



Année Universitaire : 2011-2012

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Titre

Effet de molécules bioactives extraites de plantes médicinales sur les germes pathogènes isolés des denrées alimentaires

Présenté par:

BAHIAOUI Fatima Zahra

Encadré par:

Structure d'accueil :

- Dr. A. EL OUALI LALAMI (LRDEHM)
- Dr. L. BENNANI (LRDEHM)
- Pr. H. GRECHE (INPMA)

Structure d'origine :

- Pr. J. HAZEM (FST-Fès)
- Pr. A. OULMEKKI (FST-Fès)

Soutenu Le 20 Juin 2012 devant le jury composé de:

- Pr. J. HAZEM (FST-Fès)
- Pr. A. OULMEKKI (FST-Fès)
- Dr. A. EL OUALI LALAMI (LRDEHM)
- Dr. L. BENNANI (LRDEHM)
- Pr. H. GRECHE (INPMA)

Stage effectué au sein de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA) et au Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM).



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

Nom et prénom: BAHIAOUI Fatima Zahra

Année Universitaire : 2011/2012

Titre: Effet de molécules bioactives extraites de plantes médicinales sur les germes pathogènes isolés des denrées alimentaires

Résumé

Ce travail a pour objectif, la mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites des feuilles et du bois de Genévrier thurifère, Genévrier rouge, Cyprès de l'Atlas et du Thymus riatarum. Ces huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation et leur composition chimique a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS). Les huiles de Genévrier thurifère, Genévrier rouge, Cyprès de l'Atlas et Thymus riatarum ont fourni un rendement de (0,6%), (0,9%), (0,2%) et (1,1%) respectivement. La composition chimique des huiles essentielles précédentes montre que les huiles essentielles extraites des feuilles possèdent comme molécule majoritaire le α -pinène avec 13,2% pour Genévrier thurifère, 34,23% pour Genévrier rouge et 23,5 % pour Cyprès de l'Atlas. L'étude du pouvoir antibactérien par la méthode de l'antibiogramme a confirmé certaines propriétés que possèdent ces huiles essentielles. En effet, ces dernières ont montré un effet inhibiteur important sur la bactérie *Staphylococcus aureus*, alors que les autres souches (*Escherichia. Coli* et *Salmonelle spp*) se sont montrées résistantes.

Suivant les résultats obtenus nous pouvons prédire que ces huiles essentielles ont des activités antibactériennes intéressantes.

Mots clés : Genévrier thurifère, Genévrier rouge, Cyprès de l'Atlas, Huile essentielle, Thymus riatarum, Activité antibactérien.

Sommaire

Introduction.....2

Revue bibliographique



I- Les plantes aromatiques et médicinales :	5
I-1. Aperçu historique :	5
II-Généralités sur les huiles essentielles :	6
II.1- Définition : :	6
II.2- Propriétés générales des huiles essentielles : :	7
III-Méthodes d'extraction des huiles essentielles :	7
III.1- Enfleurage : :	7
III.2- Distillation: :	7
III.2.1- Entraînement à la vapeur d'eau : :	7
III.2.2- Hydrodistillation : :	8
III.3- Extraction par expression :	9
III.4- Extraction par solvant : :	9
III.5- Extraction par gaz supercritiques :	10
III.6- Extraction par micro-ondes:	11
IV-Composition chimique des huiles essentielles :	12
V- Identification des huiles essentielles :	15
V.1- CPG-SM :	15
V.2- Chromatographie liquide sur colonne-CPG-SM :	15
VI-Activité biologiques des huiles essentielles:	16
VI.1- Activité antibactérienne : :	17
VI.2- Mécanisme d'action : :	17
VII-Les techniques d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles :	18
VII.1- Techniques en milieu solide : Méthode de diffusion:	18
VII.1.1- Méthode des disques :	18
VII.1.2- Méthode des puits :	19
VII.1.3- Méthode des microatmosphères :	19
VII.2- Technique en milieu liquide : Méthode de dilution.....	19
VII.2.1- Méthode des disques de Sarbach : :	19
VII.2.2- Détermination de la CMI et CMB : :	19
VIII-Toxi-infection alimentaires:	20
VIII.1-Symptômes, causes, diagnostics et traitements :	21
VIII.1.1- Symptômes :	21
VIII.1.2- Causes :	21
VIII-3-c. Diagnostics :	22
VIII-3-d. Traitements :	22
IX-Les bactéries pathogènes utilisées et leurs effets.....	22
XI.1- Escherichia. Coli	23
XI.2- Staphylococcus aureus	24
XI.3- Salmonelle spp	24



Matériels et Méthodes

I-Lieu d'étude :	27
I.1- Institut National des Plantes Médicinales et Aromatique de Taounate.....	27
I.2- Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès :	27
II- Matériel végétal :	28
II.1- Identification des plantes :	28
II.1.1- Cypres de l'Atlas	28
II.1.2- Genévrier thurifère	29
II.1.3- Genévrier rouge.....	29
II.2- Taux d'humidité et rendement (plante et HE) :	30
II.3- Extraction des huiles essentielles	31
II.3.1- Extraction par Alambique	31
II.3.2- Hydrodistillation par Clevenger :	32
II.4- Détermination du rendement en huiles essentielles.....	33
II.5- Méthode d'analyse chromatographique des huiles essentielles.....	34
II.5.1. Conditions expérimentales :	34
III-Activité antibactérienne :	34
III.1- Choix des souches bactériennes :	33
III.2- Microorganismes utilisés pour la détermination des activités antimicrobiennes des HE:.....	35
III.3-Culture bactérienne en milieu solide :	35
III.4- Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu solide : La méthode des disques	37

Résultats

I-Matériel végétal :	40
I.1- Taux d'humidité ::	40
I.2- Composition chimique des huiles essentielles :	40
I.2.1- Composition chimique de l'huile essentielle de Genévrier thurifère.....	40
I.2.2- Composition chimique de l'huile essentielle de Genévrier rouge	41
I.2.3- Composition chimique de l'huile essentielle de Cypres de l'atlas	42
II-Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu solide :	43
Conclusion et perspectives :	47
Références bibliographiques.....	48



Introduction



Nous sommes plusieurs milliers de personnes à souffrir chaque année dans le monde d'intoxications alimentaires. L'alimentation est devenue un véritable sujet de préoccupation pour les citoyens.

Les intoxications alimentaires résultent de l'ingestion d'aliments contaminés par un microorganisme nocif ou un agent pathogène. Les microorganismes pouvant causer des toxoinfections alimentaires sont les virus, les parasites et les bactéries. Les bactéries sont le plus souvent mises en cause dans les cas d'intoxications alimentaires (Benkaddour, 2002).

On observe de plus en plus de préoccupations du fait que les bactéries, ont trouvé une parade pour lutter contre les antibiotiques en développant une résistance. Et ce qui est inquiétant, avec c'est qu'au début ce médicament était actif et efficace pour détruire des bactéries, puis au fil des années cet antibiotique n'a plus ou beaucoup moins d'effet. Ce qui constitue une menace réelle.

Les chercheurs et scientifiques tentent alors de trouver des alternatives efficaces et accessibles à partir de produits naturels extraits de plantes médicinales. Ces derniers sont utilisés depuis longtemps dans la lutte contre les maladies infectieuses. Mais la découverte des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plantes et l'a reléguée à un rang secondaire (Konno L et al., 1967)

A côté des antibiotiques connus, différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la synthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE) ou essences connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique (Siddiqui Y.M et al., 1996) et leur activité thérapeutique dans la médecine populaire (Cawthorn A.1995). La composition chimique des HE est assez complexe (Peana A.T et al., 1999), les composés terpéniques et aromatiques représentent les principaux constituants. On y trouve également, et en faibles concentrations des acides organiques, des cétones et des coumarines volatiles. La nature du composé majoritaire (phénol, alcool, aldéhyde, cétone...) joue un rôle principal dans l'efficacité de leurs effets biologiques (Carson C.F et al., 1995) voire les composés minoritaires. Il a été montré que les HE augmentent le niveau d'oxygène et activent le système immunitaire dans les cellules animales (Budhiraja S et al., 1999). De plus, elles exhibent un effet sur des cellules cancéreuses murines en culture (Jing Y et al., 1995).

Au Maroc, les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle, qui elle-même est largement employée dans divers problèmes de santé. Les remèdes utilisant les plantes sont considérés comme : moins chers, sans effets indésirables, et ont tendance à être plus employées



dans les maladies chroniques telles que le diabète, les rhumatismes, les cancers (Benjilali et al., 2005.).

Ce travail a comme objectif

- L'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques et médicinales appartenant à la famille des Cupressaceae.
- Les analyses de leur composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).
- L'évaluation de leur l'effet antibactérien.



Revue bibliographique



I- Les plantes aromatiques et médicinales :

I.1- Aperçu historique:

Depuis la nuit des temps, la première préoccupation de l'homme fut de satisfaire ses besoins en nourriture. Très vite, il dut lutter contre la maladie ou le mal être qui affectaient son corps et son esprit.

Face à la maladie, il a cherché dans son environnement les plantes qui pouvaient le soulager. Ceux qui découvrirent les premières plantes efficaces contre la douleur eurent la reconnaissance immédiate de leur entourage et furent considérés comme les premiers guérisseurs. Par l'intuition et l'expérimentation, ils sélectionnèrent les végétaux utiles, les plantes alimentaires qui nourrissent, les plantes médicinales qui soignent et les plantes toxiques qui tuent, utilisées comme poison de flèche ou de guerre (Benjilali, 1992).

La connaissance des plantes médicinales et aromatiques se transmet de génération en génération au fil des siècles par un apprentissage ou une initiation dans toutes les sociétés et tradition orale, notamment chez certains peuples de l'Afrique, de l'Amérique et du pacifique. Dans d'autres régions du monde, au fur et à mesure du développement des civilisations, l'écriture véhicule ces savoirs thérapeutiques et c'est ainsi que prennent naissance les grandes médecines savantes grecques, indienne, chinoise et arabo-persane (Bernard, 1988).

Les Grecs furent les héritiers des connaissances médicinales de l'Egypte pharaonique et de la mésopotamie. *Hippocrate*, appelé le père de la médecine, jette les bases d'une médecine scientifique dénuée d'une pratique magico-religieuses dès le 4^{ème} siècle avant J.C. par l'élaboration de sa théorie humoral. Deux cent trente plantes médicinales sont décrites dans le *corpus Hippocraticum* d'Hippocrate.

Vers 60 après J.C. *Dioscoride* rédige l'ouvrage de *Materia Medica* qui fera référence. Cinq cent dix neuf plantes y sont représentées par des dessins et décrites avec leurs usages thérapeutiques (Fleurentin, 2008).

Cette théorie humorale sera reprise par la médecine arabo-persane. Les arabes qui disposaient au 7^{ème} siècle d'une médecine nomade de tradition orale, rencontreront les pratiques médicales des civilisations qui les ont précédés. De nombreux médecins célèbres rédigent des centaines de traités. Les plus célèbres d'entre eux sont le *continent* rédigé par *Rhazès* et le *canon d'avicenne (Ibn Sîna)*. A partir du 12^{ème} siècle, les foyers culturels et scientifiques se déplacent vers le Maghreb et l'Espagne andalouse. *Ibn al Baytar* rédigea le *Traité des simples* en décrivant 1500



drogues d'origines végétales, ouvrage référence sur la pharmacopée arabo-persane du 13^{ème} siècle. (Fleurentin, 2008).

