

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA

FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUE ET BIOLOGIQUES

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE



Projet de fin d'études
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
MASTER 2

Option : Sciences alimentaires

THEME :

Extraction. Identification d'huiles essentielles de
Lavandula officinalis et étude
de ses activités antimicrobiennes

Présenté par :

TOUDERT Amel

La date de soutenance : 18/12/2013

Devant le jury composé de :

M ^r RAMDANE S.	MAA	USDB	Président du jury
M ^r BOUSBIA N.	MCB	USDB	Promoteur
M ^r AMALOU D	MAA	USDB	Examineur
M ^{me} KOUIDRI A.	MCB	USDB	Examinatrice

Année universitaire 2012 /2013

REMERCIEMENTS

Je remercie dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements aux membres du jury :

MRAMDANE S, qui m'a fait l'honneur de présider le jury, Mr AMALOU D, et Mme KOUIDRI A. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et mes remerciements pour avoir accepté de faire partie du jury et pour avoir bien voulu évaluer ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon promoteur, Mr BOUSBIA N, pour avoir bien voulu m'encadrer, pour son aide, sa patience, et son suivi tout au long de la réalisation de ce mémoire. J'espère qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je veux faire part aussi de toute ma gratitude à Mr MEKARNIA M, directeur d'EXTRAL-bio pour son aide et sa disponibilité.

Je témoigne ma gratitude et mes remerciements à Melle YAGOUB Ouahchia que je ne saurai assez remercier pour tout ce qu'elle a fait.

A toute ma famille :

A mes parents, de toujours croire en moi

A mes sœurs surtout et zazi, de toujours être présente

Mon marie, pour le soutien morale et son encouragement

Ma belle sœur wahiba, pour tous sons aide st sa présence.

Pour mes filles :

A mon trésor MELISSA qui a ensoleillé ma vie, et mon bébé MERIEM, que j'aime beaucoup.

Enfin, j'exprime ma profonde reconnaissance à toutes les personnes, qui m'ont aidée d'un sourire, d'une critique, d'un encouragement ou d'un service.

Thème : Extraction, identification de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* L. et étude de son pouvoir antimicrobien.

La plante aromatique fraîche (*Lavandula officinalis*), a subi une extraction à l'échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau, le rendement enregistré était de 0,44 %. Ensuite des analyses ont été effectuées pour déterminer ces caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques.

La composition chimique de l'huile essentielle extraite a été caractérisée et identifiée par CPG/FID, les résultats de l'analyse ont indiqué un taux élevé des composés monoterpéniques notamment le linalol (40,8%), α - pinène (18.7%) et α -thymène (11.47%) et la présence de quelques composés sesquiterpéniques comme le β -caryophyllène (3.5 %).

De même son pouvoir antimicrobien a été testé vis-à-vis 3 souches bactériennes et une souche fongique, les résultats relatifs ont montré un degré de sensibilité variable d'une souche à une autre à savoir les gram négatif et les gram positif.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices a été effectuée pour les bactéries les plus sensibles : *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*. et les valeurs enregistrées étaient comprises de 125 μ L /mL à 500 μ L /mL.

Mots clé : extraction, *Lavandula officinalis*, entraînement à la vapeur, rendement, CPG/FID, activité antimicrobienne, CMI.

Theme: Extraction, identification the essential oil of *Lavandula officinalis* and study of its antimicrobial capacity.

Abstract

The aromatic plant fraiche (*Lavandula officinalis*), has undergoes an extraction on an industrial scale by drive with the steam, the recorded output was of 0, 44%. Then analyzes were carried out for given its characteristics organoleptics and physicochemicals.

The chemical composition of extracted essential oil was characterized and identified by CPG/FID, the results of the analysis indicated an high rate of the compounds monoterpenic in particular linalol (40,8%), α -thyéne (18,7%) and α -pinene (1,47%) and the presence of some compounds sesquiterpinic like the β -caryophyllene (3,5 %).

