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

Année Universitaire : 2016-2017

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

Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des deux plantes aromatiques et médicinales: Lentisque et Myrte

Présenté par:

BOUAINE Abdechafie

Encadré par:

- ✓ **Pr. HAZM Jamal Eddine**

Soutenu Le 14 juin 2017 devant le jury composé de:

- **Pr. HAZM Jamal Eddine**
- **Pr. BOUAYAD Abdelouahed**
- **Pr. SKALLI Mohammed khalid**

Stage effectué à : Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (LCOA) de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

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

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

Nom et prénom: BOUAINE Abdechafie

Année Universitaire : 2016/2017

Titre: Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des deux plantes aromatiques et médicinales: Lentisque et Myrte

Résumé

Ce travail vise l'étude de l'activité antifongique et la composition chimique d'huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* et de *Myrtus communis*, récoltées dans une région de Taounate.

La teneur moyenne en huile essentielle des feuilles de *Pistacia Lentiscus* et de Myrte sont respectivement 0,13% et 0,98% par rapport à la matière sèche des deux plantes.

La première plante présente le Myrcène (25,3%), Limonène (15,7%) et Terpinèn-4-ol (9,2%) comme constituants majoritaires. L'huile essentielle de Myrte est constituée majoritairement par l'α-pinène (25,03%), 1,8-cinéole (20,75%), Acétate de Myrtényl (15,10%) et Limonène (13,57%). Les tests biologiques ont montré que les deux huiles essentielles sont actives contre tous les micro-organismes testés.

Mots clés : *Pistacia lentiscus*, *Myrtus communis*, Huiles essentielles, Composition chimique, Activité antifongique.

Faculté des Sciences et Techniques - Fès
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES
212 (0) 5 35 60 29 53 Fax : 212 (0) 5 35 60 82 14

Dédicace

*Je remercie tout d'abord le bon **DIEU** « الله », de m'avoir donné la patience et le courage pour bien mener ce travail que je dédie :*

À Mes très chers parents pour leur soutien, leur amour et leur sagesse.

À Mes frères, et mes beaux-frères.

À Mes sœurs et ma belle-sœur.

À ma grande famille, mes amis et collègues sans préciser les noms afin de n'oublier personne pour leurs encouragements et tous ceux et toutes celles que j'ai involontairement omis de citer et qui n'en demeurent pas moins chers.

À ceux qui ont contribué de prés ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Sans oublie tous les professeurs que ce soit de primaire, du moyen, du secondaire, ou de l'enseignement supérieure.

BOUAINE Abdechafie

Remerciements

Louange et Gloire à Dieu, Grand et Miséricordieux, le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.

Nombreux sont qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Nos remerciements vont en particulier à :

Monsieur le professeur OUAZZANI CHAHDI Fouad, responsable du Master Chimie des Molécules Bio-Actives.

Tous nos enseignants pour tous les apports qu'ils ont contribués dans l'accomplissement de notre formation, et aussi d'avoir fourni beaucoup d'efforts du matin au soir en guidant nos pas sur la voie du savoir et du savoir-faire.

Monsieur le professeur HAZM Jamal Eddine qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. J'ai été satisfait de votre qualité exceptionnelle de bon enseignant, merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; je ne peux, Monsieur, que sincèrement vous exprimer mon respect et mon gratitude.

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

Monsieur le professeur BOUAYAD Abdelouahed et **M**onsieur le professeur SKALLI Mohammed khalid d'avoir accepté d'être membres du jury de mon travail. Leurs remarques seront pour moi une source d'enrichissement. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères reconnaissances.

Le Dr. GHANMI Mohamed et le Dr. SATRANI Badr, de Centre National de la Recherche Forestière, Rabat, qui nous ont fournis les analyses chromatographiques. Je les remercie pour leur partage d'information et collaboration.

Nous adressons encore nos remerciements à :

L'ensemble des membres du département de chimie ;

L'ensemble des membres de laboratoire de Chimie Organique Appliquée (LCOA) qui ont contribué par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici mes sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie. Très cordialement.

Table des matières

Liste des figures i
Liste des tableaux ii
Introduction générale 1
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 3
Chapitre I : Chimie des huiles essentielles 4
I.1 Introduction 4
I.2 Qu'est-ce qu'une huile essentielle ? 4
I.3 Localisation des huiles essentielles 4
I.4 Rôle des huiles essentielles pour le règne végétal 4
I.5 Facteurs de variabilité des huiles essentielles 5
I.5.1 Origine botanique 5
I.5.2 Organe producteur 6
I.5. 3 Origine géographique 6
I.6 Méthodes d'extraction 6
I.6.1 Distillation 6
I.6.2 Hydrodiffusion 8
I.6.3 Extraction au CO_2 supercritique 8
I.6.4 Extraction sans solvant assistée par micro-ondes 9
I.6.5 Extraction par solvants volatils 10
I.7 Propriétés physico-chimiques des HE 10
I.8 Composition chimique des huiles essentielles 11
I.8.1 Origine biogénique des huile s essentielles 11
I.8.2 Dérivés du phénylpropane (composés aromatiques) 14
I.9 Méthodes d'analyses des huiles essentielles 15
I.9.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG) 15
I.9.2 Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) 16
I.10 Action biologique, effets thérapeutiques 16
I.11 Utilisation des huiles essentielles 18
I.12 Toxicité des huiles essentielles 18
Chapitre II : Les espèces végétales 19
II.1 Généralités sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) 19
II.2 Description botanique et chimique des plantes étudiées 19
II.2.1 Etude caractéristique de l'espèce *Pistacia lentiscus* 19

II.2.1.1 Classification taxonomique 19
II.2.1.2 Description botanique 20
II.2.1.3 Répartition géographique 21
II.2.1.4 Etude de composition chimique 21
II.2.2 Etude caractéristique de l'espèce *Myrtus communis* 22
II.2.2.1 Classification taxonomique 22
II.2.2.2 Description botanique 23
II.2.2.3 Répartition géographique 23
II.2.1.4 Etude de composition chimique 24
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE 25
Chapitre I : Matériel et Méthodes 26
III.1 Matériel 26
III.1.1 Matériel végétal 26
III.1.2 Equipements 26
III.1.3 Matériel microbiologique 26
III.2 Méthodes 27
III.2.1 Extraction des huiles essentielles 27
III.2.2 Analyse Chromatographique 29
III.2.3 Activité antimicrobienne des huiles essentielles 29
Chapitre II : Résultats et Discussions .....
II.1 Rendement et composition chimique 31
II.1.1 Taux d'humidité 31
II.1.2 Rendement 31
II.1.3 Composition chimique et analyse chromatographique par CPG/SM des HE de deux plantes 32
II.2 Résultats microbiologique 35
II.2.1 Test de sensibilité à l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* 35
II.2.2 Test de sensibilité à l'huile essentielle de *Myrtus communis* 36
Conclusion générale 38
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 39

Liste des figures

Figure 1 : Montage Clevenger 7
Figure 2 : Montage d'extraction des H.E par entrainement à la vapeur d'eau 7
Figure 3 : Schéma explicatif d'hydrodiffusion 8
Figure 4 : Schéma de principe d'extraction par CO_2 supercritique 9
Figure 5 : Montage d'extraction assistée par micro-onde 9
Figure 6 : Montage d'extraction par solvant 10
Figure 7 : Principales étapes de la biosynthèse du diméthylallyl pyrophosphate à partir de l'acétyl CoA 12
Figure 8 : Biosynthèse des terpènes : formation de précurseurs de chaque classe 13
Figure 9 : Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des H.E. 13
Figure 10 : Structure chimique de quelques sesquiterpènes extraits des H.E. 14
Figure 11 : Structure chimique de principaux composés aromatiques (phénols) extraits des H.E. 14
Figure 12 : Photo de *Pistacia lentiscus*: Arbuste, Feuilles, Fleurs et Fruits 20
Figure 13 : Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* autour du bassin Méditerranéen (**Seigue A., 1985**) 21
Figure 14 : Constituants chimiques des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* 22
Figure 15 : Photo d'arbuste du myrte 23
Figure 16 : Distribution de *Myrtus communis* (**Migliore, 2011**) 24
Figure 17 : Constituants chimiques des huiles essentielles de *Myrtus communis* 24
Figure 18 : Dispositif d'hydrodistillation 28
Figure 19 : Teneur en eau des deux plantes 31
Figure 20 : Structure des produits majoritaires de l'HE de *Pistacia lentiscus* 34
Figure 21 : Structure des produits majoritaires de l'HE de *Myrtus communis* 35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Positon taxonomique de *Pistacia lentiscus* 20
Tableau 2 : Positon taxonomique de *Myrtus communis* 22
Tableau 3 : Taux d'humidité des deux plantes 31
Tableau 4 : Rendements des huiles essentielles des deux plantes obtenue par hydrodistillation 31
Tableau 5 : Composition chimique de l'HE de *Pistacia lentiscus* 32
Tableau 6 : Composition chimique de l'HE de *Myrtus communis* 33
Tableau 7 : Résultats du test de sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle de lentisque à différentes concentrations 35
Tableau 8 : Résultats du test de sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle de myrte à différentes concentrations 36

Les produits chimiques synthétiques sont connus pour leurs propriétés cancérogènes. L'application excessive des fongicides de synthèse a été averti suite à leur toxicité et de pollution résiduelle qui en découlent. De même, beaucoup de microorganismes pathogènes peuvent développer des résistances à ces fongicides. Pour cela, la lutte contre les microorganismes est orientée vers l'utilisation des méthodes biologiques.

Cependant, énormément de recherches ont été effectuées sur l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles notamment contre différentes espèces fongiques (**Adebayo et *al.*, 2010; Nagendra et *al.*, 2010**).

Grâce à ses atouts géographiques et climatiques, le Maroc dispose d'une riche flore constituée d'environ 4200 espèces à endémisme très marqué. Les espèces à vertus aromatiques et médicinales sont estimées à 600 espèces dont 80 exploitées.

Actuellement, les plantes aromatiques et médicinales possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles et leurs extraits végétaux dans la médecine, la cosmétique ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. En effet les huiles essentielles représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles riches en composés antimicrobiens et antioxydants sont utilisées pour résoudre le problème d'altération post-récolte liée aux moisissures et éviter la perte en qualité et en quantité des fruits pendant l'entreposage (**Serrano, 2008**).

Aujourd'hui, dans le domaine d'emballage des fruits, la recherche porte sur l'utilisation des composés volatils comme un moyen de base dans les emballages actifs capables de libérer lentement ces substances actives dans l'espace libre avec le temps (**Serrano, 2008**).

C'est dans cette perspective et dans le but de trouver de nouvelles activités antimicrobiennes que nous nous sommes intéressés à étudier deux plantes, poussant à l'état spontané dans notre pays, très répandues dans la région de Taounate, et qui ne sont pas fréquemment employées par la population, Il s'agit des plantes appelées lentisque (*Pistacia lentiscus*) et myrte (*Myrtus communis*).

Notre travail comporte sur deux parties :

La première partie est consacrée pour la synthèse bibliographique qui est composée de deux chapitres principaux :

Le premier chapitre est dédié à l'étude des huiles essentielles.

Le deuxième chapitre portera sur la description botanique des deux espèces (*Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis*).

Dans la deuxième partie, nous présenterons le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude ainsi que les résultats obtenus.