En médecine chinoise, les plantes médicinales sont classées selon une conception énergétique en rapport avec leurs saveurs et leur nature.

Aujourd'hui, deux systèmes médicaux, la médecine traditionnelle et la médecine occidentale, cohabitent et sont enseignés dans les universités (Fleurentin, 2008).

II-Généralités sur les huiles essentielles :

A la connaissance globale des vertus des plantes médicinales et aromatiques, se superpose de nos jours celle des huiles essentielles, grâce au progrès de la chimie et de la technologie. Beaucoup de travaux sont réalisés dans ce sens, du fait de l'importance des huiles essentielles dans divers secteurs économiques, comme par exemple, l'industrie de la parfumerie et de la cosmétique, l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique et plus particulièrement, la branche de l'aromathérapie qui utilise leurs propriétés bactéricides et fongicides.

II.1- Définition :

Les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.).

Les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques (Duquenois, 1968).

Celles-ci sont stockées dans des poches au niveau de divers organes :

- Fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou graines (carvi). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, classées parmi les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante (Brunechon, 1987).
- Les huiles essentielles sont largement réparties dans le règne végétal; certaines familles en sont particulièrement riches: Conifères, Rutacées, Myrtacées, Ombellifères, Composées, Labiées (Sauvage, 1974).
- L'AFNOR définit les huiles essentielles comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques. » (Association française de normalisation, 1986).

II.2- Propriétés générales des huiles essentielles :



Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs (Derooin, 1988). De plus, en règle générale, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées « phytoalexines ». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine (Mann, 1987).

III-Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'obtention des huiles essentielles en fonction du matériel à traiter. Chaque méthode peut avoir diverses variantes.

III.1- Enfleurage :

C'est une méthode qui n'est plus guère utilisée, (coût, travail, rendement moindre). Il s'agit de placer les fleurs sur un corps gras purifié et de laisser les arômes pénétrer le corps gras. Une fois l'arôme des fleurs "pompé", on les retire et on remet des fleurs fraîches, jusqu'à saturation du corps gras. La pommade (composé obtenu), la suffit de la nettoyer et laver avec de l'alcool. Au bout de 24 heures, le corps gras et les huiles essentielles sont séparés. Il ne reste plus qu'à recueillir la précieuse huile essentielle.

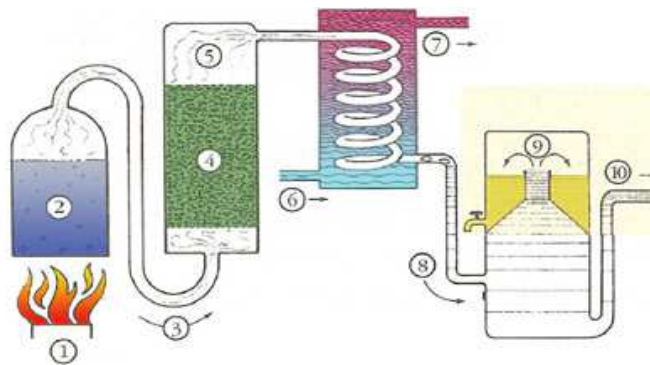
III.2- Distillation:

III.2.1- Entraînement à la vapeur d'eau :

C'est la méthode la plus largement utilisée et la mieux adaptée pour obtenir les huiles essentielles les plus pures.

Trois cuves sont reliées entre elles par de minces tubes: La première cuve reçoit de l'eau, la seconde les plantes et la troisième l'huile essentielle.

Le procédé consiste à faire traverser par de la vapeur d'eau une cuve remplie de plantes aromatiques. A la sortie de la cuve et sous pression contrôlée, la vapeur d'eau enrichie d'huile essentielle traverse un serpentin où elle se condense en gouttelettes et arrive dans la troisième cuve (l'essencier). Les huiles essentielles étant plus légères que l'eau, et l'essencier recueille l'eau et l'huile essentielle. La différence de densité entre les deux liquides permet une séparation aisée. Il suffit de les récupérer en surface, tandis que l'eau qui se trouve en dessous sera utilisée pour créer des eaux florales et des hydrolats. Cette méthode est industriellement la plus utilisée.



1. Feu
2. Eau
3. Vapeur d'eau
4. Plantes aromatiques
5. Vapeur d'eau chargée d'H.E.
6. Eau froide
7. Eau chaude
8. Eau + H.E.
9. Huile essentielle
10. Hydrosol ou hydrolat

Figure 1 : Système simplifié d'une distillation par entraînement à la vapeur d'eau à basse pression

III.2.2- Hydrodistillation :

Le mélange des plantes et d'eau est porté à ébullition. Les principes volatils sont ensuite entraînés, et, après condensation du distillat, ils sont séparés par simple décantation.

Cette méthode présente l'avantage d'être simple, efficace et non coûteuse. Cependant, elle n'est pas sans inconvénients, dans ce sens qu'elle donne parfois une odeur de "bouilli" à l'huile essentielle, due à une éventuelle cuisson des plantes. Elle peut également donner naissance à des réactions secondaires (hydrolyse, isomérisation etc.), le milieu pouvant avoir un pH relativement acide (Raul, 2005).

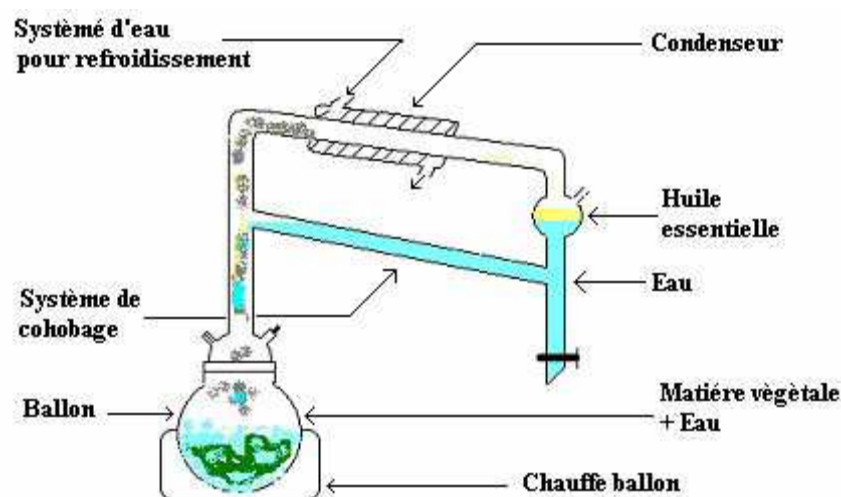


Figure 2 : Appareil d'hydrodistillation des huiles essentielles

III.3- Extraction par expression :



Il s'agit de la méthode la plus simple mais malheureusement la plus limitée. Elle consiste à briser mécaniquement les «poches à essence» des zestes frais d'agrumes pour en recueillir les essences. Le produit obtenu se nomme «essence» et non «huile essentielle» car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur d'eau n'a eu lieu (pour tous les citrus).

III.4- Extraction par solvant :

L'extraction par *solvant* (consiste à séparer les constituants d'un mélange à l'aide d'un solvant *volatil* (éthanol, *hexane*) qui ne se mélange pas avec l'eau. Le solvant se charge des molécules à extraire grâce à sa forte affinité avec elles. Les solvants entraînent les corps odorants par une succession de lavages des plantes. Après évaporation des solvants, on obtient la concrète. Après lavage à l'alcool, filtration et distillation, la concrète donnera l'absolu, utilisé par les parfumeurs.

C'est le procédé employé par les industries mais qui doit être proscrit pour l'usage thérapeutique car le produit obtenu garde la trace des solvants.

III.5- Extraction par gaz supercritiques :

C'est le procédé le plus récent donnant en général des extraits de qualité différente de ceux obtenus dans les autres techniques. C'est un cas particulier de l'extraction par solvant avec la différence qu'ici le solvant est un gaz liquéfié (butane, propane, gaz carbonique) évaporé ensuite par une simple décompression.

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé. Il s'agit du CO_2 en phase supercritique. A l'état supercritique, le CO_2 n'est ni liquide, ni gazeux et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre.

Les fluides supercritiques comme le CO_2 sont des bons solvants à l'état supercritique ($T_c = 31^\circ\text{C}$, $P_c = 73,8$ bars),(fig) et de mauvais solvant à l'état gazeux. Les avantages de ce procédé sont les suivants :

- le CO_2 est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et bon marché,
- on utilise des basses températures pour la mise en œuvre,
- en fin de cycle, la séparation entre le solvant d'extraction et le soluté pour obtenir l'extrait est facile (simple détente qui ramène le CO_2 à l'état gazeux), avec une récupération quasi-totale et peu coûteuse,

- les frais de fonctionnement, à l'échelle pilote ou de laboratoire, sont réduits (le CO_2 est continuellement recyclé).

L'extraction au CO_2 supercritique est une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives (méthode d'extraction plus complète et moins dégradante que la vapeur d'eau). Cependant son installation industrielle reste coûteuse et l'appareillage est encore envahissant (George, 1979).

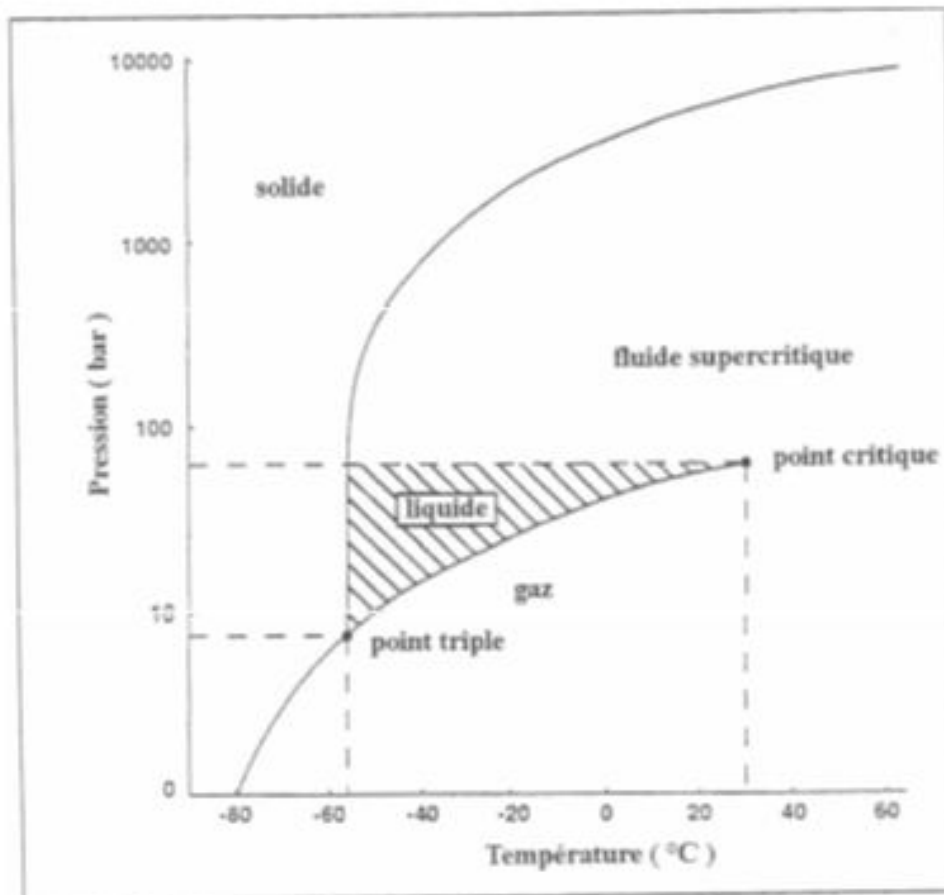


Figure 3 : Diagramme de phase du CO_2

III.6- Extraction par micro-ondes

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Figure 4).