Also its antimicrobial capacity was tested opposite 3 bacterial strains and a fungic stock, the relative results showed a degree of sensitivity variable of a stock to another to knowing the gram negative and the gram positive.

The determination of the inhibiting minimal concentrations was carried out for the most sensitive bacteria: *B.subtilis*, *S.aureus* and *E.coli*. et the recorded values were included/ understood of 125 μ L/mL to 500 μ L/MI.

Keywords: Extraction, *Lavandula officinalis*, steam, performance, CPG/ FID, antimicrobial testing, CMI.

الموضوع: تحديد الزيت العطري المستخلص من نبات عطري للخزامة
ودراسة قوتها المضادة للميكروبات.

ملخص

النبتة العطرية الخزامة الطازجة خضعت للاستخلاص الزيت الاساسي صناعيا بواسطة التقطير ببخار الماء الإنتاجية المسجلة قدرت ب 0.44 % . ثم أجريت تحليلات لتحديد خصائصه الحسية الفيزيائية و الكيميائية.

التركيب الكيميائي للزيت الاساسي المستخرج تم تحديده بواسطة CPG / FID , أشارت نتائج التحليل الى نسبة عالية من المركبات monoterpene خاصة α - pinène (18.7%) et α -thyène (11.47%)
linalol (40,8%)

ووجود بعض المركبات sesquiterpinique مثل β -caryophyllene (3.5%).

كما تم اختبار نشاطه المضاد للميكروبات وجها لوجه ثلاث سلالات البكتيرية و سلالة فطرية واحدة. أظهرت النتائج وجود حساسية نسبية متغيرة من سلالة لأخرى وهذا حسب سلبية الجرام وإيجابية الجرام.

تم تحديد تراكيز الحد الأدنى المثبطة للبكتيريا الأكثر حساسية.

E. coli و *subtilis*, *S. aureus*

وتراوحت القيم المسجلة من 125 μ L /mL الى 500 μ L /mL

الكلمات الجوهرية: الاستخراج, الزيت الاساسي, الخزامة, التقطير بالبخار, الإنتاجية, CPG/ FID نشاط مضاد للميكروبات, CMI.

Liste des tableaux :

Tableau 1: Classification de la plante étudiée.....	25
Tableau 2: Liste et caractéristiques des microorganismes testés.....	26
Tableau 3: Valeurs des concentrations (μL d'HE/mL).....	34
Tableau 4: Le rendement (%) en H.E. de la plante utilisée.....	36
Tableau 5: Tableau récapitulatif des caractéristiques organoleptiques.....	37
Tableau 6: Tableau récapitulatif des analyses physico-chimiques effectuées.....	37
Tableau 7: Les différentes classes des diamètres des zones d'inhibition	38
Tableau 8: Résultats des zones d'inhibition.....	38
Tableau 9 : la concentration minimale inhibitrice.....	42

Liste des figures :

Figure 1 : Monoterpène.....	5
Figure 2 : Sesquiterpène.....	5
Figure 3. Principe de l'alambic pour distiller les huiles essentielles.....	.7
Figure 4 : Extraction par hydrodiffusion	8
Figure 5 : Extraction par micro-ondes.....	9
Figure : Les flacons contenant des huiles essentielles sont en verre teinté	11
Figure 7: <i>Lavanudula angustifolia</i> ou <i>officinalis</i>	20
Figure 8: Feuilles de <i>Lavandula angustifolia</i>21
<hr/>	
Figure 9: Territoire de la lavande.....	.22
Figure 10 : Principe de la méthode d'aromatogramme.....	32
Figure 11 : Schéma récapitulatif représente la procédure expérimentale.....	35
Figure 12 : Chromatogramme de l'HE de <i>Lavandula officinalis</i> obtenue par CPG/FID	39
Figure 13 : Effet antimicrobien de l'HE de lavande.....	41
Figure 14 : représentation graphique de sensibilité des souches.....	.42
Figure 15: représentation graphique des CMI calculées.....	45
Figure 16 : Photographies des résultats de CMI d'HE de <i>Lavandula officinalis</i>46
<hr/>	