Le travail expérimental se déroule selon deux axes :

- Dans le premier axe, nous avons réalisé l'extraction des huiles essentielles des feuilles des deux espèces.
- Dans le deuxième axe, nous nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir antifongique des huiles essentielles issues des plantes vis-à-vis de trois souches de champignons responsables de pourriture des fruits.

En conclusion, nous avons énuméré les résultats obtenus à travers l'étude chimique des constituants de ces deux plantes ainsi que les perspectives que ce travail laisse à envisager.

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Introduction

Les plantes de façon générale et aromatiques en particulier, se caractérisent par deux types de métabolismes: primaire fournit les constituants de base en quantité élevée. Les plus importants sont les sucres et leurs dérivés, les lipides et les protéines. Le métabolisme secondaire produit des métabolites en faible quantité, mais dont les applications dans différents domaines, en particulier à intérêt pharmaceutique et cosmétique, voir nutritionnel, sont de la plus grande importance. Les huiles essentielles ou essences, font partie de ce groupe de métabolite avec les alcaloïdes et les phénols. Les huiles essentielles sont des mélanges liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance d'une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (**AFNOR, 1986**).

I.2 Qu'est-ce qu'une huile essentielle ?

Une huile essentielle (H.E) peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arome pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour alchimiste. Dans la réalité, une huile essentielle est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit parfumé et volatil, composé de molécules sécrétées par certains arbres et certaines plantes qui lui confèrent un parfum spécifique. Le terme « volatil » s'explique par le fait que les huiles essentielles s'évaporent très rapidement. C'est pourquoi il est nécessaire de les conserver correctement afin qu'elles gardent intacts leurs principes actifs (**Besombes, 2008 ; Belaiche, 1979**). Les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (**AFNOR, 1989 ; Bruneton, 1993**).

I.3 Localisation des huiles essentielles

Les H.E n'existent quasiment, que dans les végétaux supérieurs. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme produits du métabolisme secondaire (**Sanon et *al.*, 2002**). Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graine (**Brunetton, 1987**).

I.4 Rôle des huiles essentielles pour le règne végétal

Nous ne savons pas exactement ce que représentent les H.E pour le règne végétal. Des recherches récentes ont montré que bon nombre d'entre elles ont un rôle défensif pour les plantes (**Anton et *al.*, 2005**).

Les huiles essentielles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales, végétales-animales et pourraient même constituer des supports de communication par des transferts de

messages biologiques sélectifs (**Robert et *al.*, 1993**). En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent les abeilles et des insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes, allopathiques dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles (**Kurt Torssell, 1983 ; Croteau, 1987**). 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 (**Holley, 1999 ; Nicholas, 1973**).

I.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, ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes. Le mot chémotype est dérivé de chimiotype ou chimiovariété.

Une huile essentielle peut contenir de vingt-cinq à cent molécules biochimiques différentes. Ce qui explique la polyvalence d’action des huiles essentielles.

On effectue une chromatographie en phase gazeuse liée à une spectrométrie de masse pour identifier et quantifier chacune de ces molécules et connaître ainsi la composition précise des huiles essentielles.

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

I.5.1 Origine botanique

La certification botanique doit apparaître selon la nomenclature internationale sous son nom latin précisant le genre, l’espèce et la sous-espèce.

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 (**Martinetti, 2013 ; Padrini et *al.*, 1997**). Il existe 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 (**Franchomme et *al.*, 2001**).

I.5.2 Organe producteur

Selon la partie de la plante (feuilles, fleurs…) distillée, il peut exister plusieurs huiles essentielles pour la même plante avec des compositions chimiques et des activités différentes. Par exemple, pour la cannelle de Ceylan, l'huile essentielle peut être extraite de ses feuilles et de son écorce. Ainsi, l'huile essentielle provenant de l'écorce a des propriétés plus marquées que celle extraite des feuilles.

I.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 (**Joy Bowes, 2003**). 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 (**Viaud, 1993**).

I.6 Méthodes d'extraction

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares et précieuses. Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisantes.

Les méthodes d'extraction sont adaptées aux propriétés physiques les plus importantes des huiles essentielles:

- Leur volatilité dans l'air et dans la vapeur d'eau ;
- Leur solubilité dans les solvants organiques.

L'extraction des huiles essentielles se fait par des procédés divers.

I.6.1 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. Le système conçu pour l'opération est appelé **Clevenger** (**figure 1**). Son intérêt majeur réside dans l'utilisation du système de cohobation permettant une distillation en continu sans modifier la quantité en eau du ballon.

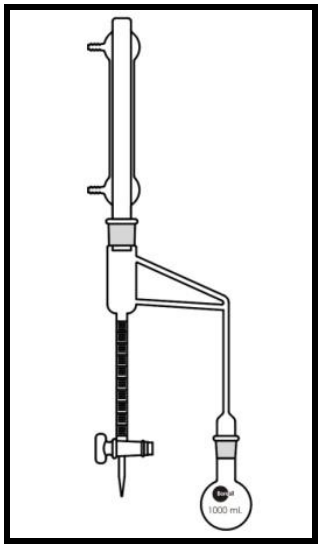

Figure 1 : Montage Clevenger

- **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 (**figure 2**). Les principes volatils sont entrainés par les vapeurs d'eau puis refroidis et enfin séparés de la phase par décantation (**Fabrocini, 2007 ; Moro - Buronzo, 2008**).

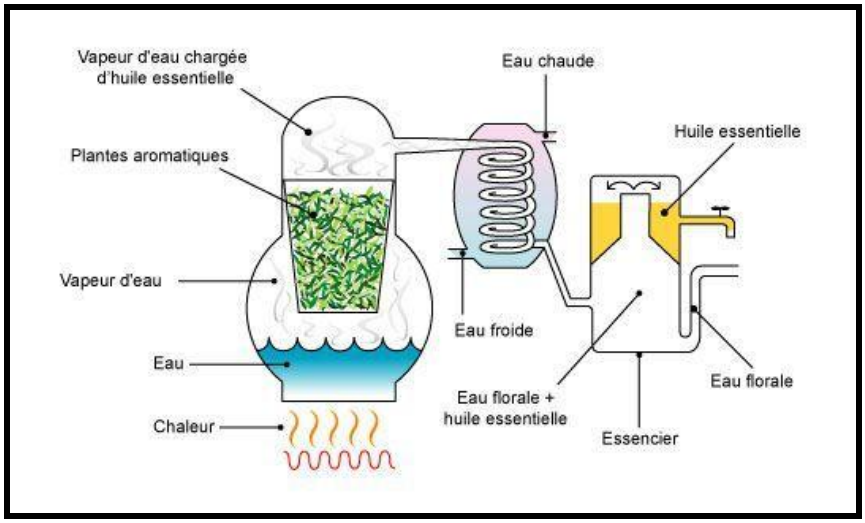

Figure 2 : Montage d'extraction des H.E par entrainement à la vapeur d'eau

I.6.2 Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (**figure 3**). Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale.

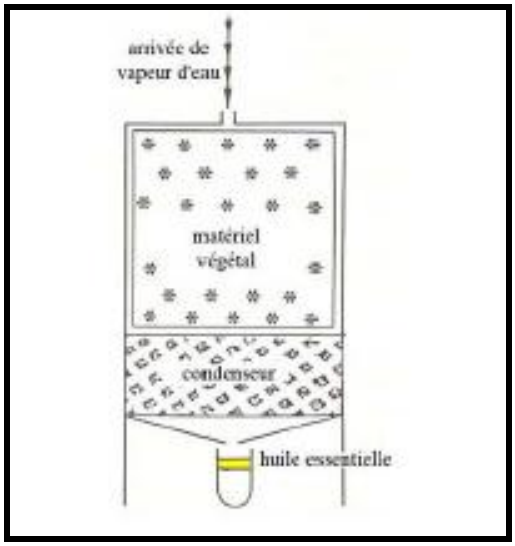

Figure 3 : Schéma explicatif d'hydrodiffusion

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils, et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

I.6.3 Extraction au CO_2 supercritique

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Dans cette technique, un courant de CO_2 à forte pression fait éclater les poches à essence, et entraine les H.E qui seront, ensuite, récupérées (**Scimeca, 2007**).

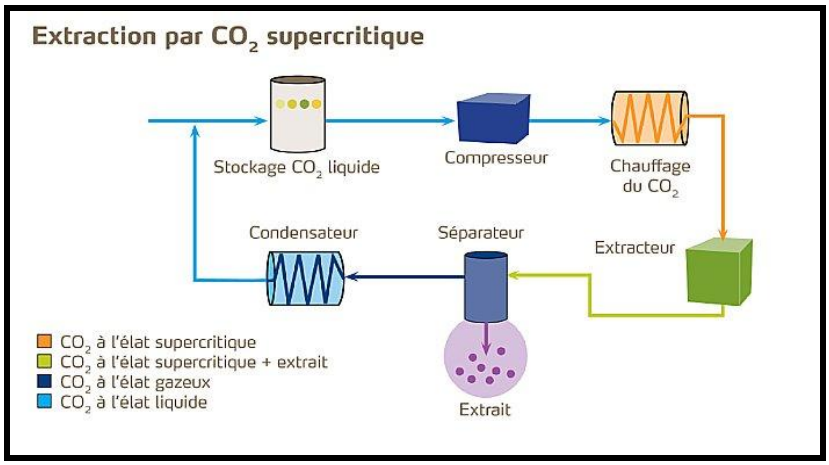

Figure 4 : Schéma de principe d'extraction par CO_2 supercritique

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles (**Martini et *al.*, 1999**). Cette technique est utilisable pour les essences difficilement distillables.

I.6.4 Extraction sans solvant assistée par micro-ondes

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques (**Wang et *al.*, 2006**). Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale.

Le montage obtenu se rapproche sensiblement d'un montage d'hydrodistillation classique (**figure 5**). 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 (**Lucchesi, 2006**).

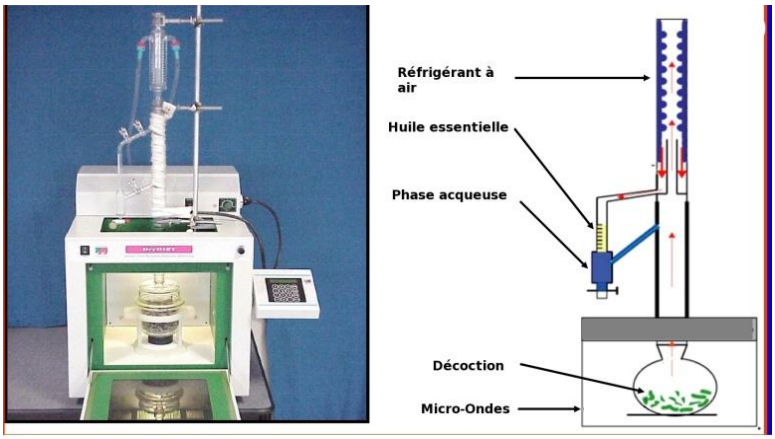

Figure 5 : Montage d'extraction assistée par micro-onde

L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'obtenir un bon rendement d'extrait.

I.6.5 Extraction par solvants volatils

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont : l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone (**Kim et *al.*, 2002**). Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de **Soxhlet** ou un appareil de **Lickens-Nickerson** (**figure 6**).

Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances (**Hubert, 1992**).