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des

procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. (Mengel et al., 1993)

La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé d'entraînement à la vapeur traditionnel. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par microondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (Bendahou et al., 2007; Chemat et al., 2007).

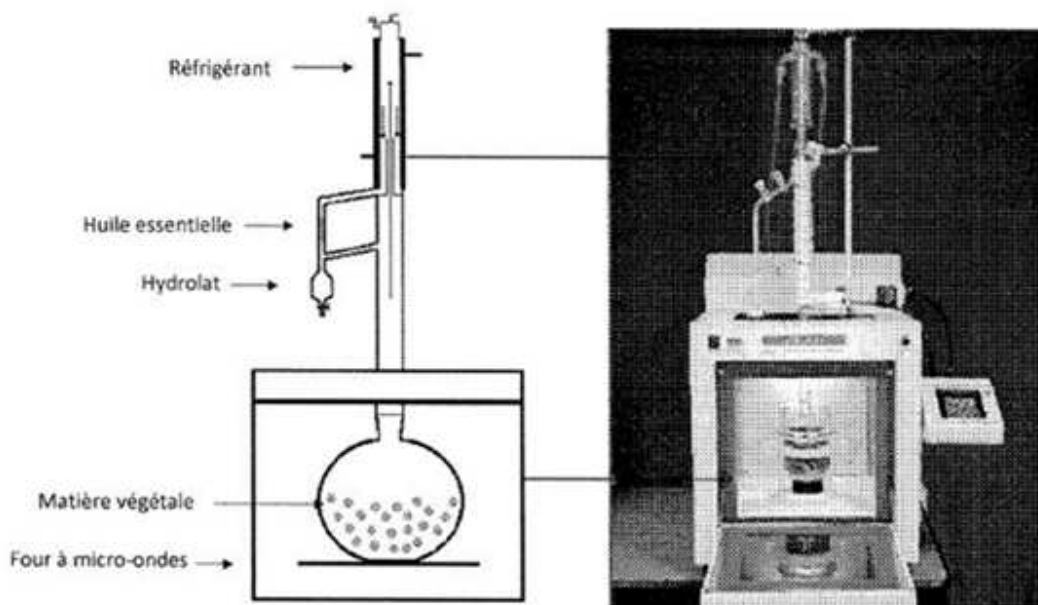


Figure 4 : Système d'extraction des huiles essentielles par micro-ondes

IV-Composition chimique des huiles essentielles

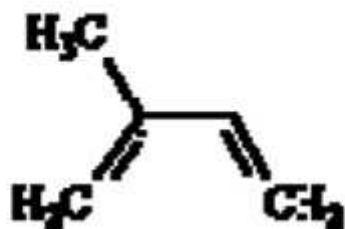
La composition chimique des huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte. (Hadian et al., 2008)

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvé en tant que composé majoritaire dans quelques unes, telles que les essences d'anis, de cannelle, de girofle, etc... Divers autres



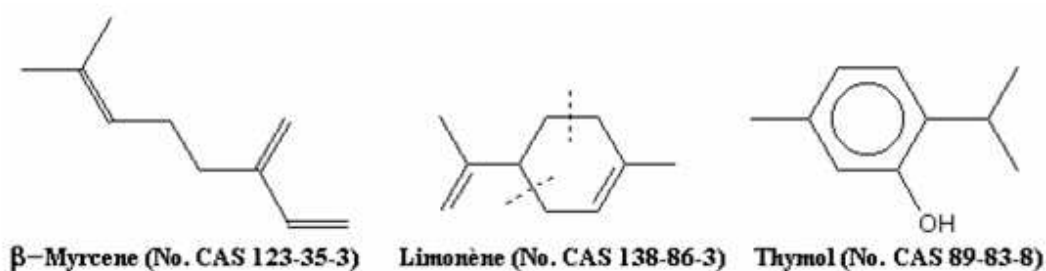
constituants minoritaires leurs sont associés. De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques.

Les composés terpéniques sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonés $(C_5)_n$ ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (isoprène), nous pouvons réaliser la classification suivante :



L'isoprène.

- Pour $n = 2$: les monoterpènes. Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures en C_{10} . Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde.

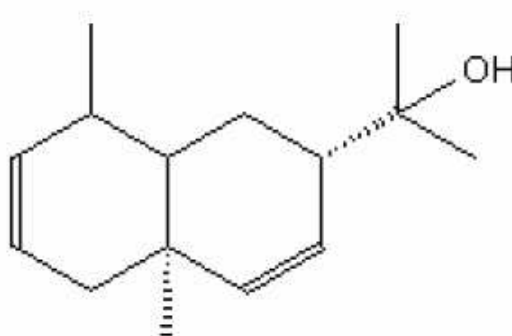


Exemple des composants monoterpéniques.

- Pour $n = 3$: les sesquiterpènes. Ce sont des hydrocarbures de formule C_{15} , soit une fois et demie (sesqui-) la molécule des terpènes (en $C_{10}H_{16}$). Un groupe particulier de sesquiterpènes est représenté par les azulènes, composés instables dont le nom vient de leur coloration bleue et qui sont importants en pharmacognosie en raison de leurs propriétés anti-



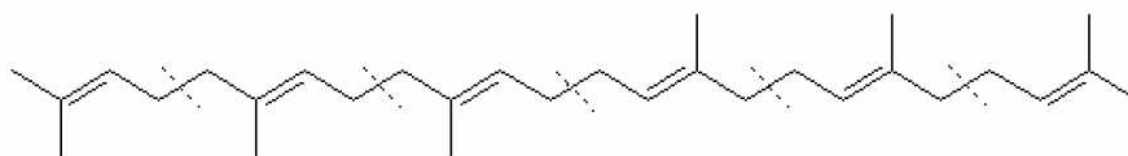
inflammatoires. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta et hepta carbonés. Nous retrouvons dans ce groupe le chamazulène (des essences de camomille et de matricaire).



Eudesmol (No. CAS 51317-08-9)

Exemple des composants sesquiterpéniques.

- Pour $n = 4$: les diterpènes qui sont des dérivés d'hydrocarbures en C_{20} . Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines.
- Pour $n = 5$: les sesterpènes. Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en C_{25} .
- Pour $n = 6$: les triterpènes. Ces composés en C_{30} sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés, ou sous forme hétérosidique.



Squalène (No. CAS 7683-64-9)

Exemple des composants triterpéniques.

- Pour $n = 8$ et les polyterpènes le caoutchouc naturel est l'exemple plus nommé. Le caoutchouc naturel est un polymère de l'isoprène. Il est produit par la coagulation par la chaleur de la sève de l'hévéa.



Dans une huile essentielle, nous retrouvons presque exclusivement des mono- et sesquiterpènes. Les dérivés du phénylpropane sont moins abondants que les terpénoïdes, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique lui-même intermédiaire de la synthèse de la lignine à partir du phénylpropane.

Les composés sont néanmoins importants sur le plan qualitatif et quantitatif chez certaines espèces. Par exemple, le trans-anéthole qui est la molécule responsable en grande partie de l'arôme d'anis, constitue environ 80% de l'huile essentielle de fenouil (1-3% d'essence), et d'anis vrai (3% d'essence). Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle (Hernandez O., 2005)

V- Identification des huiles essentielles :

Une parfaite connaissance de la composition chimique des huiles essentielles est nécessaire aux industriels et pour les chercheurs pour en contrôler la qualité et la régularité en vue d'une bonne commercialisation et pour y déceler une éventuelle spécificité en vue de sa valorisation. En effet, ces huiles essentielles constituent souvent une matière première destinée à des secteurs d'activités aussi divers que ceux de la parfumerie, des cosmétiques, des industries pharmaceutiques et de l'agroalimentaire. Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les développements constants des méthodes de séparations et d'identifications, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques.

V.1- CPG-SM :

Cette technique consiste à analyser les huiles essentielles, tout d'abord, par Chromatographie en Phase gazeuse (CPG) ; cette technique chromatographique permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir), puis à les analyser par le couplage « en ligne » avec la spectrométrie de masse (SM). 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. Cette étape est habituellement suffisante dans les cas d'analyse de routine d'huiles essentielles. Cette technique est utilisée par plusieurs chercheurs (Cassiano B., 2007) ; (Okoh O. O., 2009).



V.2- Chromatographie liquide sur colonne-CPG-SM :

Cette séquence est mise en œuvre lorsque l'huile essentielle est complexe lorsque l'analyse est réalisée dans une optique de recherche. Un fractionnement de l'huile essentielle est alors effectué, le plus souvent par chromatographie liquide sur colonne ouverte de silice ou d'alumine. Les fractions obtenues sont ensuite analysées de la façon décrite dans la première partie (CPG-SM). Cette étape est à privilégier lorsque l'on veut étudier les différentes familles de composés (esters, alcools, cétone...).

VI-Activité biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaire (J. Pellecuer et al., 1980) ou au niveau de la microflore vaginale (Viollon et al., 1994) et d'origine fongique contre les dermatophytes (Chaumont et al., 1989).

Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. (Sivropoulou et al., 1996)

Dans les domaines phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes (Zambonelli A. et al., 2004) et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. (Mangena T. et al., 1999)

Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques. CHAUMONT et LEGER ont testé 12 composés aromatiques vis-à-vis de huit souches pathogènes pour l'homme *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporum canis* et 5 *Trichophyton* spp. Ils concluent que les phénols sont plus antifongiques et les aldéhydes testés présentent également des propriétés fongistatiques très marquées.

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonctions chimiques:

Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Hydrocarbures



VI.1- Activité antibactérienne :

Les vertus antibactériens des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antibactériennes des huiles essentielles des plantes aromatiques (Mighri H., 2009) ; (Bouzouita N., 2008).

In vitro, l'effet microbicide de certaines huiles essentielles a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques. De plus, elles ont un champ d'action très large. Plusieurs travaux montrent que les huiles essentielles et leurs composés majoritaires ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Nakamura C. 1999).

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est principalement liée à leur composition chimique et en particulier à la nature de leurs composés majoritaires.

VI.2- Mécanisme d'action :

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action. D'une manière générale, on estime que leur action se déroule en trois phases principales (El Kalamouni C., 2010):

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

VII-Les techniques d'étude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles :

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antibactérien des huiles essentielles a une grande influence sur les résultats. Des difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, de leur volatilité et de la nécessité de les tester à faibles concentrations (Abdelghafour.T et all, 1997) . A l'heure actuelle, l'activité antibactérienne in vitro d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Nous allons essayer d'énumérer ces différentes méthodes et de discuter chacune d'elle.

