centre de Recherche Forestière - Rabat	<b>Co-encadrant</b>
<b>Dr. Mohamed GHANMI</b>	Centre de Recherche Forestière - Rabat	<b>Co-encadrant</b>
<b>Pr. Abdelaziz CHAOUCH</b>	Faculté des Sciences - Kénitra	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Said AMIRI</b>	Ecole Nationale d'Agriculture - Meknès	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Aziz BELGHITI ALAOUI</b>	Faculté des Sciences et Techniques - Fès	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Abdellah FARAH</b>	Institut Nationale des Plantes Médicinales et Aromatiques - Taounate	<b>Examinateur</b>

**Laboratoire d'accueil :** Centre de Recherche Forestière - Rabat

**Etablissement :** Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification





## Résumé de la thèse

Trois volets ont été abordés dans ce travail, à savoir - l'étude phytochimique des différentes espèces des Plantes Aromatiques et Médicinales "PAM" du genre *Juniperus* : *J. thurifera*, *J. oxycedrus*, *J. phoenicea* et *J. communis* - la bioactivité des Huiles Essentielles "HE" extraites par hydrodistillation des rameaux et des fruits - l'évaluation de l'activité antioxydante, *in vitro*, de ces HE, en suivant leur réactivité avec le radical libre 2,2-diphényle-picrylhydrazyle (DPPH).

Les résultats obtenus montrent que l'ensemble des paramètres étudiés : rendement en HE, composition chimique, activités antimicrobienne et antioxydante varie en fonction de l'espèce, la partie de la plante traitée (rameaux ou fruits) et de la provenance de l'échantillon.

Les analyses chromatographiques des HE effectuées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM), montrent que le  $\beta$ -pinène (36,26%) et le sabinène (52,64%) sont les principaux constituants des HE des rameaux de *J. thurifera*, alors que l' $\alpha$ -pinène (34,23 à 89,31%) et le  $\delta$ -3-carène (5,72 à 20,64%) sont majoritaires dans les HE des rameaux et des fruits de *J. phoenicea*. L' $\alpha$ -pinène (52,13%) étant le composé dominant de l'HE des rameaux de *J. oxycedrus* et le sabinène (27,51%) est le constituant majoritaire de celle de *J. communis*.

Les tests d'activité antimicrobienne des HE, vis-à-vis des différentes souches de bactéries, de moisissures et de champignons de pourriture du bois, montrent que toutes les HE testées présentent une action antimicrobienne qui diffère selon la nature du micro-organisme testé et le profil chimique de l'HE étudiée. En outre, nous avons montré que les HE issues de la même partie de la plante mais de provenance différente ne manifestent pas la même activité antimicrobienne. Les HE des rameaux se montrent plus performantes que celles des fruits contre les souches de bactéries et de champignons testés. Les champignons de pourriture du bois sont les plus vulnérables à ces HE.

Par comparaison à un antioxydant de référence le buthylhydroxytoluène (BHT), les HE des quatre espèces étudiées se montrent dotées d'une bonne activité antioxydante.

**Mots clés :** Valorisation, *Juniperus thurifera*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, *Juniperus communis*, Huile essentielle, Composition chimique, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante.

## Abstract

Three parts have been achieved in this work, -The first focused on the phytochemical study of Moroccan juniper : *J. thurifera*, *J. oxycedrus*, *J. phoenicea* and *J. communis* -The second concerned the determination of antibacterial and antifungal activities of essential oils extracted by steam distillation method of branches and berries -The third concerned the evaluation of *in vitro* antioxidant activity of essential oils of these species, according to their reactivity with the free radical 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH).

The results show that all parameters studied, yield of essential oil, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity varies on the species of juniper, sub-species, the portion of the treated plant (branches and berries) and origin of the samples.

Chromatographic analyses of essential oils were accomplished using gas chromatography (GC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). The chromatographic profiles showed that  $\beta$ -pinene (36,26 %) and sabinene (52,64%) are the main constituents of essential oils from branches of *J. thurifera*, the  $\alpha$ -pinene (34,23 to 89,31 %) and  $\delta$ -3-carene (5,72 to 20,64%) are the major constituents of essential oils from branches and berries of *J. phoenicea*, the  $\alpha$ -pinene (52,13%) is the dominant compound of essential oil from branches of *J. oxycedrus*, while sabinene (27,51%) is the major constituent of the essence of *J. communis*.

Tests of antimicrobial activity of essential oils vis-à-vis nine bacteria, three fungi and four fungi decay wood show that all essential oils tested have an antimicrobial action which differs on the microorganism tested and on the chemical profile of essential oil studied. We noted also that the essential oils of the same part of the plant but from different provenances do not show the same antimicrobial activity. It also seems that the essential oils of the branches are more efficient of those of the berries against strains of bacteria and fungal species tested. Thus, fungi decay woods were most vulnerable to these tree species.

The essential oils of four species of juniper have also showed a good antioxidant activity in comparison with the reference antioxidant the buthylhydroxytoluène (BHT).

**Keywords:** Valorization, *Juniperus thurifera*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea*, *Juniperus communis*, Essential oil, Chemical composition, Antimicrobial activity, Antioxidant activity.