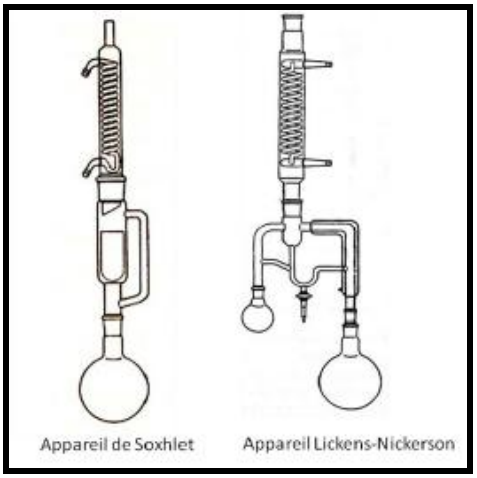

Figure 6 : Montage d'extraction par solvant

I.7 Propriétés physico-chimiques des HE

Les huiles essentielles forment un groupe très homogène (**Bernard et *al.*, 1988**). Ses principales caractéristiques sont:

- Liquides à température ambiante rarement colorées,

- Volatiles, ce qui les différencie des huiles « fixes ».
- Leur point d'ébullition varie de 160 °C à 240 °C.
- Leur densité est inférieure à celle de l'eau (les HE de sassafras de girofle ou de cannelle constituent des exceptions).
- Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée et sont douées d'un pouvoir rotatoire (elles sont soit dextrogyres ou lévogyres).
- Solubles dans les solvants organiques et sont liposolubles mais peu solubles dans l'eau.
- Entrainables à la vapeur d'eau, solubles partiellement dans l'eau (on parle d'eau aromatique).
- Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (**Jacques G. Paltz, 1997**).

I.8 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être classées en plusieurs familles biochimiques. L'activité thérapeutique d'une huile essentielle est liée à sa structure biochimique, aux groupes fonctionnels de ses composés principaux (alcools, phénols, composés terpéniques…) et à leurs actions synergiques.

Les constituants des huiles essentielles appartiennent à deux grands groupes, les terpénoïdes (mono et sesquiterpènes), d'une part et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents d'autre part.

Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (**Bruneton, 1999**).

Les principales familles biochimiques des HE sont présentées ci-dessous :

I.8.1 Origine biogénique des huile s essentielles

❖ **Groupe des terpénoïdes**

Les terpénoïdes constituent un vaste groupe de métabolisme secondaire de structure diverse, important dans de nombreuses interactions biotiques (**Judd et *al.*, 2002**).

C'est le groupe le plus important. Les terpènes sont des molécules organiques constituées par un multiple de 5 atomes de carbone de formule générale $\mathbf{[C_5H_8]_n}$.

Le point de départ de la synthèse des terpènes est **l'isoprène** C_5H_8 dont le précurseur est l'acétyl-CoA. Deux molécules d'acétyl-CoA donnent **l'acéto-acétyl-CoA** ; une troisième molécule ajoutée par condensation, fait apparaître la 3-hydroxy-3-méthylglutaiyl-CoA (HMG-CoA). Ce dernier à son tour, par réduction enzymatique se transforme en mévalonate ou

l'acide mévalonique (MVA) (biogénétiquement, le précurseur universel de tous les terpènes) qui sera converti en **isopentényl diphosphate (IPP)** qui en s'isomérisant donne diméthylallyl pyrophosphate **DMAPP** (**figure 7**).

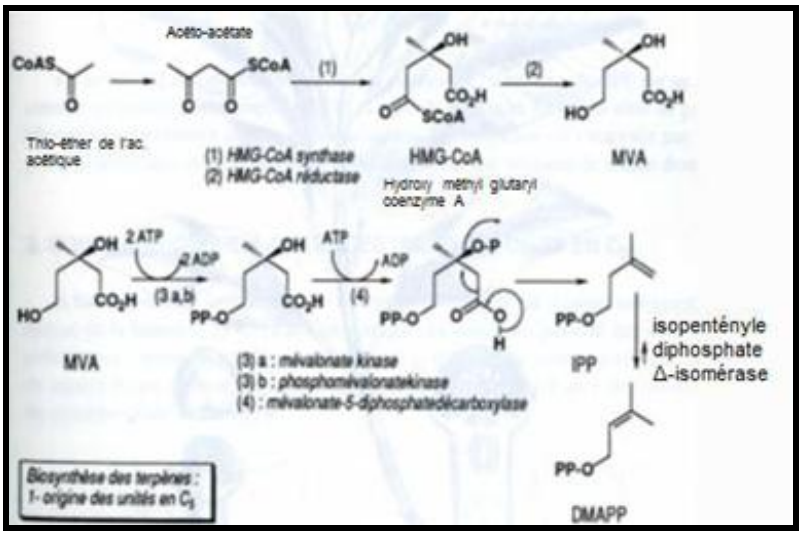

Figure 7 : Principales étapes de la biosynthèse du diméthylallyl pyrophosphate à partir de l'acétyl CoA

Couplage tête-queue **DMAPP+IPP** libère le géranyl pyrophosphate **GPP**, précurseur des monoterpènes en C_{10}. On trouve dans la nature plus de 900 composés.

Couplage tête-queue **GPP+IPP** fournit farnésyl pyrophosphate **FPP,** précurseur des sesquiterpènes en C_{15},

Couplage tête-queue **FPP+IPP** libère le géranylgéranyl pyrophosphate **(GGPP),** précurseur des diterpènes en C_{20}. 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 (**Modzelewska et *al.*, 2005 ; Kaloustian et *al.*, 2012**).

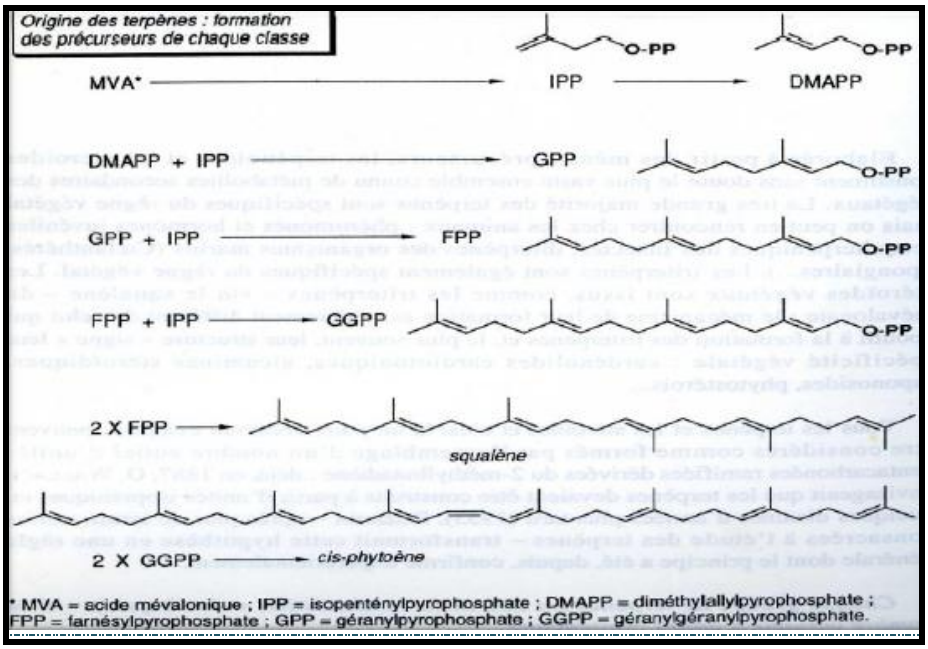

Figure 8 : Biosynthèse des terpènes : formation de précurseurs de chaque classe

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). Ils comportent deux unités isoprène (**C_5H_8**), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques (**Chaumont et *al.*, 1989**).

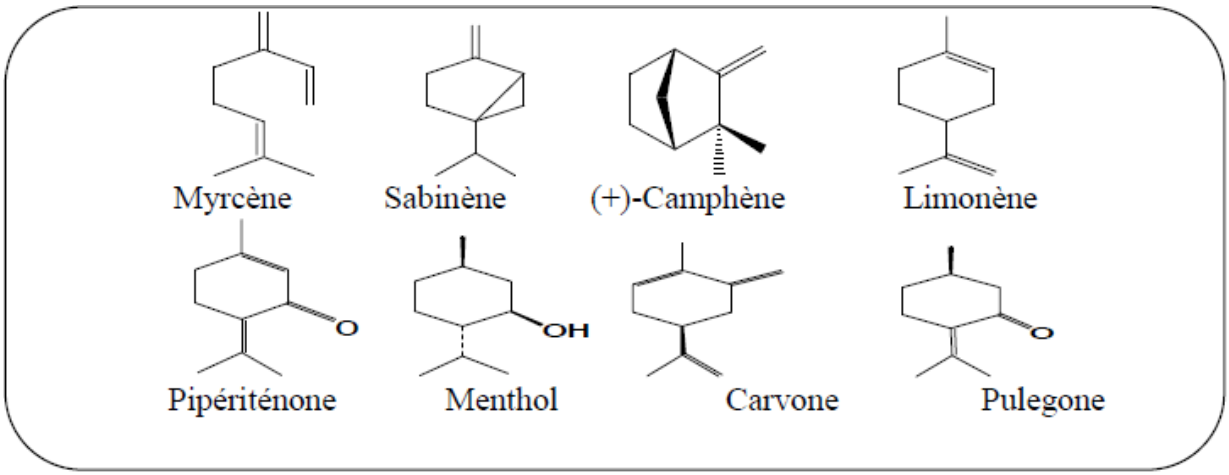

Figure 9 : Structure chimique de quelques monoterpènes extraits des H.E.

Les sesquiterpènes sont des dérivés d'hydrocarbures en **$C_{15}H_{22}$** (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurelles, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

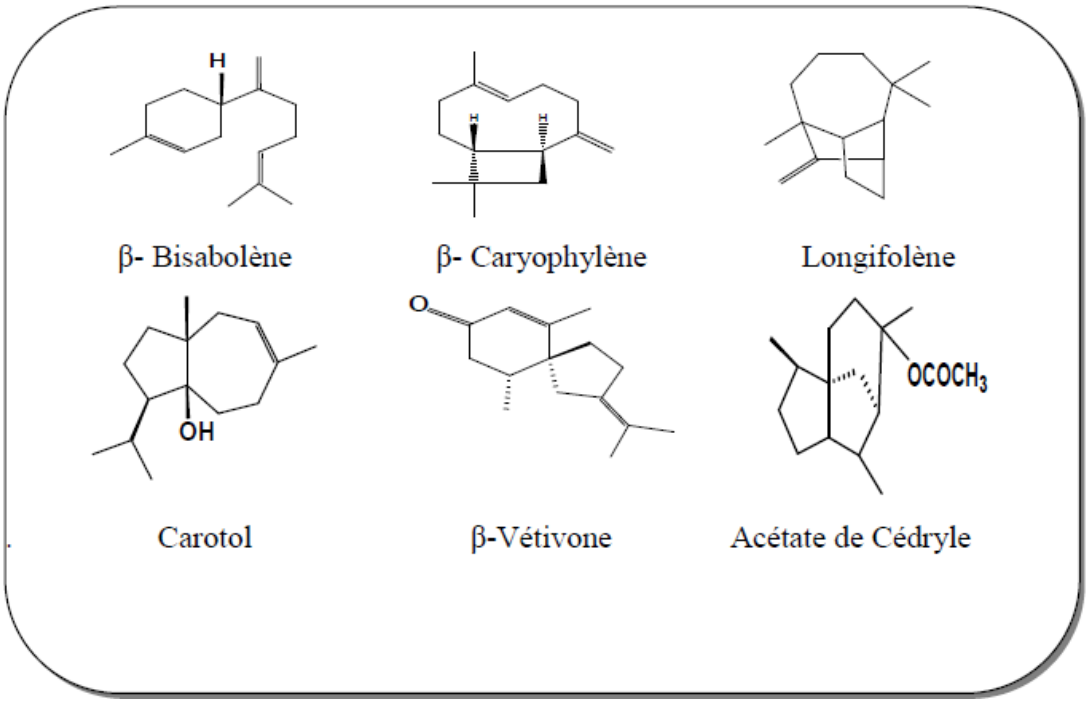

Figure 10 : Structure chimique de quelques sesquiterpènes extraits des H.E.