Liste des abréviations

% : Pourcentage

d_t^t : Densité

μ l : Microlitre

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC: American Type Culture Collection

B.H.I.B: Brain Heart Infusion

C.R.A.P.C: Centre de recherché et d'analyse physico-chimiques

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CPG / FID: Chromatographie en phase Gazeuse a détecteur d'ionisation de flamme

g : gramme

h : heure

H : Taux d'humidité

HE : Huile essentielle

M : Masse de la matière végétale

MH : Muller Hinton

mn : Minute

Ø : Diamètre

RHE : Rendement en huile essentielle

UFC : Unité formant colonie

UV : ultra violet

Introduction	1
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE I : Généralités sur les huiles essentielles	
I.1 Historique.....	3
I.2 Définition	3
I. 3 Composition chimique	4
I.3.1 Composés terpéniques	5
I.3.2 Les monoterpènes	5
I.3.3 Les sesquiterpènes	5
I.3.4 Les composés aromatiques	5
I.4 Méthodes d'extraction des huiles essentielles	6
I.4.1 La distillation à la vapeur d'eau	6
I.4.2 L'expression à froid	7
I.4.3 L'extraction par solvants.....	7
I.4.4 L'extraction par hydrodiffusion	8
I.4.5 Extraction par micro ondes	8
I.4.6 Extraction au CO ₂ supercritique	9
I.5 Caractéristique physico-chimique et organoleptique des huiles essentielles.....	10
.....	
I.5.1 Caractéristiques physico-chimique des huiles essentielles	10
I.5.1.1 La densité	10
I.5.1.2 La solubilité	10
I.5.1.3 L'indice de réfraction	10
I.5.1.4 Un pouvoir rotatoire	10
I.5.1.5 L'indice d'acide	10

I.5.1.6 L'indice d'ester	10
I.5.2 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles.....	10
I.5.2.1 La couleur	10
I.5.2.2 L'odeur	10
I.5.2.3 La saveur	11
I.6 La conservation des huiles essentielles	11
I.7 Domaines d'application des huiles essentielles	12
I.7.1 En pharmacie	12
I.7.2 En cosmétologie	12
I.7.3 Dans l'industrie agro-alimentaire	13
I.7.4 Dans divers industries	14

Chapitre II Activité antimicrobienne des huiles essentielles

II.1 Généralité	15
II.2 Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries	15
II.2.1 Effet de la composition chimique des huiles essentielles sur l'activité antimicrobienne	16
II.2.2 Effet d'autres facteurs sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles	16
II.3 Nature de l'activité antimicrobienne (Bactéricide et bactériostatique)	17
II.4 Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	17
II.4.1 Technique en milieu solide (Méthode de la diffusion en disque)	17
II.4.2 Technique en milieu liquide (méthode de dilution)	18
II.4.3 La dilution en bouillon	18
II.4.4 La dilution en gélose.....	19

CHAPITRE III: Généralités Sur la lavande

III.1. Présentation et description	19
III.2. Origine de la lavande	20
III.3 Composition chimique d'huile essentielle de lavande	21
III.4 domaines d'application d'huile essentielle de lavande.....	21

2^{ème} PARTIE : Partie expérimentale

CHAPITRE I : Matériel et méthodes

I. Matériels et méthodes	22
I.1 Objectifs.....	22
I.2 Matériel	22
I.2.1 Matériel biologique:	22
I.2.1.1 Matériel végétal	22
I.2.1.2 Choix des souches microbiennes	23
I.2.2 Matériels non biologique.....	24
I.2.2.1 Extraction d'huile essentielle à échelle industrielle	24
I.2.2.2 Détermination du rendement d'extraction.....	24
I.3 Méthodes	27
I.3.1 Étude analytique de l'HE de lavande	27
I.3.1.1 Propriétés organoleptiques	27

:(la pharmacopée européenne, 2004)

I.3.1.2 Indices physiques et chimiques.....	27
I.4 Analyse de la composition chimique d'HE par CPG /DIF	29
I.5 Etude quantitative de l'effet antimicrobien	31
I.6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	35

par la méthode de dilutions en milieu solide.