VII.1- Techniques en milieu solide : Méthode de diffusion

VII.1.1- Méthode des disques :

Elle est appelée aussi technique de l'aromatogramme .Dans cette méthode, on utilise des disques de papier filtre de (6, 7,8) mm de diamètre, imprégnés d' huile essentielle et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm. La dilution des huiles essentielles se fait toujours dans un solvant tel que le tween 20, ou l'éthanol. Le principe de cette méthode est toujours la migration de l' huiles essentielles par diffusion dans la gélose (Nakamura C. 1999) ; (Busatta C., 2007); (Raho B., 2008).

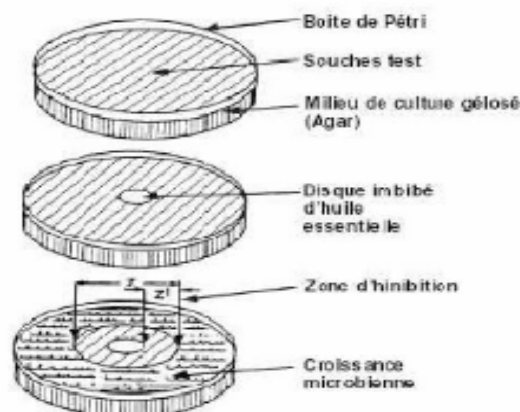


Figure 5 : Technique de l'aromatogramme

VII.1.2- Méthode des puits :

Une variante de la technique des disques consiste en l'aménagement de dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. On remplit cette cavité d'un volume donné d' huiles essentielles qui va diffuser dans la gélose, et on procède, après incubation, à la mesure du diamètre d'inhibition comme dans la technique précédente. (Kempf M., 2011)

VII.1.3- Méthode des microatmosphères :

C'est une technique d'étude en phase vapeur. Son principe est d'ensemencer une boîte de Pétri avec les germes, tandis que l'on dépose quelques gouttes d'huile essentielle sur un papier filtre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance. (Raho B., 2008)

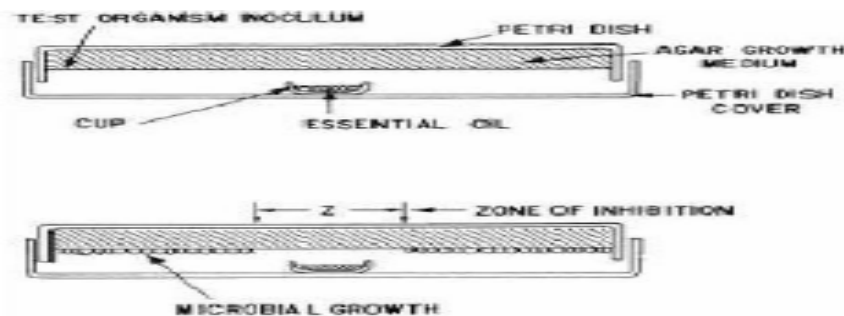


Figure 6 : Technique des microatmosphères

VII.2- Technique en milieu liquide : Méthode de dilution

VII.2.1- Méthode des disques de Sarbach :

L'huile essentielle est déposée à différentes concentrations sur des disques en papier filtre de 10 mm de diamètre, l'huile essentielle est placée dans des tubes à essai. Dans chaque tube est réparti un certain volume de bouillon nutritif ensemencé. Une agitation mécanique est assurée pendant toute la durée de l'incubation. Le pouvoir bactéricide est apprécié par l'évaluation du pourcentage de survivants par repiquage en milieu solide. (Rhayour K. 2002)

VII.2.2- Détermination de la CMI et CMB :

La concentration minimale inhibitrice CMI est utilisée par plusieurs chercheurs pour prouver la performance antimicrobienne d'une huile essentielle. La CMI est définie comme la plus petite concentration dont résulte la maintenance ou la réduction de l'inoculum après 18-24h d'incubation, elle consiste à disperser l'agent antimicrobien en concentration variable de façon homogène et stable dans le milieu de culture du germe étudié. Cette technique, très fiable et reproductible pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, pose un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les huiles essentielles qui ont une très faible solubilité dans les milieux de culture aqueux. Ce problème a été résolu en partie par l'utilisation d'émulsions des huiles essentielles dans des solutions de différents détergents comme le Tween 20 et le Tween 80 ou de solvant comme l'éthanol. (Kempf M., 2011)



La CMB est la plus petite concentration de l'huile essentielle qui ne laisse que 0.01% ou moins de survivants de l'inoculum initial après 18h d'incubation à une température de 37°C.

VIII- Toxi-infection Alimentaire :

L'intoxication alimentaire est une maladie courante généralement bénigne mais qui, parfois, peut être mortelle. Elle se produit lorsqu'une personne absorbe un aliment ou une boisson contaminée par une bactérie ou une toxine.

L'intoxication alimentaire peut affecter une personne (TIA), ou bien un groupe de personnes ayant mangé le même aliment contaminé (TIAC : Toxi-infections Alimentaires Collective). La plupart des intoxications alimentaires sont dues à des toxines produites par les bactéries ou par la quantité de bactéries elle-même.

Certaines bactéries peuvent se développer d'une à plusieurs millions dans les bonnes conditions d'humidité, de terrain alimentaire, de chaleur et de temps. Plus il y a de bactéries présentes, plus il y a de risques de contracter une infection ou une maladie. Les types de bactéries infectieuses les plus courantes sont le *Campylobacter*, l'*E.coli* et la *Salmonelle* (OMS, 2002).

Ces microorganismes constituent un problème croissant pour la santé publique. Dans de nombreux pays, on a signalé ces dernières décennies des augmentations significatives de l'incidence des maladies provoquées par des micro-organismes transmis principalement par les aliments (Benkaddour, 2002).

Les risques chimiques restent une source importante de maladies d'origine alimentaire. Parmi les contaminants chimiques présents dans les aliments, on peut mentionner les toxiques naturels, comme les mycotoxines et les toxines d'origine marine, les contaminants environnementaux, comme le mercure et le plomb, et les substances naturellement présentes dans les plantes. Les additifs alimentaires, les micronutriments, les pesticides et les médicaments vétérinaires sont délibérément utilisés dans la chaîne alimentaire. Il faut toutefois d'abord s'assurer que toutes ces utilisations sont sans danger (OMS, 2002).

VIII.1-Symptômes, causes, diagnostic et traitements :

VIII.1.1. Symptômes :

Les périodes d'incubation sont différentes pour chaque sorte d'intoxication alimentaire. Certaines causes produisent des symptômes en l'espace de 30 minutes ou de quelques heures, mais la plupart des cas d'intoxications alimentaires produisent des symptômes au bout de 12 à 48 heures. D'autres types ne se manifestent qu'au bout de quelques jours, voire une semaine (NHS Choices, 2008).

Généralement, une intoxication alimentaire dure 1 à 3 jours mais peut se poursuivre pendant une semaine selon le type de bactérie, la gravité de l'infection et votre état de santé général. La plupart des personnes guérissent entièrement en l'espace d'une semaine.

Les symptômes les plus courants sont les vomissements, les douleurs abdominales, ainsi que la diarrhée due à l'inflammation du tractus gastro-intestinal (estomac et intestin).

Suivant la cause, les symptômes peuvent également inclure de la fièvre et des frissons, des selles contenant du sang, de la déshydratation, des douleurs musculaires, de la faiblesse et de l'épuisement.

Dans de très rares cas, une intoxication alimentaire grave peut endommager le système nerveux. Dans des cas extrêmes, elle peut même causer la paralysie ou la mort.

VIII.1.2- Causes :

Vous pouvez être victimes d'une intoxication alimentaire en absorbant des aliments qui ne sont pas correctement cuits, ou qui ont été contaminés par une personne qui ne les a pas lavés ou ne s'est pas lavé les mains avant de les manipuler.



Les bactéries causent une intoxication alimentaire soit par leur nombre, soit, plus couramment, en raison des toxines qu'elles produisent. Certaines bactéries produisent des toxines lorsqu'elles se multiplient et, dans de nombreux cas, ce sont ces toxines qui vous rendent malade, parfois un bon moment après que vous avez absorbé ces aliments contaminés.

La cause bactérienne la plus courante de l'intoxication alimentaire est le *Campylobac*, qui se trouve dans la volaille crue, le lait cru, la viande rouge et l'eau non traitée. La salmonelle est la deuxième bactérie d'intoxication alimentaire la plus courante, elle se trouve dans le lait cru, les œufs et les produits à base d'œufs crus, la viande crue et la volaille (NHS Choices, 2008).

Tous les cas d'intoxication alimentaire doivent être signalés aux autorités locales par votre médecin.

IIIV.1.3- Diagnostics :

Si vous êtes hospitalisé(e), un médecin vous examinera physiquement, en prenant votre tension, votre pouls, votre vitesse de respiration et votre température. Votre niveau de déshydratation sera évalué et votre région abdominale pourra être examinée.

Le diagnostic est plus facile si plusieurs personnes ont pris les mêmes aliments ou boissons et présentent les mêmes symptômes.

Un échantillon de vomi pourra vous être demandé et examiné afin de rechercher les traces éventuelles de sang ou de mucus. Il sera envoyé à un laboratoire afin d'être analysé, pour connaître la cause exacte de l'intoxication alimentaire.

Un échantillon d'urine peut également être demandé pour essayer d'y détecter l'infection.

IIIV.1.4- Traitements :

La plupart des cas d'intoxication alimentaire disparaissent au bout de quelques jours, sans que vous ayez à consulter un médecin. Cependant, si la maladie dure plus de quelques jours, s'il y a du sang, s'il y a du mucus jaune ou vert dans les selles, ou si vous êtes enceinte, vous devez obtenir un avis médical. Vous devez également consulter un médecin si la personne infectée est très âgée ou s'il s'agit d'un bébé.

Parfois, vous recevrez des Antibiotiques pour certains types d'infections bactériennes. La période de guérison dépend du type d'infection, de votre âge, de votre état de santé et de vos autres problèmes médicaux éventuels.

Ne mangez pas d'autres aliments tant que vous vous sentez nauséeux/se ou que vous vomissez. Laissez votre estomac se reposer pendant une heure après avoir vomi, puis essayez de boire quelques gorgées d'eau. Veillez à boire de l'eau régulièrement ou utilisez les poudres de réhydratation disponibles en pharmacie.

Maintenez une bonne hygiène personnelle pour éviter de transmettre la maladie à d'autres personnes (NHS Choices, 2008).

IX-Les bactéries pathogènes et leurs effets

Les bactéries pathogènes désignent des germes qui déclenchent une primo-infection caractéristique chez un sujet sain. Les germes les plus souvent évoqués sont les mycobactéries, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries, parmi lesquelles les *Escherichia coli* producteurs de toxines et *Salmonella*.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à trois bactéries pour lesquelles nous donnons quelques caractéristiques dans la suite de ce paragraphe:

IX.1- *Escherichia. coli*



Escherichia. coli Bacille Gram négatif, anaérobie facultatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, et au genre *Escherichia*, elle est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents.

E.coli, un hôte commun de l'intestin de l'homme (10^8 / g de selles), et des animaux; elle est recherchée à ce titre, comme germe témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments.

A l'intérieure de l'espèce il y a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastroentérites et diarrhées), leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *E.coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *E.coli* entérotoxino-gène (tourista), *E.coli* entéroinvasif (invasion des cellules intestinales), *E.coli* entérohémorragique (diarrhées sanglantes), *E. coli* entéroadhérent (diarrhée du voyageur).