I.8.2 Dérivés du phénylpropane (composés aromatiques)

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Kurkin, 2003**). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole, le carvacrol et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, de la vanille, de la cannelle, du basilic, de l'estragon, etc. (**Bruneton, 1993**)

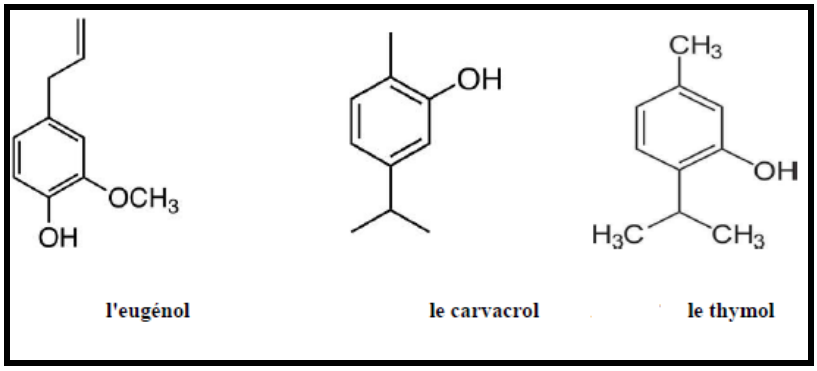

Figure 11 : Structure chimique de principaux composés aromatiques (phénols) extraits des H.E.

I.9 Méthodes d'analyses des huiles essentielles

L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes nous parlons sur les méthodes micro analytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces. Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques.

I.9.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent plus son intérêt (**Rouessac, 2007**). La technique a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants des mélanges très complexes contenant jusqu'à 200 composés (**Cserhati, 1999**). Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur).

Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules (**Scimeca, 2007 ; Burgot, 2011**).

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcanes ou à plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) (**Kováts, 1965**). 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. Les indices de rétention sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsqu'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire). C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarité différente est nécessaire.

Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et une technique d'identification spectroscopique : en général la spectrométrie de masse CPG/SM.

I.9.2 Chromatographie en phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM.

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG/SM, après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique (**De Maack, 1994**). Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse (**Bruneton, 1999 ; Desjobert et *al.*, 1997**). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (IR) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres (**Paolini, 2005**). Lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle sont inconnus dans les bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatoires telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM). L'objectif est d'aboutir à leur identification structurale par les techniques spectroscopiques usuelles : Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-$_1$H) et du carbone-13 (RMN-$_{13}$C), SM,… (**Kurkin, 2003**).

I.10 Action biologique, effets thérapeutiques

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne (**Pellecuer et *al.*, 1980**) ou au niveau de la microflore vaginale (**Viollon, 1993**) et d'origine fongique contre les dermatophytes (**Chaumont et *al.*, 1989**). Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques (**Sivropoulou et *al.*, 1996**) qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

De nombreuses études ont montré que l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés

majoritaires (**Lahlou, 2004**) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant (**Pibiri, 2006**).

La description de quelques principales propriétés thérapeutiques observées lors de l'utilisation des huiles essentielles sont :

- **Des propriétés Anti-infectieuses**

  - ***Antibactériennes***

Les huiles essentielles ont une double action contre les microbes : elles peuvent les tuer (effet bactéricide) et elles en arrêtent la prolifération (effet bactériostatique). Plusieurs travaux montrent que les HE et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (**Carson et Riley, 1995**). L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable (**Tantaoui-Elaraki et *al.*, 1993**).

  - ***Antivirales***

Les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques contenues dans les huiles essentielles, ce qui confère à ces dernières la capacité de combattre certaines pathologies virales. Plus d'une dizaine d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales. Nous pouvons citer l'huile essentielle de Ravintsara.

  - ***Antifongiques***

Les huiles essentielles utilisées pour leurs propriétés antifongiques sont nombreux, cependant la durée du traitement sera plus longue. Par exemple, les huiles essentielles de Cannelle, de Clou de girofle ou de Niaouli sont des antifongiques.

  - ***Antiparasitaires***

Les molécules aromatiques possédant des phénols ont une action puissante contre les parasites. Le thym à linalol et la sarriette des montagnes sont d'excellentes huiles essentielles antiparasitaires.

- **Des propriétés anti-inflammatoires**

Les aldéhydes contenus dans un grand nombre d'huiles essentielles ont la propriété de combattre les inflammations. Un cas exemplaire est celui des huiles essentielles de clou de girofle qui calme les douleurs dentaires.

- **Des propriétés digestives**

Les huiles essentielles ont une action manifeste sur le système digestif. Elles sont efficaces contre la formation de gaz au niveau abdominal (huiles essentielles de basilic, d'anis) et elles

favorisent la formation des sucs gastriques nécessaires à une bonne digestion (huiles essentielles de cumin, d'estragon, de menthe poivrée).

- **Des propriétés antioxydantes**

Depuis une quinzaine d'années, la recherche d'antioxydants naturels ou d'extraits à pouvoir antioxydant a suscité beaucoup d'intérêt. Par conséquent, les huiles essentielles sont considérées comme des ressources potentielles de molécules bioactives naturelles, qui ont été étudiées pour leurs propriétés antioxydantes. Les composés phénoliques, comme le thymol, la carvacrol et l'eugénol font partie des molécules des HE présentant les plus fortes activités antioxydantes ainsi que d'autres composés qui contribuent à cette activité tels que les monoterpènes alcools, cétones, aldéhydes, hydrocarbures et éthers (**Gabriel et *al.*, 2013**).

I.11 Utilisation des huiles essentielles

Traditionnellement, les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de nombreux produits finis destinés aux consommateurs. Ainsi, elles sont utilisées dans l'agroalimentaire (gâteaux, biscuits, soupe, sauce, chewing gum, chocolats, bonbons…) pour aromatiser la nourriture. Elles sont également utilisées dans l'industrie de la parfumerie, de la cosmétique et de la savonnerie. On les utilise aussi dans la fabrication des adhésifs (colle, scotch …), et celle de la nourriture pour animaux, dans l'industrie automobile, dans la préparation des sprays insecticides. L'homéopathie et l'aromathérapie sont des exemples courants d'usage d'huiles essentielles en médecine douce, et leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années (**Bakkali, 2007**).

I.12 Toxicité des huiles essentielles

Plusieurs HE sont connues pour leur toxicité : c'est le cas, par exemple, des essences à anéthol à action convulsivante à forte dose ; il en est de même des essences à thuyone (thuya).

Notons que les essences absorbées seules comme médicaments, en usage interne (aromathérapie), peuvent présenter une certaine toxicité (**Binet et Brunel, 1968**).

Dans le monde actuel des produits naturels, il convient de ne pas utiliser ces substances de façon abusive. Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires, parce que l'efficacité et la toxicité ce n'est souvent qu'une question de quantité (**Scimeca, 2007 ; Lambert, Skandamis et *al.*, 2001**).

II.1 Généralités sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM)

Les vertus de la plus grande partie des plantes médicinales encore utilisées aujourd'hui furent découvertes dès l'antiquité ou le moyen âge. Nombre d'entre elles sont même connues depuis la préhistoire (**Hmamouchi, 1999**). C'est en Inde et surtout en Chine que les plantes médicinales sont les plus utilisées, les plus étudiées et font même l'objet d'une culture réglementée (**Bellakhdar, 1997**).

Lorsqu'on utilise la plante entière plutôt que ses principes actifs isolés, ses différentes parties agissant ensemble sont plus efficaces qu'un dosage équivalent du principe actif extrait de la plante utilisée par la médecine conventionnelle. L'exemple de *Convallaria majalis* (**Mamatas, 1984**) illustre l'effet synergique des produits naturels. En effet, il donne lieu à des usages inattendus grâce à la combinaison naturelle des principes actifs contenus dans la plante entière.

Définitions :

- **Plantes médicinales**

Selon la pharmacopée française (1965), une plante médicinale est utilisée entière ou sous forme d'une partie de plante et qui possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes peuvent aussi avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques.

- **Plantes aromatiques**

Les plantes aromatiques sont définies comme étant des espèces ayant une odeur agréable et non toxique. Elles appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles d'origine végétale, et constituent des sources de substances naturelles complexes, destinées à apporter des caractères organoleptiques particulier aux aliments **(Anton et *al.*, 2005)**.

II.2 Description botanique et chimique des plantes étudiées

II.2.1 Etude caractéristique de l'espèce *Pistacia lentiscus*

II.2.1.1 Classification taxonomique

Originaire du bassin méditerranéen, le lentisque pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les sols en friche. C'est une plante de la famille des Anacardiaceae (**Iserin, 2007**).

Pistachier lentisque est connu sous l'appellation de : ***Darou***, ***dherou*** ou ***drou*** en arabe local, ***lentisque*** et ***arbre au mastic*** en Français et ***lentisk*** en Anglais, c'est un arbre spontané qui pousse sur tout le bassin méditerranéen.

- ✓ ***Nom scientifique :*** *Pistacia lentiscus L.*
- ✓ ***Noms communs :*** Tidikth (nom Berbère), Mastik (nom Latin), Chois Mastic Tree (nom Anglais), Mastic Baum (nom Allemand), Lentisco(Espagnol)
- ✓ ***Appellation local :*** Drou

La classification botanique de la plante est donnée par le **tableau 1**.

Tableau 1 : Positon taxonomique de *Pistacia lentiscus*

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones Vraies Supérieures
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiaceae
Genre	Pistacia
Espèce	*Pistacia lentiscus*

(Guignard et Dupont, 2004 ; Pell, 2004)

II.2.1.2 Description botanique

Pistacia lentiscus est un arbuste à feuilles persistantes, avec des parties mâles et femelles, qui présente une forte odeur de résine, mesurant de 2 à 5 mètres. Il arrive à sa hauteur maximale à 40-50 ans. Dans les zones appropriées, qui lui permettent de pousser librement, il atteint souvent les 7 mètres de haut.

Les feuilles sont alternées, tannées et en forme de plume, avec des pétioles ailés et cinq à six paires de petites feuilles vertes foncées.