CHAPITRE II : Résultats et discussions

II.1. Rendement en huile essentielle	36
II.2. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de la lavande	37
II.3 Les indices physico-chimiques.....	37
II.4. Analyse de la composition chimique	37
II.5. Les résultats de l'activité antimicrobienne	39
II.5.1. Aromatogramme	39
II.5.2. Les résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	44
-Conclusion.....	48

Les plantes médicinales et aromatiques représentent une source inépuisable et renouvelable des substances naturelles bioactives, les effets antimicrobiens de différentes espèces de plantes aromatiques et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit de manière empirique pour l'assainissement de l'air, ou pour augmenter la durée de vie des produits alimentaires.

Aujourd'hui encore, la science confirme les différentes vertus des plantes aromatiques et de leurs huiles essentielles et leurs extraits bruts dont les domaines d'application sont très variés et qui sont très utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs, et dans les cosmétiques, les parfumeries, les industries de savon et de détergents en volume impressionnant.

Les risques inhérents de l'utilisation des produits chimiques de synthèse dans la lutte contre les pathogènes des denrées alimentaires sont manifestes et ces produits chimiques deviennent de plus en plus inefficaces avec le développement des souches résistantes.

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits « naturels » sans conservateurs synthétiques qui ont montré un certain nombre d'inconvénients et des limites de leur utilisation et elles sont avérées responsables d'effets indésirables ceci conduit l'industrie alimentaire à envisager l'incorporation des substances considérées « non chimiques ».

Les H.E. et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires, pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaire, d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "*généralement reconnus comme sains*: Generally Recognized As Safe (GRAS) " ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration Américaine (FDA). Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais des études préalables sont nécessaires pour mieux cerner leur activité antimicrobienne (Caillet et Lacroix, 2007).

Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles peuvent ainsi être mises à profit dans le but d'améliorer la conservation des aliments est évidemment limitée dans la mesure où, aux concentrations actives requises, le goût des aliments est souvent modifiés, ce qui n'est pas toujours souhaité.

On attribue aux extraits de plantes aromatiques et notamment aux H.E. un certain nombre d'activités biologiques potentielles susceptibles de trouver des applications en agroalimentaire (Alitonou *et al*, 2005).

C'est dans cette optique se situe notre étude dont les objectifs principaux se résument dans les volets suivants :

- Extraction industrielle de l'huile essentielle à partir de la
- plante aromatique « *Lavandula officinalis* »
- Caractérisation de la composition chimique de l'extrait par la chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- Des tests de sensibilité pour évaluer « *in vitro* » l'activité antimicrobienne en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'HE de la lavande sur un ensemble de bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*).

Ce travail vise à identifier l'huile essentielle de *Lavandula angustifolia* L. et étude de son activité antimicrobienne.

Il sera donc réparti en deux parties, la première partie de la recherche bibliographique ou nous apportons dans le premier chapitre des généralités sur les huiles essentielles. Le deuxième chapitre sur les activités antimicrobiennes des huiles essentielles et dans le dernier chapitre (troisième) la monographie sur notre espèce (*Lavandula officinalis* L.), et la deuxième partie constitue de deux chapitres l'un de la partie expérimentale et l'autre des résultats trouvés, leurs interprétations et les discussions en terminant par une conclusion générale.

I. Matériel et méthodes

Notre stage pratique s'est étalé sur une période de six mois, de Février à Juillet 2013. Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- Extraction de l' HE est effectuée à Extral-bio, Société spécialisée dans l'industrie d'extraction et de commercialisation des huiles essentielles; situé en plein cœur de la Mitidja (Chéfa–Blida).
- La détermination des indices physico-chimiques :
 - Complexe pharmaceutique SAIDAL Filiale BIOTIC (Médéa)
 - L'analyse de la composition chimique au Centre de Recherche et analyse physico-chimiques (C.R.A.P.C de Bou Ismaïl).
- La détermination de l'activité antimicrobienne au service de microbiologie du centre hospitalo-universitaire FRANTZ FANON de Blida.