D'autres sont responsables de méningites néonatales, provoquent des infections du tractus urinaire, ou encore des septicémies qui correspondent à un nombre restreint de sérotypes. (Lehec H., 1995 , Boop CA., 1999)

Tableau1 : Information générales sur l'*Escherichia. coli*

Milieu naturel	Tube digestif des animaux, sols, eaux, matières fécales, lait, viandes crues
Aliments associés	Lait cru ou mal stérilisé, viandes crues
Importance	Germe témoin de contamination fécale. Plusieurs souches toxigènes. Plusieurs types de toxines thermolabiles ou thermorésistantes.
Dose infectieuse	Élevée ($> 10^8$)
Période d'incubation	8 à 24 h
Symptômes	Vomissements et diarrhées sanguinolentes, fièvre.
Température de croissance	30 – 37 ° C [$3^{\circ} \text{C} < t < 45^{\circ} \text{C}$]



IX.2- *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une cocci à gram positif, sphériques, qui se divisent sur plusieurs plans pour former des amas réguliers ou irréguliers en grappe de raisin, d'où leur nom (en grec staphylos), ils sont immobiles et cultivent sur des milieux contenant 5% de Na Cl et pour certains jusqu'à 10 et même 15%. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs. C'est l'espèce prédominante chez l'homme et autres mammifères, la cavité nasale de l'homme est sa niche préférentielle.

Les *staphylocoques* sont des germes ubiquistes largement distribués dans l'environnement naturel de l'homme, mais ils sont les plus fréquents et en plus forte densité sur les surfaces cutano – muqueuses des mammifères. Elles ont un pouvoir pathogène opportuniste extrêmement large qui s'exerce avec une grande fréquence en milieu hospitalier. L'espèce *S.aureus*, responsable d'infections pyogènes de la peau et des muqueuses (furoncle, impétigo, staphylococcie maligne de la face, staphylococcies bulleuses, etc.), mais aussi osseuses (ostéomyélite), digestives (entéocolites post-antibiotiques), septicémiques. *S.epidermidis* un agent de plus en plus fréquent d'infections nosocomiales. (Leclercq R. 2000)

Tableau 2 : Information générales sur la *Staphylococcus aureus*

Milieu naturel	Peau, muqueuses, nez, gorge, coupures et brûlures.
Aliments associés	Poisson, viande, lait, fromages, pâtes.
Importance	Endotoxine thermorésistante.
Dose infectieuse	Faible (moins de 1 mg de toxine)
Période d'incubation	2 à 6 heures
Symptômes	Diarrhées, vomissements et nausées pendant un ou deux jours.
Température de croissance	37 ° C [10° C < t < 48° C]

IX.3- *Salmonelle spp*

Les *Salmonella* sont des bactéries à Gram négatif de type aérobie-anaérobie facultatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae et possédant toutes leurs caractéristiques biochimiques. Pourvues de flagelles péritriches, elles sont généralement mobiles mais certains



sérovars sont immobiles comme *S. Gallinarum pullorum* et d'autres ayant perdu leurs flagelles. Le genre *Salmonella* comprend deux espèces génétiquement individualisées : *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori* ; l'espèce *enterica* est elle-même subdivisée en six sous-espèces définies sur la base de caractères biochimiques et génotypiques par les résultats d'hybridation ADN/ADN. L'intestin des animaux constitue le réservoir le plus important en *salmonelles* et contribue fortement à leur dissémination dans l'environnement où elles peuvent survivre mais sans se multiplier. La contamination de l'homme peut se faire de façon directe par contact ou, le plus souvent, par l'intermédiaire d'aliments souillés, un grand nombre de produits alimentaires étant susceptibles d'être vecteurs.

De nombreuses espèces animales ainsi que l'homme peuvent héberger le micro-organisme de façon non apparente en tant que porteurs sains permettant encore plus facilement cette dissémination. La prévalence des contaminations par les salmonelles dans les troupeaux de vaches laitières est variable selon les pays et les publications. (Lafarge V. 1995)

Tableau 3: Information générales sur la *Salmonelle spp*

Milieu naturel	Volailles, animaux sauvages, animaux domestiques, homme, oiseaux sauvages, insectes.
Aliments associés	Lait cru, volaille crue, gibier, œufs, viandes crues.
Importance	Cause fréquente de TIAC et d'empoisonnement alimentaire domestique. Due à un manque d'hygiène et à des processus de mise en œuvre de l'aliment défectueux. Symptômes graves. Mortalité possible chez les personnes faibles, affaiblies ou immunodéprimées.
Dose infectieuse	Très basse à basse, par exemple, moins de 10 germes actifs par ml de lait ou 100 g de fromage.
Période d'incubation	12 à 72 heures
Symptômes	Douleurs abdominales, diarrhées, vomissement, fièvre, frissons, maux de tête.
Température de croissance	37° C [6° C < t < 47° C]



Matériels et méthodes



Ce travail comprend deux volets :

Le premier volet concerne l'extraction des huiles essentielles et leur caractérisation a été effectuée au sein du laboratoire de valorisation et application industrielle de l'institut National des plantes Médicinales et aromatique de TAOUNAT. (Annexe 1)

Le deuxième volet concerne l'évaluation de leur l'activité antibactérienne par des testes de sensibilité vis-à-vis de *Escherichia. coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonelle spp* et a été effectué au sein du laboratoire Régionale de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu. (Annexe 2)

I- Lieu d'étude

I.1- Institut National des Plantes Médicinales et Aromatique de Taounate

L'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA) se situe à Taounate dans la région du Nord du Maroc à 80 km de Fès, le siège est situé à Sahel Boutaher, Préfecture de Taounate situé à 12 Km du Barrage Alwahdaa. Il constitue le premier établissement au Maroc spécialisé dans le secteur des plantes aromatiques et médicinales. Le décret de création dans le Bulletin Officiel du 04 juin 2002, montre que les missions attribuées à l'INPMA lors de la création sont originales, spécifiques mais innovantes. Le décret de création précise que l'INPMA a pour «vocation tout ce qui concerne la filière des plantes médicinales et aromatiques»(annexe 1).

I.2- Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès

Le Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu (L.R.D.E.H.M), constitue une structure d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique, des maladies infectieuses et transmissibles et pour les programmes sanitaires du Ministère de la Santé dans le cadre de l'Hygiène de l'environnement.

II- Matériels végétales

Le choix des plantes s'est basé sur une recherche bibliographique visant les plantes médicinales dont les huiles essentielles sont connues par leur activité antiseptique sur plusieurs souches bactériennes et de leur disponibilité au Maroc. Ils ont été caractérisées et identifiées par le laboratoire de valorisation et application industrielle de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques(INPMA).

II.1- Les plantes utilisées

II.1.1- Cyprès de l'Atlas

C'est un fort bel arbre qui atteint 25 mètres de hauteur, avec un port droit, un feuillage vert clair presque bleuté et des rameaux souples aux extrémités retombantes.

De toutes les cupressinées, le Cyprès présente la feuille la plus finement imbriquée sur des rameaux circulaires.

Le bois est apte à de nombreux usages. C'est une essence de reboisement. Le grand Cyprès de l'Atlas n'est représenté à l'état spontané que dans quelques stations du Haut-Atlas occidental, dans le bassin de l'oued N'fiss (au sud-ouest de Marrakech), entre 1200 et 2000 mètres d'altitude où il constitue une curiosité botanique remarquable.

Très utilisé comme bois d'œuvre dès l'antiquité, le cyprès formait au début de la période historique des boisements importants aujourd'hui disparus. Il porte le nom chleuh d'Arella et il est curieux de constater que dans les Alpes françaises le Pin Cembro est nommé Arolle, ce qui témoigne sans doute du passage ancien de nord-africains dans la Tarentaise et la Maurienne... (Auclair, 1993)



Règne : plante

Embranchement : Pinophyta

Classe : Pinopsida

Ordre : Pinales

Famille : Cupressaceae

Genre : Cupressus

Figure 7 : Plante de Cyprès de l'Atlas

II.1.2- Genévrier thurifère

Le Genévrier thurifère appartient à la famille des Cupressaceae (ou cupressacées), laquelle constitue la plus grande part de la flore forestière de l'Atlas. Les botanistes distinguent trois variétés de *Juniperus thurifera* dans les montagnes de la Méditerranée occidentale : dans les Alpes et les Pyrénées (var. *gallica*), en Espagne (var. *hispanica*) et en Afrique du nord (var. *africana*). En Méditerranée orientale, des espèces de Genévriers arborescents originaires des montagnes de Grèce et d'Asie Mineure (*Juniperus excelsa*, *Juniperus drupacea*) ont sensiblement la même écologie. Les Genévriers étaient nommés kedros par les anciens grecs, si bien qu'un éminent botaniste anglais a soutenu que les poutres du temple d'Apollon à





Utique étaient de Genévrier et non de Cèdre, et sans doute en était-il de même pour l'ancien temple de Salomon 8 Jérusalem. (Auclair, 1993)

Règne : plante

Embranchement : Pinophyta

Classe : Pinopsida

Ordre : Pinales

Famille : Cupressaceae

Genre : Juniperus

Figure 8 : Plante de Genévrier thurifère

II.1.3- Genévrier rouge

Le Genévrier de Phénicie est un petit arbre ou un arbuste ramifié dès la base du tronc. On le distingue du Genévrier thurifère par la couleur rouge de ses fruits, par son port ramifié et moins puissant, par l'aspect touffu de ses rameaux cylindriques, enfin par son absence de la haute montagne aux altitudes supérieures à 2200 mètres. Ce petit arbre méditerranéen est quasi omniprésent dans le paysage forestier de l'Atlas. En mélange avec le Thuya à basse altitude, il remplace ce dernier quand le climat devient plus continental. D'une grande rusticité et particulièrement résistante à la sécheresse, c'est souvent la seule essence capable de former de véritables forêts claires dans les conditions les plus difficiles de sol et de climat.

On le rencontre jusque sur le versant saharien du Haut- Atlas et sur le Jbel Sarhro où il recule sous l'action conjuguée de l'homme et du climat. En dépit de sa taille réduite (il dépasse rarement huit mètres), le Genévrier de Phénicie joue un rôle important quoique méconnu dans l'économie montagnarde : grand pourvoyeur de bois de feu, de perches de construction, de bois de service parfois même de fourrage foliaire ... Les perchettes de Genévrier assemblées en couches tressées forment l'armature des terrasses de terre dans bien des maisons berbères. (Auclair, 1993)



Règne : plante

Embranchement : Pinophyta

Classe : Pinopsida

Ordre : Pinales

Famille : Cupressaceae



Genre : Juniperus

Figure 9 : Plante de Genévrier rouge

II.2- Taux d'humidité et rendement (plante et HE) :

20 g de la matière végétale ont été introduites dans une étuve portée à 60°C pendant 24h, Cela permet d'exprimer la teneur en eau et avoir par suite un rendement représentatif.

Le taux d'humidité TH est calculé comme suivant:

$$TH = (A/B) \times 100$$

A = masse initiale moins la masse après le séchage (en g)

B = masse initiale (en g).