Figure 12 : Photo de *Pistacia lentiscus*: Arbuste, Feuilles, Fleurs et Fruits

II.2.1.3 Répartition géographique

National :

Autochtone au Maroc, on le rencontre en plaines, basses et moyennes montagnes, sous bioclimats semi-aride, subhumide, humide et perhumide (**Fennane et *al.*, 2007**) ; les variantes thermiques sont chaude à fraiche et les substrats sont de type marneux ou argileux (**Benabid, 2000**). Du point de vue étage de végétation, le lentisque s'encarte en infra méditerranéen et thermo méditerranéen (**Aafi et *al.*, 2002 ; Benabid, 2000**). Quant à sa biogéographie, il se rencontre en Atlas saharien, Anti-Atlas, Haut Atlas, Moyen Atlas, Rif, Maroc atlantique moyen, Maroc atlantique nord, monts de l'oriental et littoral de la méditerranée (**Fennane et *al.*, 2007**).

International :

Pistacia lentiscus est un arbuste dioïque d'origine méditerranéenne, résineux et aromatique à croissance très lente, très répandu dans les garrigues, maquis, versants rocailleux secs, clairières, sur tous types de sol. Il pousse sur tout le bassin méditerranéen (**figure 13**). En France, contrairement au pistachier térébinthe, le pistachier lentisque ne quitte pas la zone méditerranéenne et s'éloigne peu du littoral, sauf dans quelques vallons chauds. Il est très répandu en Corse. Avec l'olivier sauvage, le myrte et la salsepareille, il constitue un fourré impénétrable qui est une formation typiquement méditerranéenne, mais qui est très combustible (**Polese, 2010**).

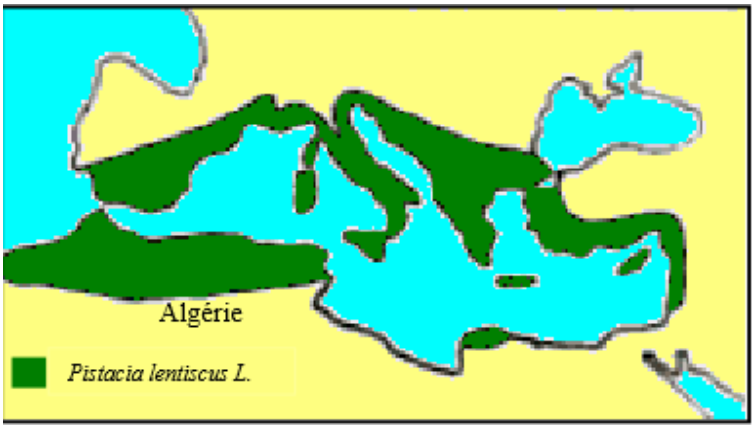

Figure 13 : Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* autour du bassin Méditerranéen (Seigue A., 1985)

II.2.1.4 Etude de composition chimique

- Huiles essentielles

L'étude bibliographique sur les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* a montré la richesse en monoterpènes et les sesquiterpènes.

Les principaux composés (**figure 14**) sont α-pinène (9.4-24.9%) et limonène (9.0- 17.8%), tandis que germacrene D (2.7-13.5%), terpinén-4-ol (6.8-10.6%), *p*-cymene (0.5-7.5%), ß-pinène (2.0-6.9%), sabinene (1.0-6.7%), γ -terpinene (3.1-3.6%) et de l' α-terpinéol (2.5-4.0%) sont également présents à des pourcentages relativement élevés (**Gardeli et coll, 2008**).

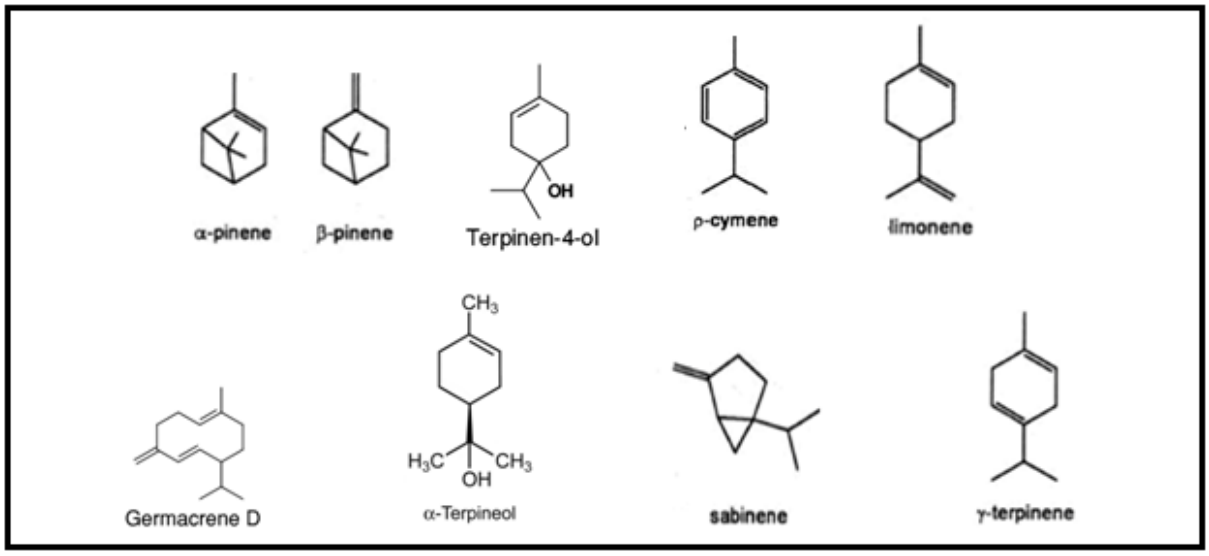

Figure 14 : Constituants chimiques des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus*

II.2.2 Etude caractéristique de l'espèce *Myrtus communis*

II.2.2.1 Classification taxonomique

- ✓ **Nom scientifique:** *Myrtus communis L.*
- ✓ **Arabe:** Riḥane.
- ✓ **Français:** herbe du lagui, myrte commun.
- ✓ **Anglais:** common myrtle, Greek myrtle, myrtle, sweet myrtle.

Tableau 2 : Positon taxonomique de *Myrtus communis*

Taxonomie	Description
Règne	Plante
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Dicotyledones
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	Myrtus
Espèce	*Myrtus communis*

(Goetz et Ghedira, 2012)

II.2.2.2 Description botanique

Figure 15 : Photo d'arbuste du myrte

Le myrte (*Myrtus communis L.*) est un arbuste toujours vert, de 2 à 3 mètres de hauteur et dont la longévité pourrait dépasser les 300 ans (**Migliore, 2011**), répandu sur tout le littoral méditerranéen, dans les maquis et les garrigues.

Le myrte se caractérise par des branches rougeâtres qui sont très ramifiées et ses feuilles sont persistantes, opposées deux à deux, très rarement verticillées par trois, oblongues-aiguës, sans dents ni poils, coriaces, luisantes, brièvement pétiolées. Elles sont vert-foncé, aromatiques et l'on peut remarquer des poches sécrétrices, visibles par transparence. Elles mesurent généralement 1 à 3 cm de long pour environ 0,5 cm de large.

La floraison peut débuter à partir de mai/juin et s'étale jusqu'en août sous la forme de fleurs blanches, fortement odorantes, sont disposées à l'aisselle des feuilles. Le fruit, est de couleur noir bleuâtre à maturité, est ovoïde et charnu. La pleine maturité de ces fruits est atteinte au mois de novembre. Les graines sont réniformes, luisantes, couleur ivoire, et de saveur résineuse.

Toutes les parties de la plante contiennent des poches schizogènes à huile essentielle, responsables de son odeur suave (**Fournier, 1948 ; Montastier, 1997**).

Le genre Myrtus est à la fois le type botanique d'une grande famille végétale, mais aussi son seul genre qui soit indigène en Méditerranée et au Sahara (**Rameau et *al.*, 2008**).

II.2.2.3 Répartition géographique

Le myrte commun pousse au niveau de la mer à 500-800 m d'altitude (**Rameau et *al.*, 2008**), il se développe au sein des matorrals thermophiles.

Le myrte pousse à l'état sauvage en Corse, au Maroc, en Tunisie et dans les Balkans. On récolte les feuilles de myrte de mai à septembre en laissant les deux tiers sur l'arbre pour préserver sa productivité.

Figure 16 : Distribution de *Myrtus communis* (Migliore, 2011)

II.2.1.4 Etude de composition chimique

Les principaux composants actifs de l'huile essentielle de *Myrtus communis* (**figure 17**) sont des monoterpènes (α-pinène), des alcools monoterpéniques (linalol), des esters monoterpéniques (acétate de myrtényle) et des oxydes terpéniques (1,8-cinéole).

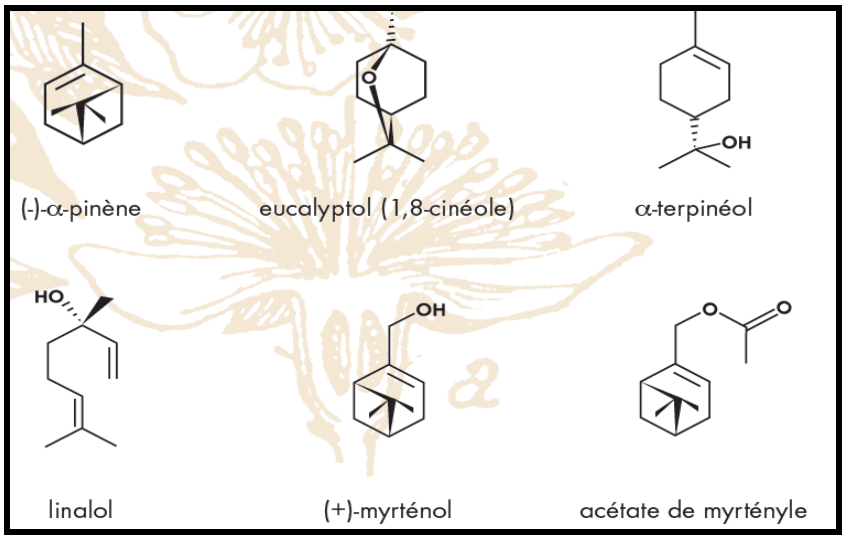

Figure 17 : Constituants chimiques des huiles essentielles de *Myrtus communis*

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

III.1 Matériel

III.1.1 Matériel végétal

Les feuilles de deux plantes aromatiques et médicinales utilisées : Lentisque *(Pistacia lentiscus)* et Myrte (*Myrtus communis*) sont récoltées dans la région de Taounate au mois de mars.

III.1.2 Equipements

Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse et ensuite par chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par spectrométrie de masse pour la détermination de leur composition.

Ces analyses chromatographiques ont été effectuées au laboratoire de microbiologie du Centre de recherche forestière de Rabat sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Hewlett Packard (série HP 6890), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0,25 mm) avec une épaisseur du film de 0,25 µm, d'un détecteur FID réglé à 260 °C et alimenté par un mélange de gaz H_2/air et un injecteur split− splitless réglé à 275 °C. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/50, débit : 66 ml/min). Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml/min. La température de la colonne est programmée de 50 à 250 °C à raison de 4 °C/min. L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP ChemStation », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs indices de Kovats (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett- Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS, l'épaisseur du film est de 0,25 µm. La température de la colonne est programmée de 50 à 250 °C à raison de 4 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixe à 1,5 ml/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/70, débit 112 ml/min). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98.

III.1.3 Matériel microbiologique

L'activité antimicrobienne des deux huiles essentielles a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du Centre de recherche forestière à Rabat, vis-à-vis de trois

souches fongiques : *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Aspergillus niger*. Ces souches fongiques ont été choisies pour les dégâts considérables qu'ils causent aux aliments. Elles sont régulièrement entretenues par repiquage sur le milieu nutritif Malt pendant 7 jours, à 25 °C et à l'obscurité.