I.1 Objectifs

Les objectifs assignés à cette étude se résument à:

- Extraction de l'huile essentielle de lavande à partir de *Lavandula officinalis* ainsi l'évaluation du rendement d'extraction (%).
- Identification de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- l'activité antimicrobienne en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'huile extraite.

I.2 Matériel

I.2.1. Matériel biologique

I.2.1.1 Matériel végétal

L'huile essentielle a été extraite à Extral-bio, par entraînement à la vapeur à l'échelle pilote. Les huiles essentielles d'Extral-bio sont extraites de la sommité de la plante. (*Lavandula officinalis* Fig. II.1) récoltée de la région de Cherchel au mois de mai 2013.

A. Classification de la plante

La classification de la plante est répartie dans le tableau ci-dessous.

Tableau I.1: Classification de la plante étudiée.

Règne	Plantes
Sous-règne	Plantes vasculaire
Embranchement	Spermaphyte
Sous-embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédone
Sous-classe	Gamopétale
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Lavandula</i>
Espèce	<i>Lavandula officinalis L.</i>

(Source : Quezel et Santa, 1963)

➤ I.2.1.2 Choix des souches microbiennes

Le choix des bactéries s'est porté sur quatre souches de bactéries connues pour leur pathogénicité et pour leur implication fréquente dans la contamination des denrées alimentaires, appartenant à deux catégories différentes (Gram positive et Gram négative) et une souche fongique. L'efficacité des produits testés ainsi que leur modalité de pénétration dans la bactérie sont différentes.

Les souches bactériennes sont des lots de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance. La liste des souches est regroupée dans le tableau suivant :

Tableau I.2 : Liste et caractéristiques des microorganismes testés.

Nom de la souche	N° ATCC	Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+
<i>Bacillus subtilis</i>	6639	+
<i>Escherichia coli</i>	25922	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49616	-

I.2.2 Matériels non biologique

I.2.2.1 Extraction d'huile essentielle à échelle industrielle

La distillation à la vapeur d'eau est le procédé utilisé par Extral-bio ; dans cette extraction, 782 kg de plante (lavande) sont mises dans un alambic et sous l'effet de la chaleur l'eau s'y transforme en vapeur, celle-ci passe à travers les plantes, se volatilise et entraîne les molécules aromatiques, puis se condense dans le serpentin réfrigérant. A la sortie de l'alambic, un essencier sépare l'huile essentielle qui flotte à la surface de l'eau par différence de densité, cette dernière est récupérée, filtrée au laboratoire à l'aide d'une ampoule à décanter ; puis l'huile essentielle sera récupérée et stockée dans des bouteilles teintées pour éviter l'oxydation (Voir schéma II.1).