Après extraction, le rendement R en huile essentielle est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{m_{HE}}{m_V - (m_V * TH)} \times 100$$

m_{HE} : masse de l'huile essentielle

m_V : masse végétale utilisée

TH : taux d'humidité

II.3- Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectué au sein du laboratoire de valorisation et application industrielle de l'institut National des plantes Médicinales et aromatique de TAOUNAT.

II.3.1- Extraction par Alambique

La distillation à la vapeur d'eau est le principal procédé d'obtention des huiles essentielles.

La plante est récoltée et chargée dans un large alambic (180 litres), la vapeur d'eau passe à travers la plante à une température inférieure à 120°C pour briser les cellules végétales, libérer les molécules aromatiques et les entraîner dans un serpentin de refroidissement.

Les vapeurs refroidies retournent à l'état liquide, et recueillis dans un essencier, l'huile essentielle se sépare par simple différence de densité avec l'eau florale.

La figure 7 illustre le déroulement de l'extraction des huiles essentielles en utilisant l'alambic.



Alambic



Colonne réfrigérante



Essencier



Récipient réfrigérant

Figure 10 : Hydrodistillation par alambic

[1] : une photo montrant l'alambic utilisé lors de l'extraction.

[2] : la colonne réfrigérante elle permet la condensation de la vapeur issue de l'alambic.

[3] : récipient réfrigérant permet d'assurer la maintenance de l'état liquide avant de recueillir l'huile essentielle et l'eau floral dans l'essencier.

[4] : essencier où se passe la séparation entre notre huile essentielle et l'eau florale par phénomène de décantation.

II.3.2- Hydrodistillation par Clevenger :

L'Hydrodistillation par Clevenger permet d'obtenir l'huile essentielle en l'entraînant par la vapeur d'eau qui est en contact avec la matière végétale. La figure 16 représente l'appareillage de cette extraction.

(1) : Ballon

(2) : Clevenger

(3) : Réfrigèrent

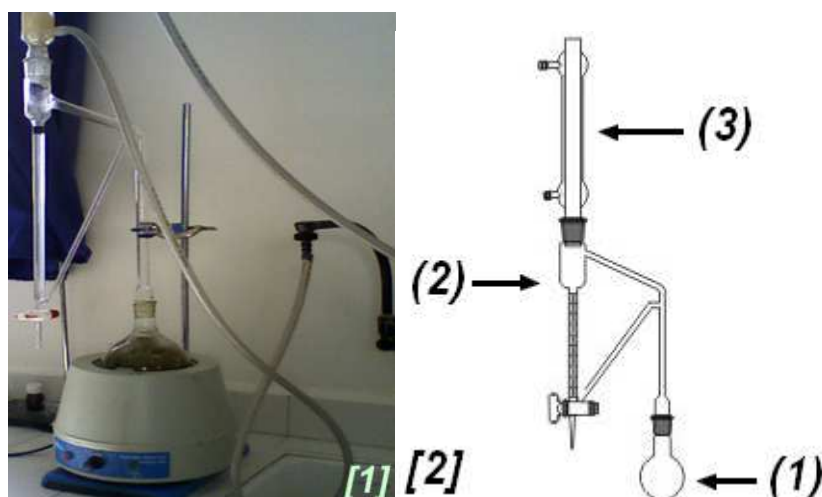


Figure 11 : Hydrodistillation par Clevenger

II.4- Détermination du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles pour chaque échantillon correspond à la quantité d'huile obtenue par rapport à la masse de matière sèche. Autrement dit, le volume d'huile recueilli doit être quantifié en liaison avec la masse placée dans le ballon.

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le volume de l'huile extrait et la matière sèche de la plante. Et le rendement (%) est exprimé par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{V}{MS} * 100$$

Avec :

Rdt (%) : Rendement en huiles essentielles pour 200g de la matière sèche ;

V : Volume d'huiles essentielles recueilli ;

MS : Masse (déterminer par la mise à l'étuve pendant 48 heures à 60°C de la même quantité de plantes mise dans le ballon pour l'extraction)

II.5- Méthode d'analyse chromatographique des huiles essentielles

II.5.1. Conditions expérimentales :

Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles par CPG-SM ont été réalisées au Centre Nationale pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST).

Appareillage : chromatographe à phase gazeuse (Trace GC ULTRA) couplé à un spectromètre de masse (Polaris Q MS à trappe ionique).

Type d'ionisation : EI (70 eV)



Type de solvant : Acétate d'éthyle

Type de colonne : VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl),

Longueur : 30 m

Diamètre interne : 0.25 mm

Epaisseur du film : 0.25 μm .

III-Activité antibactérienne

III.1- Choix des souches bactériennes :

Nous nous sommes intéressés dans cette étude à des bactéries qui sont responsables des toxi-infections alimentaires (TIA) dans les échantillons analysés par le Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès qui sont :

- Salmonella* spp;
- Staphylococcus aureus* ;
- Escherichia coli*.

III.2- Microorganismes utilisés pour la détermination des activités antimicrobiennes des HE

Les souches bactériennes ont été fournies par le laboratoire d'accueil, elles ont été identifiées, confirmées et conservées dans des tubes par congélation dans les milieux de cultures spécifiques à chaque souche contenant 20% du Glycérol à une température de -20 °C. Le tableau suivant nous représente ces différentes souches :

Tableau : Souches bactérienne et coloration de Gram

Espèce biologique	Coloration de Gram
<i>Escherichia coli</i>	A gram Négatif
<i>Salmonella</i>	A gram Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	A gram Positif



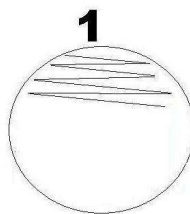
Figure 12 : Dispositif de congélation et de conservation des souches bactériennes

III.3- Culture bactérienne en milieu solide :

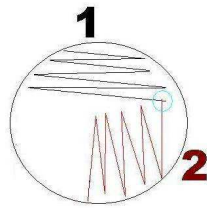
Après avoir décongelé les souches qui feront l'objet de notre étude, on prépare le milieu de culture < Plate Count Agar, PCA> qu'on coule après dans des boîtes pétri.

Pour la culture des bactéries nous avons procédé de la manière suivante :

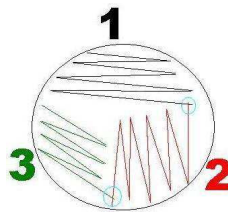
- On désinfecte tout d'abord à l'alcool notre espace de travail ;
- On allume le bec Bunsen en prenant soin d'obtenir une flamme bleue, afin de stériliser l'air aux alentours d'un rayon de 20 centimètres ;
- On passe l'anse dans la flamme du bec Bunsen jusqu'à ce qu'elle devienne incandescente, dans le but de la stériliser ;
- On Patiente quelques secondes le temps que la température diminue, puis on plonge l'anse dans la solution bactérienne décongelée, une gouttelette reste "prisonnière" de la boucle de l'anse. C'est ce volume que nous allons ensemer sur notre milieu,
- on ouvre la boîte de Pétri où se trouve notre milieu de culture solidifié et refroidi, et on la divise mentalement en 3 parties égales ;
- On dépose la solution microbienne avec l'anse dans la 1^{er} tiers de la boîte en effectuant des stries dans un mouvement de va-et-vient, en prenant soin de ne pas traverser, creuser ou arracher le milieu. On doit la déposer uniquement en surface ;



- On referme la boîte de Pétri et on plonge à nouveau l'anse dans la flamme du bec jusqu'à incandescence. On patiente quelques secondes le temps qu'elle refroidisse ;
- On rouvre notre boîte de Pétri, et on effectue le même mouvement de stries dans le 2^{ème} tiers de la boîte, en prenant soin de repasser sur l'extrémité de la dernière strie effectuée précédemment sur le 1^{er} tiers ;



Comme précédemment, on fait des stries dans le 3ème et dernier tiers de notre boîte, en prenant grand soin de récupérer de la solution en repassant une seule fois sur l'extrémité de la dernière strie effectuée dans le 2ème tiers ;



-Notre milieu est ainsiensemencé avec la solution bactérienne. On incube nos boîtes pendant 24 h à une température de 37 °C.

II.4- Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu solide : La méthode des disques

Cette méthode consiste à utiliser des disques de 6 mm de diamètre, dans lesquels nous avons piégé un volume de (10 µl) de l'huile essentielle et déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne.

Les tests ont été effectués sur le milieu de culture « Gélose Nutritives » coulé dans les boîtes de pétrie de diamètre « 90 mm » en plastique.

-On prépare un inoculum à partir d'une culture fraîche et onensemence le tiers de la boîte en stries serrées à l'aide d'une anse.

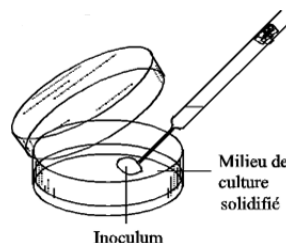


Figure 13 : Méthode des disques/ Etalement de l'inoculum

-On dépose les disques imprégnés d'huile essentielles sur le milieu de culture déjàensemencé;

-On incube la boîte 24h à une température de 37°C.

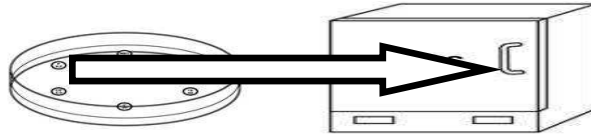


Figure 14 : Méthode des disques/ Incubation

- Après incubation on mesure le diamètre (en Cm) de l'auréole d'inhibition.

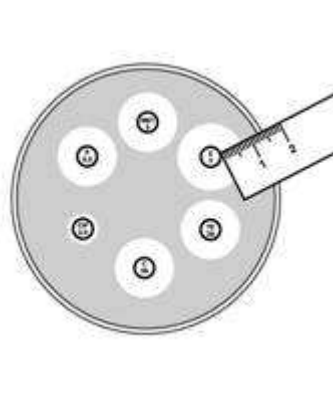


Figure 15 : Mesure des diamètres d'inhibitions



Résultats et Discussion



I-Matériel végétal :

I.1- Taux d'humidité :

Le rendement et la couleur des huiles essentielles sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Rendement et couleur des huiles essentielles

Espèce végétales	Couleur d' huiles essentielle	Rendement d' huiles essentielle %
<i>Genévrier thurifère</i>	Transparente	0,6
<i>Genévrier rouge</i>	Brun foncé	0,9
<i>Cyprès de l'atlas</i>	Jaune pale	0,2
<i>Thymus riatarum</i>	Jaune brun	1,1

De ces résultats on constate que les rendements pondéraux sont faibles, ils varient dans notre gamme de 0,2 et 1,1 %.

L'huile essentielle de *Thymus riatarum* présente le rendement le plus élevé.

Ces différences dans le rendement des huiles essentielles de chaque plante doivent être essentiellement dues aux voies métaboliques propres à chaque végétal.

Il faut prendre en considération que les rendements des huiles essentielle dépendent de plusieurs facteurs comme : l'espèce, le milieu de récolte, la période de récolte, les technique d'extraction et les pratique culturales.

I.2- Composition chimique des huiles essentielles :

Pour le *Thymus riatarum* et des bois du *Genévrier thurifère*, du *Genévrier rouge* et du *Cyprès de l'atlas* les résultats ne sont pas encore disponibles.