III.2 Méthodes

III.2.1 Extraction des huiles essentielles

Il y a plusieurs méthodes d'extractions des H.E citées dans la littérature (voir la partie bibliographique).

Dans ce travail l'extraction a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger.

Principe de l'hydrodistillation

Le principe de l'hydrodistillation est le suivant (**Bagard et Simon, 2008**) :

- La substance contenant l'espèce volatile à extraire est mélangée avec de l'eau et l'ensemble est porté à ébullition.
- La phase gazeuse, contenant l'espèce volatile et la vapeur d'eau, arrive en haut de la colonne, passe dans le réfrigérant et se condense.
- Le résultat d'hydrodistillation est le distillat. Ce dernier comporte alors deux phases liquides, que nous pouvons séparer par décantation.

Description de la technique d'hydrodistillation

La matière végétale (100 g des feuilles des plantes) est introduite dans un ballon de 1000 ml avec 350 ml d'eau. La mise en marche du chauffage se fait à douce ébullition. Le réfrigérant est mis en fonction en réglant le débit d'eau. La vapeur condensée obtenue conduit à une phase organique (huile essentielle). Après condensation et liquéfaction, l'huile surmontant l'eau (non miscible) est séparée de l'eau, puis récupérée à l'aide d'une pipette pasteur. Après extraction, le volume d'huile essentielle obtenu a été mesuré puis conservé dans un flacon en verre bien bouché jusqu'à son usage pour les tests chimiques et biologiques.

Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'être retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant (sulfate de magnésium anhydre) : C'est l'opération de séchage. Puis nous récupérons la phase organique. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans des flacons opaques en verre fermés et conservée à l'obscurité à 4 ° C jusqu'à l'analyse. Le rendement en huile essentielle a été exprimé en ml/100 g de matière sèche. Les essais ont été répétés 3 fois.

Le montage de l'hydrodistillation est représenté ci-dessous (**figure 18**).

Figure 18 : Dispositif d'hydrodistillation

Humidité (teneur en eau) (H %)

L'humidité est la quantité d'eau contenue dans un échantillon quelconque et qui disparait sous l'effet du chauffage, elle est quantifiée en masse perdue d'huile par dessiccateur à l'étuve dans des conditions déterminées (un séchage isotherme à une température de 103°C ± 2°C) (ISO 662, 1998).

Principe :

Le taux d'humidité est calculé à partir de la différence de poids d'une prise d'essai avant et après séchage à l'étuve à une température de 103°C ± 2°C pendant 24 heures.

Mode opératoire :

- Peser le cristallisoir vide (M0)
- Prise d'essai de 10g de l'échantillon (M1)
- Soumettre à l'étuve, le cristallisoir contenant l'huile à une température de 103°C pendant 24 heures.
- Reprendre le cristallisoir et le refroidir dans un dessiccateur.
- Procéder à une dernière pesée (M2)

Expression des résultats :

$$H(\%)=\frac{M1-(M2-M0)}{M1}\times 100$$

M0 : Masse du cristallisoir vide en grammes.

M1 : Masse de la prise d'essai en grammes.

M2 : Masse du cristallisoir contenant l'échantillon après chauffage en grammes.

Détermination des rendements des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est exprimé par le volume d'huile en millilitres obtenu pour la masse de 100 gramme de matière végétale sèche par la relation suivante :

$$Rdt\ (\%) = \frac{V}{ms} \times 100$$

Rdt (%) : rendement en huiles essentielles.

V : volume d'huiles essentielles recueilli (ml).

m_S : masse végétale sèche (g).

III.2.2 Analyse Chromatographique

L'analyse chromatographique sert à identifier les différents constituants d'une huile essentielle, afin de connaitre la composition chimique, la nature et la proportion des divers constituants.

La combinaison des techniques d'analyses CPG/SM permet de séparer les composants de l'échantillon et d'identifier chaque composant, donc de faire une analyse complète (**Bentaali, 2003**).

La chromatographie en phase gazeuse sépare des fractions moléculaires composant l'échantillon en se basant sur la vitesse de déplacement et le temps de rétention mis pour parcourir une colonne capillaire.

L'identification des composés a été réalisée par calcul des indices de rétention (RI) ou indices de Kovats (KI) et ont été comparés avec ceux des spectres de masse dans les banques de données, (**Adams, 2001**).

III.2.3 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Nous avons testé l'effet antimicrobien de deux huiles essentielles (*Pistacia lentiscus* et *Myrtus communis*) sur la croissance de trois souches fongiques selon la procédure microbiologique suivante :

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode rapportée par **Remmal et *al.* (1993)** et **Satrani et *al.* (2001)**. Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2% afin de favoriser le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10e, 1/25e, 1/50e, 1/100e, 1/200e, 1/300e et 1/500e dans cette solution d'agar. Dans des tubes à essais contenant chacun 13,5 ml de milieu

gélosé à l'extrait de malt (2%), stérilises à l'autoclave (20 minutes a 121 °C) et refroidis à 45 °C, on ajoute 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000 et 1/5000 (v/v). Puis on agite convenablement les tubes avant de les verser dans des boites de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2% seule, sont également préparés.

L'ensemencement se fait par dépôt de fragments de 1 cm^2 de diamètre, prélevés à partir de la périphérie d'un tapis mycélien et provenant d'une culture de sept jours dans l'extrait de malt. L'incubation se fait à l'obscurité pendant sept jours à 25 °C. Chaque essai est répété trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

II.1 Rendement et composition chimique

II.1.1 Taux d'humidité

Le **tableau 3** donne les valeurs d'humidité obtenues.

Tableau 3 : Taux d'humidité des deux plantes

Plante	Taux d'humidité (%)
Lentisque	49,6
Myrte	51,45

Les graphiques ci-dessous montrent la teneur en eau dans chacune des plantes :

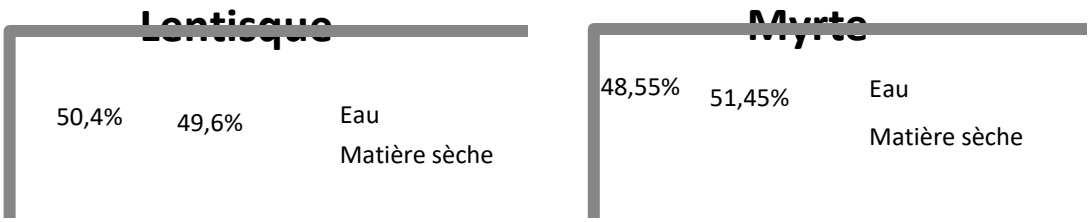

Figure 19 : Teneur en eau des deux plantes

Les feuilles des deux plantes présentent une proportion considérable en eau (49 ,6% et 51,45%), cela signifié qu'environ la moitié du poids frais de la plante est constituée d'eau.

II.1.2 Rendement

Le rendement d'extraction exprimé en pourcentage, est calculé par le rapport de la quantité d'HE extraite sur la quantité de la plante.

Les résultats de calcul des rendements obtenus lors de l'hydrodistillation sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Rendements des huiles essentielles des deux plantes obtenue par hydrodistillation

Plante	Lentisque	Myrte
Rendement (%)	0,13	0,98

Le lentisque présente un rendement en huile essentielle peu faible. Il a fallu plusieurs hydrodistillations pour obtenir une quantité à analyser. Ceci corrobore les résultats trouvés par **Amhamdi et *al.* (2009)** qui étaient de l'ordre de 0,14%. Cette faible teneur serait probablement due à l'âge de la plante, au mode d'extraction, à la période et à l'endroit de

récolte, à la partie de la plante utilisée sans négliger la nature même de cette plante aromatique. En termes de valeurs, le rendement en H.E. de Myrte est significativement meilleur par rapport au rendement obtenu en H.E. avec la plante de *Pistacia lentiscus*.

II.1.3 Composition chimique et analyse chromatographique par CPG/SM des HE de deux plantes

L'identification des produits a été faite en comparant leurs indices de rétention et spectres de masse avec ceux des composés de référence de la littérature emmagasinés dans la base de données de l'appareil. En effet, les analyses chromatographiques des huiles essentielles ont permis d'identifier 34 composés qui représentent environ **85,3%** pour *Pistacia lentiscus* (voir **tableau 5**), contre 43 composés (**86,98%**) pour *Myrtus communis* (voir **tableau 6**).

Tableau 5 : Composition chimique de l'HE de *Pistacia lentiscus*

N°	KI	Constituants	Pourcentage (%)
1	939	α-pinène	1,6
2	953	Camphène	0,1
3	980	β-pinène	2,8
4	**991**	**Myrcène**	**25,3**
5	1005	α-phéllandrène	3,2
6	1018	α-terpinène	1,7
7	1026	P-cymène	1,5
8	**1031**	**Limonène**	**15,7**
9	1033	1,8-cinéole	1,3
10	1040	(E)-β-ocimène	3,4
11	1088	α –Terpinolène	2,3
12	1098	Linalol	1,2
13	1143	Camphor	0,7
14	**1177**	**Terpinèn-4-ol**	**9,2**
15	1183	P-cymène-8-ol	0,9
16	1189	α-terpinéol	3,5
17	1291	2-undecanone	0,2
18	1352	α-cubebène	0,1
19	1376	α-copaène	0,3
20	1391	β-bourbonène	0,2
21	1395	β-elemène	0,5
22	1403	Méthyl eugénol	0,1
23	1418	Z-caryophyllène	0,3
24	1432	β-gurjunène	2,6
25	1438	Epi-Bicyclosesquiphéllandrène	0,4
26	1454	α-humulène	0,6
27	1461	Allo-aromdendrène	0,2
28	1477	γ-muurolène	0,1
29	1480	D-germacrène	2,3

30	1499	α-muurolène	t
31	1524	γ-cadinène	2,7
32	1538	α-cadinène	0,5
33	1581	Caryophyllène oxide	0,2
34	1664	Humulène Epoxyde	0,2
		Total	**85,3**

IK : Indice de Kovàts ; **N°** : Numéro de composé.

L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est composée principalement de **Myrcène** (**25,3%**), **Limonène** (**15,7%**) et **Terpinèn-4-ol** (**9,2%**). A côté de ces constituants, on note la présence de α-terpinéol (3,5%), (E)-β-ocimène (3,4%) et α-phéllandrène (3,2%). Tandis que les résultats chromatographiques de l'huile essentielle de même espèce trouvée chez **Djenane et *al.* (2011)** renferme principalement Myrcène (15.18%) et 1,8-Cinéole (15.02%) sur un total de 57 composés (98,69%).