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	1
<b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	4
<b>I- Généralités</b> .....	5
1- Classification des espèces de genévriers étudiées .....	9
2- Description botanique des espèces étudiées.....	9
a- Genévrier thurifère .....	9
b- Genévrier de Phénicie .....	12
c- Genévrier Oxycèdre.....	14
d- Genévrier Commun.....	15
3- Utilisation des espèces étudiées en médecine traditionnelle.....	16
<b>II- Présentation des huiles essentielles</b> .....	17
1- Définition et rôle écologique .....	17
2- Localisation et lieu de synthèse.....	17
3- Composition chimique .....	18
a- Terpènes .....	18
b- Composés aromatiques .....	21
c- Composés d'origines diverses.....	21
4- Activité biologique .....	22
5- Aspect économique.....	22
<b>III- Techniques d'extraction des huiles essentielles</b> .....	25
1- Distillation .....	25
a- Hydrodistillation.....	25
b- Vapo-hydrodistillation.....	26
c- Vapo-distillation.....	26
2- Extraction par solvant .....	27
3- Expression à froid.....	28
4- Extraction par CO <sub>2</sub> liquide.....	29
5- Extraction assistée par micro-onde.....	29
6- Enfleurage.....	30
7- Macération .....	30

<b>IV- Méthodes d'analyses des huiles essentielles</b> .....	31
1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	32
2- Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse.....	34
<b>V- Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles</b> .....	36
1- Techniques d'études d'activité antimicrobienne.....	36
a- Technique de micro- atmosphère .....	37
b- Technique de contact direct en milieu solide .....	38
c- Technique de dilution en milieu de culture liquide ou gélosé .....	39
2- Micro-organismes étudiées .....	40
a- Les Bactéries.....	40
b- Les Moisissures .....	42
c- Les Champignons de pourriture du bois.....	42
<b>VI- Propriétés antioxydantes des huiles essentielles</b> .....	43
1- Généralités.....	43
2- Tests d'évaluation d'activité antioxydante des huiles essentielles.....	44
a- Méthode au DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle).....	44
b- Test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	44
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	46
<b>I- Matériel végétal</b> .....	47
1- Echantillonnage.....	47
2- Provenances du matériel végétal.....	47
<b>II- Extraction des huiles essentielles</b> .....	48
<b>III- Humidité et rendement en huiles essentielles</b> .....	50
1- Détermination du taux d'humidité .....	50
2- Calcul du rendement .....	50
<b>IV- Analyses des huiles essentielles</b> .....	50
1- Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) .....	50
2- Identification des constituants des huiles essentielles .....	51
a- Indices Kováts .....	51
b- Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse .....	52
<b>V- Activité antimicrobienne des huiles essentielles</b> .....	53
1- Souches bactériennes et fongiques étudiés .....	53



2- Procédure microbiologique.....	55
a- Préparation des dilutions .....	55
b- Préparation des dilutions successives de l'huile essentielle .....	56
c- Préparation des milieux de culture avec les concentrations finales en HE .....	56
d- Ensemencement et Incubation des boîtes de pétri .....	57
e- Lecture des résultats et détermination de la CMI .....	57
<b>VI- Evaluation du pouvoir antioxydant des huiles essentielles par la méthode</b>	<b>58</b>
<b>au DPPH.....</b>	<b>58</b>
1- Préparation de la solution du DPPH.....	58
2- Préparation des solutions des huiles essentielles .....	58
3- L'essai au DPPH .....	58
4- Expression des résultats.....	59
5- Analyse statistique.....	60
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>61</b>
<b>I- CARACTÉRISATION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DES QUATRE</b>	<b>61</b>
<b>ESPÈCES DE GENÉVRIERS MAROCAINS .....</b>	<b>61</b>
1- Le taux d'humidité.....	63
2- Rendement en huiles essentielles .....	64
3- Composition chimique des huiles essentielles de <i>J. thurifera</i> .....	69
4- Composition chimique des huiles essentielles de <i>J. phoenicea</i> .....	76
5- Composition chimique de l'huile essentielle de <i>J. oxycedrus</i> .....	78
6- Composition chimique de l'huile essentielle de <i>J. communis</i> .....	81
7- Conclusion .....	83
<b>II- ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES HE DES DIFFÉRENTES</b>	<b>83</b>
<b>ESPÈCES .....</b>	<b>83</b>
1- Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>J. thurifera</i> .....	85
2- Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>J. phoenicea</i> .....	88
3- Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>J. oxycedrus</i> .....	90
4- Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>J. communis</i> .....	91
5- Conclusion .....	93
<b>III- EVALUATION DES PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES DES HUILES</b>	<b>93</b>
<b>ESSENTIELLES DES DIFFÉRENTES ESPÈCES ETUDIÉES .....</b>	<b>93</b>
1- Activité antioxydante des huiles essentielles de <i>J. thurifera</i> .....	95

2- Activité antioxydante des huiles essentielles de <i>J. phoenicea</i> .....	97
3- Activité antioxydante de l'huile essentielle de <i>J. oxycedrus</i> .....	97
4- Activité antioxydante de de l'huile essentielle de <i>J. communis</i> .....	98
5- Conclusion .....	100
<b>CONCLUSION GENERALE ET RECOMMANDATIONS</b> .....	104
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	118
<b>ANNEXES</b> .....	