I.2.1- Composition chimique de l'huile essentielle de *Genévrier thurifère*

Les constituants chimiques de l'huile essentielle *Genévrier thurifère* analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 5), Le Sabinène est le composé majoritaire avec 40,1% suivis du α -Pinène avec 13,2%.



Tableau 7 : Composition chimique des huiles essentielles des rameaux de *Genévrier thurifère*

Composé	Indice de Kováts	Teneur (%)
Tricyclène	926	1,0
α-Pinène	939	13,2
Sabinène	976	40,1
β -Pinène	981	3,6
Myrcène	992	0,2
α -Phellandréne	1 005	2,1
δ -3-Carène	1 011	1,6
α -Terpinène	1 018	0,2
p-Cymène	1 026	0,6
Limonène	1 031	1,5
γ -Terpinène	1 059	0,4
Terpinolène	1 085	2,1
Myrcénol	1 119	0,3
Trans-pinocarvéol	1 140	0,2
Terpin-4-ol	1 172	0,5
α -Terpinéol	1 189	0,6
Citronellol	1 228	0,9
Piperitone	1 250	1,0
Acétate d'iso-pulégyl	1 281	1,6
Acétate de bornyl	1 285	0,5
Acétate trans-carvyl	1 337	0,3
Acétate d'α-terpényl	1 350	3,8
E- β -caryophyllène	1 418	0,4
Germacrène D	1 480	0,5
δ-Cadinène	1 524	6,0
Elemol	1 549	4,5
Germacrène B	1 556	1,1
Acorénone	1 685	0,3

I.2.2- Composition chimique de l'huile essentielle de Genévrier rouge

Les constituants chimiques de l'huile essentielle Genévrier rouge analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 6), Le α -Pinène est le composé majoritaire avec 34,23% suivis du δ -3-Carène avec 20,64% et du Limonène avec 14,56%.



Tableau 7 : Composition chimique (en pourcentage) des huiles essentielles des rameaux de *Genévrier rouge* de Mehdia.

Composé	Indice de Kováts	Teneur (%)
Tricyclène	926	1,04
α-Pinène	939	34,23
Sabinène	976	1,01
β-Pinène	981	4,65
Myrcène	992	0,20
α -Phellandrène	1 005	2,19
δ-3-Carène	1 011	20,64
α -Terpinène	1 018	0,19
p-Cymène	1 026	0,56
Limonène	1 031	14,56
γ -Terpinène	1 059	0,39
Terpinolène	1 085	4,12
Myrcénol	1 119	0,24
Trans-pinocarvéol	1 140	0,20
Terpin-4-ol	1 172	0,47
α -Terpinéol	1 189	0,52
Citronellol	1 228	0,80
Piperitone	1 250	0,95
Acétate d'iso-pulégyl	1 281	1,61
Acétate de bornyl	1 285	0,35
Acétate trans-carvyl	1 337	0,31
Acétate d'α-terpényl	1 350	6,80
E- β -caryophyllène	1 418	0,34
Germacrène D	1 480	0,43
δ -Cadinène	1 524	0,63
Elemol	1 549	0,49
Germacrène B	1 556	1,27
Acorénone	1 685	0,37

I.2.3- Composition chimique de l'huile essentielle de Cypres de l'atlas



Les constituants chimiques de l'huile essentielle Cyprès de l'atlas analysés par CPG-SM sont représentés dans le (tableau 7), L'acétate de bornyle est le composé majoritaire avec 30,7% suivis du α -pinène avec 23,5% et du Camphre avec 17,3%.

Tableau 8 : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Cyprès de l'atlas* du Chefchaouen (Maroc)

Constituants	Indice de Kováts	Teneur en %
α -thujène	931	2,3
α-pinène	939	23,5
Camphène	953	2,6
β -pinène	980	0,5
δ -3-carène	1011	0,1
α -terpinène	1018	0,3
p-cymène	1026	0,9
Limonène	1031	6,0
α -campholénal	1125	0,3
Oxyde de(Z)-limonène	1134	0,3
(E)-pinocarvéol	1139	0,6
Camphre	1143	17,3
Isobornéol	1156	0,1
Bornéol	1165	4,6
4-terpinéol	1177	0,7
Cymène-8-ol	1180	0,6
α -terpinéol	1189	0,4
Myrténol	1194	0,5
Verbénone	1204	1,7
(E)-carvéol	1217	0,7
(Z)-carvéol	1229	0,1
acétate de bornyle	1285	30,7
Acétate d' α -terpényle	1350	0,6
α -copaène	1376	0,1
Germacrene D	1480	0,1
(E)- β -guaïène	1500	0,1

γ -cadinène	1513	0,1
oxyde de caryophyllène	1581	0,2
Widdrol	1597	0,4

II-Etude de l'effet des huiles essentielles en milieu solide :

Dans ce travail nous nous sommes intéressé en premier lieu à la mise en évidence du pouvoir inhibiteur des HE sur les trois souches bactériennes. Pour cela nous avons utilisé la méthode des aromatoigrammes où nous avons testé dans la même boîte une seule huile sur les trois souches bactériennes. Ce qui nous a fournis des résultats bien visibles.

I_1 = *Salmonella spp*
 I_2 = *Escherichia coli*
 I_3 = *Staphylococcus aureus*



Figure 16 : Effet de l'huile essentielle des feuilles du Genévrier thurifère sur les trois souches bactériennes

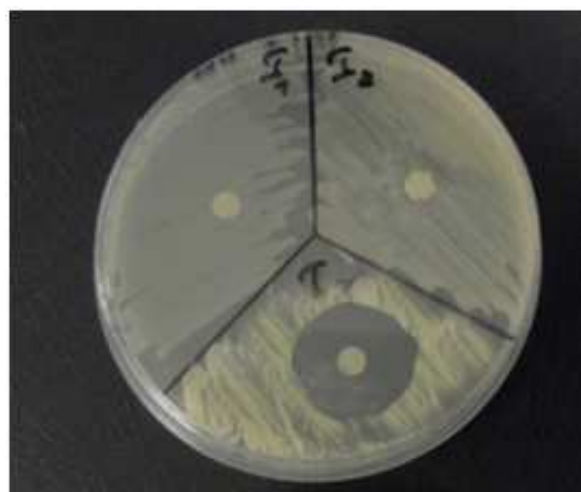


Figure 17 : Effet de l'huile essentielle des feuilles du Genévrier rouge sur les trois souches bactériennes



Figure 18 : Effet de l'huile essentielle des feuilles du Cyprès de l'atlas sur les trois souches bactériennes



Figure 19 : Effet de l'huile essentielle du bois du Genévrier rouge sur les trois souches bactériennes



Figure 20 : Effet de l'huile essentielle Thymus riararum sur les trois souches bactériennes



Figure 21 : Effet de l'huile essentielle du bois du Cyprés de l'atlas sur les trois souches bactériennes



Figure 22 : Effet de l'huile essentielle du bois du Genévrier thurifère sur les trois souches bactériennes

Les résultats des diamètres d'inhibition imprégnés de 10 μ l de chaque huile essentielle vis-à-vis des souches testées sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Diamètre d'inhibition des huiles essentielles vis-à-vis des souches testées



N.B : le diamètre en mm

Huiles essentielle \ Souche	Diamètre d'inhibition des huiles essentielles vis-à-vis des souches testées		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Feuilles de Genévrier thurifère	0	0	14
Bois du Genévrier thurifère	0	0	15
Feuilles du Cyprés de l'atlas	0	0	25
Bios du Cyprés de l'atlas	0	0	7
Feuilles du Genévrier rouge	0	0	30
Bios du Genévrier rouge	0	0	16
Thymus riatarum	0	0	14

Nous remarquons que les huiles essentielles du Genévrier rouge, Genévrier thurifère, Cyprés de l'atlas et Thymus riatarum ont donné un effet positif vis-à-vis du *Staphylococcus aureus* alors que les deux autres souches se sont montrées résistantes.

Discussion

La littérature avance que ces HE (Genévrier thurifère, Cyprés de l'atlas, Genévrier rouge et Thymus riatarum) ont montré une action sensible vis-à-vis de souches microbiennes par exemple le travail de Nazik M. *et al*, 2011 qui montre l'efficacité de l'huile essentielle genévrier rouge contre les champignons de pourriture du bois, ce qui montre l'intérêt de ces huiles.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES



Conclusion

Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé l'extraction des huiles essentielles de trois plantes, dans un second temps la caractérisation de ces huiles essentielles, et dans un dernier temps leurs activités antibactériennes.

La détermination des rendements en huiles essentielles ont montré une rentabilité en huile chez *Thymus riatarum* (1,1%), et *Genévrier rouge* (0,9 %), alors qu'il s'affaiblit en passant de *Genévrier thurifère* (0,6%), et *Cyprès de l'atlas* (0,2%).

L'étude du pouvoir antibactérien par la méthode de l'antibiogramme a confirmé certaines propriétés que possèdent ces huiles essentielles. Suivant les résultats obtenus nous pouvons prédire que ces huiles essentielles ont des activités antibactériennes intéressantes.

En effet les huiles essentielles de *Genévrier thurifère*, *Cyprès de l'atlas* et *Genévrier rouge* ont donné un effet inhibiteur important vis-à-vis de la bactérie *Staphylococcus aureus* alors que les deux autres souches (*Salmonella spp* et *Escherichia coli*) se sont montrés résistants.

L'analyse des compositions chimiques des huiles essentielles peut expliquer leurs effets sur les souches testées par la présence de la molécule alpha-pinène.

Perspectives

Pour les perspectives de ce travail, nous pouvons citer de réaliser:

- L'évaluation de l'activité antioxydante de ces huiles essentielles.
- La détermination de la CMI et CMB des huiles essentielles qui ont données un effet positif inhibiteur.
- L'activité antimicrobienne de ces huiles essentielles sur d'autres souches (moisissures, levures, bactéries...).



Références bibliographiques

- Abdelghafour.T; El-Araki, 1997.** Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles des plantes Aromatiques.
- Association Française de Normalisation, 1986,** Recueil de normes Françaises “Huiles essentielles”, AFNOR, Paris. AFNOR NF T 75-006.
- Auclair L. 1993 :** Forêt Méditerranéenne, tome XIV, n°4. P. 306-314
- Benjilali & Zrira. 2005.** Plantes Aromatique et Médecinales : Atouts du secteur et exigences pour une valorisation durable. Editions Actes.
- Benjilali. B. 1992:** Plantes aromatiques et médicinales, atouts du secteur et exigences pour une valorisation durables. Pp. 8.
- Benkaddour 2002,** Situation épidémiologique des toxi-infections alimentaires collectives au Maroc, 1992-2001. Séminaire national sur l'application du système HACCP dans le domaine de l'hygiène alimentaire. Ministère de la santé. Rabat.
- Bernard. T. 1988:** Le concept de Raffinage végétal, Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Boop CA, Benner FW, Wells JG, Strokbine N. 1999.** Escherchia, shigella, and salmonella.. En: Manual of clinical microbiology. Murray PR, E JO Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover. 7th ed Washington, D.C. Ed. ASM. Press. :459-474.
- Bouzouita N., Ben Halima M., Chaabouni M., 2008.** COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉS ANTIOXYDANTE, ANTIMICROBIENNE ET INSECTICIDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Juniperus phoenicea*
- Brunechon. J. 1987: Pharmacognosie,** Ecole technique de documentation, Ed. Ravoilie.
- Budhiraja S.S., Cullum M.E., Evangelistra L. & Habanova S.T. 1999.** Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. *J. Manipulative Physiol. Ther*, 22 : 447-453.
- Busatta C.; Mossi; A. J. ; Rodrigues M. R.; Cansian R. L.; Oliveira J.V., 2007.** EVALUATION OF ORIGANUM VULGARE ESSENTIAL OIL AS ANTIMICROBIAL AGENT IN SAUSAGE.
- 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.
- Cassiano Busatta; Altemir José Mossi; Maria Regina Alves Rodrigues; Rogério Luis Cansian; José Vladimir de Oliveira, 2007.** EVALUATION OF ORIGANUM VULGARE ESSENTIAL OIL AS ANTIMICROBIAL AGENT IN SAUSAGE.
- Cawthorn A. 1995 –** A review of the literature surrounding the research into aromatherapy. *Complement Ther Nurs Midwifery*, 1(4): 118-120.
- Chaumont. J.P., Leger D. 1989.** Propriétés antifongiques de quelques phénols et de composés chimiquement très voisins. *Relation structure –activité. Plant Med. Phyto*. 23(2), 124-126.