Tableau 6 : Composition chimique de l'HE de *Myrtus communis*

N°	KI	Constituants	Pourcentage (%)
1	931	α-thujène	0,11
2	**939**	**α-pinène**	**25,03**
3	953	Camphène	0,01
4	976	Sabinéne	0,37
5	980	β-pinène	0,17
6	991	Myrcène	0,09
7	1005	α-phéllandrène	0,19
8	1018	α -terpinène	0,03
9	**1031**	**Limonène**	**13,57**
10	**1033**	**1,8-cinéole**	**20,75**
11	1040	(E)- β -ocimène	0,09
12	1062	γ-terpinène	1,67
13	1088	Terpinolene	0,07
14	1098	Linalol	2,51
15	1134	Terpin-1-ol	0,01
16	1139	Trans pinocarvéol	0,11
17	1140	Verbenol	0,30
18	1177	Terpinèn-4-ol	0,16
19	1189	α-terpinéol	1,15
20	1194	Myrténol	1,13
21	1255	Géranéol	0,07
22	1257	Linalyl acétate	0,31
23	1270	Géranial	0,10
24	1282	Verbényl acétate	0,87
25	1295	Bornyl acétate	0,13
26	**1335**	**Acétate de Myrtényl**	**15,10**
27	1337	Carvyl acétate	0,13
28	1339	δ-elemène	0,09

29	1340	Terpinyl-4-acétate	0,13
30	1344	Terpinyl acétate	0,15
31	1350	α-terpinyl acétate	0,30
32	1376	α-copaène	0,19
33	1383	Géranyl acétate	0,98
34	1401	Méthyl eugénol	0,17
35	1418	β-caryophyllène	0,30
36	1441	δ-patchoulène	0,07
37	1454	α-humulène	0,01
38	1482	Citronnellylisobutyrate	0,01
39	1493	Viriflorène	0,11
40	1514	Géranylisobutyrate	0,03
41	1520	Isobornyl-2-méthyl Butyrate	0,11
42	1529	Citronnellyl n-butyrate	0,11
43	1562	Géranyl n-butyrate	0,03
		Total	**86,98**

L'huile essentielle de *Myrtus communis* est composée principalement de **α-pinène** (**25,03%**), **1,8-cinéole** (**20,75%**), **Acétate de Myrtenyl** (**15,10%**) et **Limonène** (**13,57%**) qui représentent environ les trois quarts de la composition chimique totale accompagnés d'autres constituants a des teneurs relativement faibles. Cependant le profil chimique de cet échantillon est différent du travail entrepris par **Djenane et *al.* (2011)** qui ont pu identifiées 17 composés (95,98%) dont le composé majoritaire est de 1,8-Cinéole avec une concentration plus forte (46,98%) que celle représentée dans le présent travail (20,75%) suivi par le Cis-Geraniol (25,18%).

Les structures chimiques de **Myrcène** (**25,3%**), **Limonène** (**15,7%**) et **Terpinèn-4-ol** (**9,2%**) identifiés comme composés majoritaires de l'HE de *Pistacia lentiscus*, sont rapportés sur la **figure 20**. Ces composés majoritaires représentent 50,2% de la composion chimique.

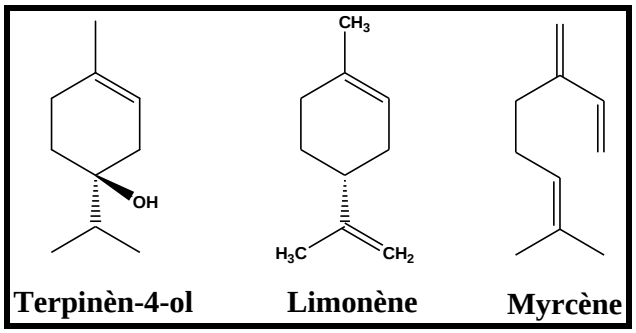

Figure 20 : Structure des produits majoritaires de l'HE de *Pistacia lentiscus*

L'**α-pinène** (**25,03%**), **1,8-cinéole** (**20,75%**), **Acétate de Myrtényl** (**15,10%**) et **Limonène** (**13,57%**) ont été identifiés comme composés majoritaires de l'HE de *myrtus communis* (**figure 21**).

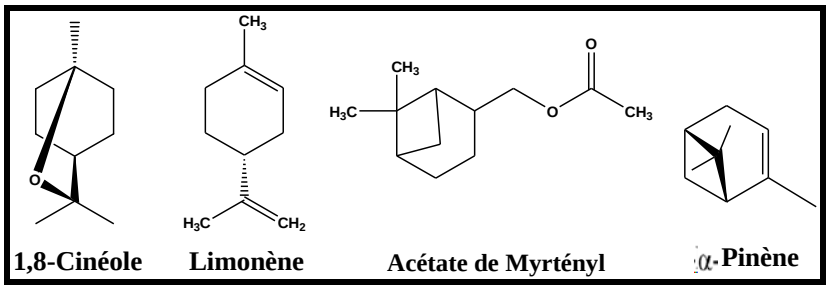

Figure 21 : Structure des produits majoritaires de l'HE de *Myrtus communis*

La comparaison de nos résultats avec la littérature montre des différences qualitatives et quantitatives considérables dans la composition chimique. Ces variations peuvent être dues à plusieurs facteurs tels que les paramètres écologiques, l'espèce végétale et son patrimoine génétique (**El Ajjouri et *al.*, 2010**).

II.2 Résultats microbiologique

II.2.1 Test de sensibilité à l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*

Les résultats du test de sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle de lentisque par la méthode de dilution dans la solution d'agar-agar (0,2%) sont représentés dans le **tableau suivant :**

Tableau 7 : Résultats du test de sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle de lentisque à différentes concentrations

v/v	1/100	1/200	1/300	1/500	1/1000
Aspergillus niger	–	–	–	+	+
Penicillium expansum	–	–	–	+	+
Penicillium digitatum	–	–	–	+	+

(-) absence de croissance ; (+) présence de croissance

Les résultats de l'activité antifongique de l'HE de lentisque ont montrés que les trois souches testées ont la même sensibilité vis-à-vis cette essence, elles ont été inhibées à la même concentration (1/300v/v).

L'efficacité antimicrobienne d'huile essentielle de lentisque est due à un certain nombre des composants fonctionnant en synergie (**Derwich et *al.*, 2010**).

L'α-pinène et le β-pinène sont bien connus comme produits chimiques ayant des potentiels antimicrobiens. Cependant, l'activité antifongique d'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est due à l'α-pinène qui se présente en quantité appréciable dans cette huile. Un autre composé «

le linalol » possède aussi une large gamme d'activité antibactérienne et antifongique (**Imelouane et *al.*, 2009**).

II.2.2 Test de sensibilité à l'huile essentielle de *Myrtus communis*

Le test de sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle de myrte par la méthode de dilution dans la solution d'agar-agar (0,2%) sont représentés dans le **tableau suivant :**

Tableau 8 : Résultats du test de sensibilité des souches fongiques à l'huile essentielle de myrte à différentes concentrations

v/v	1/100	1/200	1/300	1/500	1/1000
Aspergillus niger	_	_	_	+	+
Penicillium expansum	_	_	+	+	+
Penicillium digitatum	_	_	_	+	+

(-) absence de croissance ; (+) présence de croissance

Les résultats de l'activité antifongique de l'HE de myrte ont montrés que les deux souches *Aspergillus niger* et *Penicillium digitatum* testées ont la même sensibilité vis-à-vis cette essence, elles ont été inhibées à la même concentration (1/300v/v), alors que pour *Penicillium expansum* elle a été inhibée dans une concentration de (1/200v/v).

L'activité antifongique de l'huile essentielle de myrte peu être due à ses constituants majoritaires: 1,8-cinéole (éther), α-pinène et limonène (monoterpènes) mais aussi à ses constituants minoritaires: Myrténol, Linalol, Géraniol (alcools terpéniques) et Méthyl eugénol (phénol).

Les résultats obtenus de l'activité antifongique de *Myrtus communis* sont en accord avec des travaux antérieurs. En effet, Plusieurs travaux (**Rasooli et *al.*, 2002**) indiquent que les huiles essentielles riches en monoterpènes tels que l'α-pinène et le limonène qui sont parmi les composants majeurs du *Myrtus communis* possèdent une forte activité antifongique sur divers champignons.

Selon **Randrianarivelo (2008)**, les constituants minoritaires sont également connus pour leur activité antimicrobienne. Les alcools, les aldéhydes et les esters peuvent contribuer à l'effet antimicrobien global des huiles essentielles (**Derwich et *al.*, 2010**).

Globalement comme le montre les résultats obtenus, l'effet des huiles essentielles des deux plantes aromatiques testées sur les champignons varie en fonction de la concentration utilisée. Ainsi, ces huiles essentielles montrent une grande sensibilité vis-à-vis les trois souches

fongiques à la même concentration minimale inhibitrice (CMI) sauf pour *Penicillium expansum* qui est plus résistante à l'HE de *Myrtus communis*.

Donc les deux huiles sont riches en monoterpènes qui sont très connus pour leurs activités antimicrobiennes. Selon **Derwich et *al.* (2010)**, l'activité antimicrobienne des monoterpènes est expliquée par la présence des groupes d'hydroxyles phénoliques capables de former des liaisons hydrogènes avec les emplacements actifs des enzymes de la cellule ciblée.

La méthode de conservation des aliments est un paramètre très recherché par le consommateur. Des recherches portées sur l'efficacité des huiles essentielles sur certains agents d'altération fongique ont montré le grand intérêt des huiles essentielles dans la conservation des aliments. Pour notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés microbiologique de deux plantes, poussant à l'état spontané : le lentisque et le myrte récoltées dans la région de Taounate en Mars 2017.

Les huiles essentielles des deux plantes, extraites par hydrodistillation, en utilisant le dispositif Clevenger, sont obtenues avec des rendements quantitatifs comparables aux travaux antérieurs. L'application de la chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM) comme moyen d'analyse, nous a permis l'identification de 34 et 43 composés pour le lentisque et le myrte respectivement. Nous avons montré que le Myrcène (25,3%), Limonène (15,7%) et Terpinèn-4-ol (9,2%) sont les constituants majeurs de l'huile essentielle de lentisque. Alors que l'α-pinène (25,03%), 1,8-cinéole (20,75%), Acétate de Myrtényl (15,10%) et Limonène (13,57%) sont les composés prédominants de l'huile essentielle de myrte.

Les résultats de l'activité biologique montrent que les deux huiles essentielles ont exercé un effet synergique contre les souches fongiques à une concentration bien précise. Ce qui nous amène à dire que nos huiles sont dotées d'une activité antifongique importante sur les champignons testés. Les performances antifongiques mises en évidence méritent d'être étudié avec plus de détails afin d'envisager des perspectives d'application de ces essences comme agents de bio-conservation capables de réduire la croissance mycélienne responsable de pourriture des fruits.

Cette étude confirme l'intérêt des H.E. offrant ainsi un patrimoine à préserver, à développer et à valoriser, dans la mesure où nos résultats constituent, avec ceux des études réalisées auparavant, une base essentielle en faveur de leur exploitation dans l'industrie agroalimentaire.

- **Aafi A., Taleb MS., Fech tal M, 2002.** Espèces Remarquables de la Flore du Maroc, Rabat: Édition MCEF : 146 p.
- **Adams R.P., 2001.** Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, Allured, Illinois, 455p.
- **Adebayo C. O et Aderiye B. L., 2010.** Antifungal activity of bacteriocins of lactic acid bacteria from some Nigerian fermented foods. Research Journal of Microbiology. 5, 1070-1082.
- **AFNOR, 1986.** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- **AFNOR, 1989.** Recueil de normes françaises, « huiles essentielles ». AFNOR, 3ème Edition, Paris : 609.
- **Amhamdi H., Aouinti F., Wathelet JP., Elbachiri A, 2009.** Chemical Composition of the Essential Oil of Pistacia Lentiscus L. From Eastern Morocco, Rec. Nat. Prod : Vol. 3, No. 2, 90- 95.
- **Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522.
- **Bagard S., Simon N., 2008.** Physique-Chimie, Tout-en-un, Bréal, p.128.
- **Bakkali F., 2007.** Biological effects of essential oils – A review, Food. Chem., Toxicol.
- **Belaiche P., 1979.** Traité de la phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1, l'aromatogramme, p. 135-147, ISBN **:** 2-224-00520-2.
- **Bellakhdar J., 1997.** la pharmacopée marocaine traditionnelle.
- **Benabid A, 2000.** Flore Et Écosystèmes Du Maroc: Évaluation Et Préservation De La Biodiversité, Paris: Editions Ibis Press : 359 p.
- **Bentaali, B., 2003.** « Méthodes et techniques d'analyses physique » 1ere Edition, pp 277-280.
- **Bernard T., Periau F., Brav O., Delmas M. & Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles. Chimie et Technologie. Information chimie.
- **Besombes C., 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Thèse de doctorat,Université de La Rochelle**,** p.289.
- **Binet P. et Brunel J. P., 1968.** « Phisiologie végétale », Doin, Paris, pp 774-782.

- **Bruneton J., 1987.** Elément de phytochimie et pharmacognosie, Paris : Lavoisier - Tech. & doc, 584.
- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. Paris, France: Lavoisier. 278-279p.
- **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- **Burgot G., Burgot J. L., 2011.** Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques, 3ème Edition Tec & Doc Lavoisier, p.10, **ISBN** : 978-2-7430-1337-0.
- **Carson C.F. & Riley T.V., 1995.** « Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Melaleuca alternifolia » J. Appl Bacteriol, 78(3): 264-269.
- **Chaumont J.P., Leger D., 1989.** Plant Med. Phyto, 23, 124.
- **Croteau R., 1987.** Chem. Rev., 87, 929.
- **Cserhati T., Forgacs E., 1999.** Chromatography in food science and technology, CRC Press, p.1.
- **De Maack F.** et **Sablier M., 1994.** Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniques d'analyse. Référence: P2614.
- **Derwich E., Manar A. et Benziane Z., 2010.** GC/MS Analysis and In vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Leaf of Pistacia lentiscus Growing in Morocoo. World Applied Sciences Journal. 8, 1267-1276.
- **Desjobert J. M**., **Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F., 1997.** Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. Analysis; 25 (6) : 13-16.
- **Djenane D., J. Yanguela, L. Montanés, M. Djerbal and P. Roncales, 2011.** Antimicrobial activity of Pistacia lentiscus and Satureja montana essential oils against Listeria monocytogenes CECT 935 using laboratory media ; efficacy and synergistic potential in minced beef. Food Control, 22, 1046-1053.
- **El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Amarti F., Rahouti M., Aafi A., Ismaili R. et Farah A., 2010.** Composition chimique et activité antifongique des huiles

essentielles de Thymus algeriensis Boiss. & Reut. et Thymus ciliatus (Desf.) Benth. Contre les champignons de pourriture du bois.

- **Fabrocini V&C., 2007.** Comment se soigner avec L'AROMATHERAPIE et guérir : agitation, anxiété, allergie, asthme, déprime, insomnie, lombalgie, mal de dos, migraines, palpitations, etc. Ed. de vecchi, p. 4-17.
- **Fennane M., Ibn Tattou M., Ouyahya A., El Oualidi J, 2007.** Flore Pratique du Maroc: Manuel de Détermination des Plantes Vasculaires. Travaux de l'Institut Scientifique, Rabat, série botanique : Vol. 2, No. 38. p 250.
- **Fournier P., 1948.** Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Encyclopédie Biologique, Ed. Lechevalier, tome III, p.64.
- **Franchomme P., Jollois R., 2001.** L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles, Ed. Jollois**.**
- **Gabriel I., Alleman F., Dufourcq V., Perrin F., Gabarrou J-F- 2013,** INRA Productions Animales, 26 (1), 13-24.
- **Gardeli, C., Papageorgiou, V., Mallouchos, A., Theodosis, K., Komaitis, M., 2008.** Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methalonic extracts. Food Chemistry 107, 1120-1130.
- **Goetz, P., Ghedira, K., 2012.** Phytothérapie anti-infectieuse. France, Paris: Springer-Verlag. pp. 313-318.
- **Guignard, J.L., Dupont, F., 2004.** Botanique : Systématique moléculaire, 13eme édition. Paris : Masson.
- **Hmamouchi M., 1999.** les plantes médicinales et aromatiques marocaines.
- **Holley A., 1999.** Eloge de l'odorat, Ed. Odile Jacob, p. 276.
- **Hubert R.**, **1992.** Epices et aromates, Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris.
- **Imelouane B., Elbachiri A., Ankit M., Benzeid H et Khedid K., 2009.** Physico-Chemical Compositions and Antimicrobial Activity of Essential Oil of Eastern Moroccan Lavandula dentate. International Journal of Agriculture & Biology. 11, 113-118.
- **Iserin.P, 2007.** Larousse des plantes médicinales. Ed: Larousse, p. 250.
- **Jacques G. Paltz s.a., 1997.** « Le fascinant pouvoir des huiles essentielles ». Fascicule du laboratoire "Jacque Paltz".
- **Joy Bowes E., 2003.** The chemistry of Aromatherapeutic Oils, 3rd Edition, p. 56.

- **Judd., Campbell., Kellogg., Stevens., Janvier 2002.** « Botanique systématique – une perspective phylogénétique ». Edition De Boeck-université.
- **Kaloustian J., Hadji-Minaglou F., 2012.** La connaissance des huiles essentielles : qualitologie et aromathérapie entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer- verlag France, Paris, p. 17,160, ISBN : 978-28178-0308.
- **Kim N.S., Lee D.S., 2002.** J. Chrom A., 982, 31.
- **Kováts E., 1965.** Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System, in Advances in Chromatography, Chap. 7, 229- 247.
- **Kurkin V.A., 2003.** Chem. Nat. Compd. 39,123.
- **Kurt Torssell B.G., 1983.** Natural Products Chemistry. John Willy & Sons Limited. 401 p.
- **Lahlou M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research, 18: 435-448.
- **Lambert R. J. W., Skandamis P. N., et *al.*, 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J App Microbiol; 91(3): 453-62.
- **Lucchesi M.E., Décembre 2006.** Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à L'extraction des Huiles Essentielles Thèse de Doctorat, p. 16-59.
- **Mamatas S., 1984.** La pharmacognosie appliquée, Ed. Phytoscience, le pharmacien de France, p.286.
- **Martini M. C., M. Seiller, 1999.** Editions Tec & Doc, Editions médicales internationales Paris. Lavoisier, 563.
- **Martinetti P., 2013.** Mon guide des huiles essentielles, Ed. Lanore, p.5-6, ISBN : 978285157733.
- **Migliore, J., 2011.** Empreintes des changements environnementaux sur la phylogéographie du genre Myrtus en méditerranée et au sahara. Thèse de doctorat, Université paul cézanne d'Aix-Marseille III. Pp.66-117.
- **Modzelewska A., Sur S., Kumar K.S., Khan S.R., 2005.** Sesquiterpenes : Natural products that decease cancer growth.Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents, 5: 477-499.
- **Montastier F., 1997.** Le Myrte - Myrtus communis L. (Myrtaceae). Thèse de doctorat en Pharmacie, UPS Toulouse III, n° 2018.

- **Moro - Buronzo A., 2008.** Grand guide des huiles essentielles : Santé, Beauté, Bien-Etre, HACHETTE pratique, p.14.
- **Nagendra Prasad M. N., Shankara Bhat S et Sreenivasa M. Y., 2010.** Antifungal activity of essential oils against Phomopsis azadirachtae-the causative agent of die-back disease of neem. Journal of Agricultural Technology. 6, 127-133.
- **Nicholas H. J., 1973.** Phytochemistry Organic Metabolites, Yonkers, New York, Vol. 2.
- **Padrini F., Leucheroni M., 1997.** La nature des huiles essentielles, Ed. Dexechi, p.124.
- **Paolini J., 2005.** Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(ie et ic) et RMN du carbone-13 de cistus albidus et de deux asteraceae endemiques de corse : eupatorium cannabinum subsp. corsicum et doronicum corsicum. Thèse de doctorat.
- **Pell, S.K., 2004.** Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). Thèse de Doctorat. St Andrews Presbyterian College, p. 207.
- **Pellecuer J., Jacob M., B. de Simeon, Dusart G., Attisso M., Barthez M., Gourgas L., Pascal B. et Tomei B., 1980.** Plant. Méd. Phytothér.
- **Pibiri M.C., 2006.** Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, p. 28-52.
- **Polese, J-M., 2010.** Arbres & Arbustes de Méditerranée. Ed: Edisud, p. 85
- **Rameau, J. C., Mansion, D., Dume, G. & Gauberville, C., 2008.** Flore forestière française. Guide écologique illustré. Région méditerranéenne (Vol. 3) Paris: Institut pour le développement forestier. 771 p.
- **Randrianarivelo R., Sarter S., Odoux E., Brat P., Lebrun M., Romestand B., Menut C., Andrianoelisoa H. S., Raherimandimby M et Danthu P., 2008.** Composition and antimicrobial activity of essential oils of Cinnamosma fragrans. Food Chemistry. 114, 680-684.
- **Rasooli I., Moosavi M. L., Rezaee M. B et Jaimand K., 2002.** Susceptibility of Microorganisms to Myrtus Communis L. Essential Oil and its Chemical Composition. J. Agric. Sci. Technol. 4, 127-133.
- **Remmal A. et al., 1993.** Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. J. Essent. Oil Res., 5(2), 179-184.

- **Robert H., Waterman K.M., Peter G., 1993.** Longman Scientific and Technical, U.K.
- **Rouessac F., Rouessac A., Brooks S., 2007.** Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Ed. JohnWiley and Sons, p.31.
- **Sanon A., Garba M., Auger J., Huiganrt J., 2002.** Journal of Stored Products Research, 38, 129.
- **Satrani B. et *al.*, 2001.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Satureja calamintha et Satureja alpina du Maroc. Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol., 94(956), 241-250.
- **Scimeca D., 2007.** Les plantes du bonheur, Ed. Alpen**,** p.12-17.
- **Seigue A., 1985.** Le foret circumméditerranéenne et ses problèmes. Ed : Maisonneuve and larose Paris ,502p.
- **Serrano M. A., Martı´nez-Romero D., Guille´n F., Valverde J. M., Zapata P. J., Castillo S et Valero D., 2008.** The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits. Trends in Food Science & Technology. 19, 464-471.
- **Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T. and Arsenakis M., 1996.** J. Agric. Food Chem., 44, 1202.
- **Tantaoui-Elaraki A., Ferhout H & Errifi A. 1993.** « Composition and antimicrobial activity of the essential oils of Thymus », Broussonettii, T.zygis and T.satureioides. J. Essent. Oil. Res. 5: 45-53.
- **Viaud H., 1993.** Les huiles essentielles et leur distillation. Thérapeutique naturelle, p.924.
- **Viollon C., Chaumont J.P., Leger D., 1993.** Plant. Méd. Phytothér., 26, 17
- **Wang Z., Li L., Ding T., Zhou X., Wang L., H. Zhang, L. Liu, Y. Li, Z. Liu, Wang H., Zeng H., He H., 2006.** J. Chrom. A, 1102.