- Chemat, F.; Lucchesi, M.E.; Smadja, J.; Favretto, L.; Colnaghi, G.; Visinoni, F. 2006.** Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta* 555,157-160.
- Duquenois. P. 1968:** L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, leur normalisation et l'Europe du médicament. *Parf. Cosm. Soy.*, 11: Pp. 414-418.
- EL KALAMOUNI C., THÈSE En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE présentée par : 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.
- Fleurentin. J. 2008:** Plantes médicinales traditions et thérapeutiques, éditions Ouest-France. P.8.
- George. S. O. 1979:** Les huiles essentielles - généralités et définitions in *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*, éd. Maloine. Pp. 141-144.
- Hernandez Ochoa L.R, 2005.** Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine « solvant/actif » d'origine végétale. P.32, 33, 34.
- Jing Y. & Waxman S. 1995.** Structural requirements for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavors. *Anticancer Res.*, 15: 1147-1152.
- Kalemba D, Kunicka A (2003)** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr.Med. Chem.* 10: 813-829
- Kempf M., Eveillard M., Kowalczyk F., Rossines E., Panhelleux G., M.-L. Joly-Guillou a, 2011.** Etude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composés JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologies.
- Konno L., Feldmann F.M. & Mc Dermott W. 1967.** Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 95: 461.
- Lechec H, Gaillard J-I, Simon et M 1995.** Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien. Doim Editeurs, Paris.
- Leclercq R. 2000.** Staphylococcus et antibiotiques. In : Frenrey J., renaud F., Hansem W., bollet CL. (eds), *Précis de Bactériologie Clinique*. Editions Alexandre Lacassagne : Paris, 611-618.
- Mangena T., Muyima N.Y.O. 1999.** Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of artemisia afra, pteronia incana and rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 28(4) 291-296.
- Mann J. (1987).** Secondary metabolism. Clarendon Press, Oxford, 374 p.
- Mengel, P.; Beh, D.; Bellido, G.M.; Monpon, B. 1993.** VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums Cosmétiques Arômes* 114, 66-67.
- Mensouri. N. 2008:** Valorisation des huiles essentielles de Juniperus Thurifera et Juniperus Oxydrus du maroc, thèse Présentée pour obtenir le diplôme de Master de la faculté des sciences et techniques de Fes. pp. 3-4.
- Mighri H. ; Hajlaoui, H. ; Akrouit A. ; Najjaa A. ; Neffati H., 2009.** Antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia herba-alba essential oil cultivated in Tunisian arid zone.
- Nakamura C. V., Ueda-Nakamura T., Erika Bando, Abrahão Fernandes Negrão Melo, Díogenes Aparício Garcia Cortez, Benedito Prado Dias Filho, 1999.** Antibacterial Activity of Ocimum gratissimum L. Essential Oil.



- Nejad Ebrahimi S. , Hadian J. , Mirjalili M.H. , Sonboli A. , Zadi M. 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages . Food Chemistry 110
- NHS Choices, 2008. Food poisoning .
- Okoh O.O., Sadimenko A., Afolayan A.J. , 2009. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods.
- OMS, 2002. Stratégie mondiale de l'OMS pour la salubrité des aliments : une alimentation à moindre risque pour une meilleure santé.
- Peana A.T., Moretti M.D. & Juliano C. 1999. Chemical composition and antimicrobial action of the essential oil of *Salvia desoleana* and *S. sclarea*. Planta Med. 65(8): 752-745.
- Pellecuer J., Roussel J.L, Andary C. 1980. Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. Rivista Italiana Essenzo (EPPOS). 23,45-50
- Raho B. and Benali M., 2008. Contribution to the Antiseptic Effect Study of Two Eucalyptus Species.
- Rhayour K. : Thèse Présentée en vue de l'obtention du Doctorat National, 2002. Sujet de thèse : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*
- Sauvage. C. 1974: L'état actuel de nos connaissances sur la flore du maroc. Colloque du CNRS n° 235, la flore du bassin Méditerranéen. Paris.
- Siddiqui Y.M., Ettayebi M., Haddad A.M & Al-Ahdal M.N. 1996. Effect of essential oils on the enveloped viruses : antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type 1 and Newcastle disease virus. Med. Sci. Res, 24 : 185-186.
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T. and Arsenakis M.. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *origanum* essential oils. J. Agric. Food Chem., 44, 1202-1205.
- Viollon C., Chaumont. J.P. 1994. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. Mycopathologia. 128(3), 151-153.
- Zambonelli. A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A. 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *thymus vulgaris* L. J. Essent. Oil Res 16(1), 69-74.



Annexe 1

Représentation de l'INPMA de Taounate

المملكة المغربية وزارة التكوين الوظيفي والتعليم العالي وتكوين الأبحاث العلمي جامعة سيدي محمد عبد الله، فاس 	Royaume du Maroc Ministère de l'Éducation, de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Formation des Cadres Université Sidi Mohammed ben Abdellah - Fès 
المعهد الوطني للنباتات الطبية والعطرية	Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques
	Recherche / Développement : Conservation - Production - Valorisation - Formulation Recherche appliquée ✓ Recherche et identification des plantes ✓ Culture in vitro et domestication ✓ Etudes chimiques et biochimiques ✓ Synthèse et hémi synthèse chimique ✓ Optimisation des procédés ✓ criblage toxico-pharmacologique et biologique
	Développement socio-économique ✓ Création de PME/PMI ✓ Pépinière de projets ✓ Incubation ✓ Accompagnement des ONG
	Expertise ✓ Formation continue ✓ Culture ✓ Production ✓ Transformation ✓ Formulation 
المعهد الوطني للنباتات الطبية والعطرية ص.ب. 159، تاونات المركز 34000، المغرب الهاتف: 0535689472/20 - الفاكس: 0535689400	Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques - INPMA BP 159 Taounate Principale 34000 Tél. 0535689472/20 - Tél./Fax : 0535689500, www.usmba.ac.ma/lnp.ma - lnpma@hotmail.com

MISSIONS

- L'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques a pour mission de :
1. Effectuer et promouvoir des travaux de Recherche/Développement;
 2. Organiser des séminaires, des conférences et des expositions dans le domaine des plantes médicinales et aromatiques, ainsi que dans les autres domaines utilisant les produits naturels;
 3. Valoriser et promouvoir les plantes médicinales et aromatiques, l'utilisation et l'intégration des produits naturels dans les différents secteurs socio-économiques par la création de pépinières de projets;
 4. Créer des zones pilotes d'exploitation des plantes médicinales et aromatiques à l'échelle nationale dans le cadre des petites et moyennes entreprises (PME) et des petites et moyennes industries (PMI);
 5. Etablir des relations de coopération avec les organismes nationaux et internationaux et coordonner à l'échelle nationale les activités relatives aux plantes médicinales et aromatiques.

Une équipe pluridisciplinaire

- ✓ Enseignants chercheurs
- ✓ Ingénieurs
- ✓ Administrateurs
- ✓ Techniciens



Superficie et infrastructure

- ✓ Superficie couverte: 3500 m²
- Hall technologique
- Laboratoires
- Autres
- ✓ Jardin des plantes médicinales et aromatiques : 7 ha
- ✓ Ferme d'expérimentation : 18 ha



Matériels scientifiques de pointe

- ✓ Atomiseur
- ✓ Cytomètre de flux
- ✓ Unité polyvalente
- ✓ Alambic
- ✓ HPLC préparatoire
- ✓ Autres



Services & expertises

- ✓ Formation continue et perfectionnement
- ✓ Appui à la mise en culture et standardisation
- ✓ Optimisation des techniques de ramassage, de culture, de récolte, de séchage et de conditionnement
- ✓ Aide à la mise en place des techniques d'extraction, d'analyse et des unités de production
- ✓ Réalisation des fiches techniques d'analyses et de certification
- ✓ Préparation et formulation de nouveaux produits naturels à valeur ajoutée
- ✓ Appui technique à la valorisation des productions végétales

المهام

- بموجب المرسوم رقم 2.01.1837 الصادر في 04 يونيو 2002 و المرسوم رقم 2.04.89 الصادر في 10 من رجب الآخر 1425 (7 يونيو 2004) خصصت للبعيد لوضع البعثات الطبية والعطرية ذات المهمات التالية:
- 1- القيام بالعمل البحثي والتجويبي والتجويبي
 - 2- تنظيم دورات دراسية وندوات وندوات للبحر في البعثات الطبية والعطرية والشعاب الطبيعية
 - 3- ابراز من البعثات الطبية والعطرية والتجويبي بما في استعمال وبيع البعثات الطبية في مختلف البعثات الوطنية والاعتماد على مبادئ التفتيش
 - 4- خلق مناطق قومية لاستغلال البعثات الطبية والعطرية على البعثات الوطنية في إطار التعاونات العلمية والتجوية والاعتماد على البعثات والتجوية
 - 5- ابراز البعثات الطبية والعطرية والتجويبي بما في استعمال وبيع البعثات الطبية في مختلف البعثات الوطنية والاعتماد على مبادئ التفتيش
 - 6- ابراز البعثات الطبية والعطرية والتجويبي بما في استعمال وبيع البعثات الطبية في مختلف البعثات الوطنية والاعتماد على مبادئ التفتيش



المواد البهريّة والمادّية

- تتمتع البعثات الطبية والعطرية بتمويل مادي من أجل القيام بمهامها البحثية والتجوية والتجوية
- تمويل البعثات الطبية والعطرية
 - تمويل البعثات الطبية والعطرية
 - تمويل البعثات الطبية والعطرية
 - تمويل البعثات الطبية والعطرية
 - تمويل البعثات الطبية والعطرية



التجهيزات

- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية
- ✓ أجهزة التحليل والتجوية



مواضيع البحث التطبيقي والتجويبي

- تتمتع البعثات الطبية والعطرية بتمويل مادي من أجل القيام بمهامها البحثية والتجوية والتجوية
- تمويل البعثات الطبية والعطرية
 - تمويل البعثات الطبية والعطرية
 - تمويل البعثات الطبية والعطرية
 - تمويل البعثات الطبية والعطرية
 - تمويل البعثات الطبية والعطرية