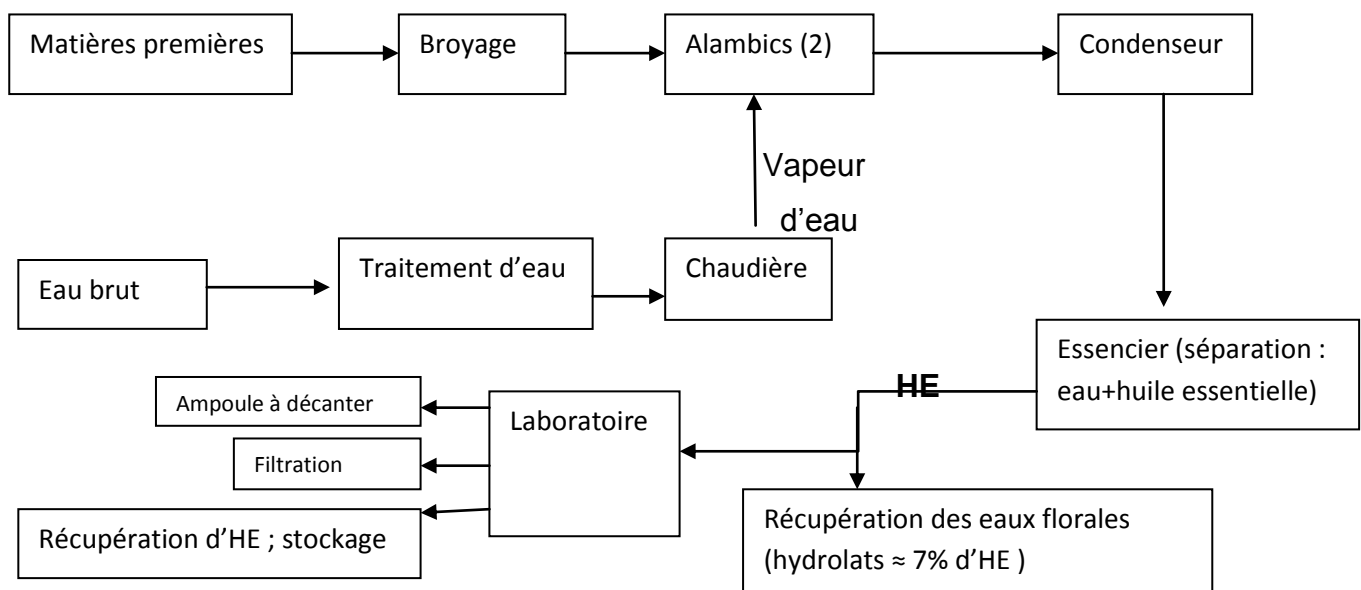


Schéma II.1 Extraction industriel d'HE de lavande.

I.2.2.2 Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction

(M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = \frac{M'}{M} \times 100$$

RHE : rendement en huile essentielle des fleurs sèches ;

M' : masse d'huile essentielle en gramme à partir des fleurs sèches ;

M : masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme et qui vaut 100 g.

I.3 Méthodes

I.3.1 Étude analytique de l'HE de lavande

II.3.1.1 Propriétés organoleptiques (Pharmacopée européenne, 2004)

❖ Aspect

L'aspect d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent qui peut nous apparaître sous forme solide ou liquide. Il est lié à la nature du produit désiré ainsi qu'au pouvoir de dissolution de la matière végétale.

❖ Odeur

L'odorat est un sens chimique très sensible, de plus, d'après la nature du système olfactif, une substance pour être sentie, elle doit être volatile.

❖ Couleur

La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui constituent l'extrait. Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile donnée.

II.3.1.2 Indices physiques et chimiques

❖ Densité relative NFT 75-111

La densité relative d_{20} d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance à 20°C et la masse d'un volume égale d'eau à la même température.

❖ Mode Opérateur

Au moyen d'une balance de précision, nous avons pesé 1 mL d'HE, puis nous avons pesé le même volume (1 mL) d'eau distillée.

❖ Méthode de calcul

La densité relative d'HE est exprimée selon la formule suivante :

$$d_{20} = \rho_{20(\text{HE})} / \rho_{20(\text{eau})}$$

Où :

$\rho_{20(\text{HE})}$: La masse volumique de l'huile essentielle à 20°C

$\rho_{20(\text{eau})}$: La masse volumique de l'eau distillée à 20°C

d_{20} : La densité relative de l'huile essentielle à 20°C.

❖ Détermination de l'indice de réfraction NFT 75-112

▪ Définition

L'indice de réfraction d'une HE est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux, de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante. Les produits étalons de qualité pour la réfractométrie accompagnés de leur indice de réfraction à 20°C sont les suivants :

- Eau distillée (1.333)
- Benzoate de benzyle (1.5685)
- Bromo-1 nahtalène (1.6585)

▪ Mode Opérateur

L'indice de réfraction est mesuré par réfractomètre dans lequel on introduit quelques gouttes d'eau distillée considérée comme étalon sur le prisme. L'appareil est réglé à 1.333. Ces gouttes sont essuyées et remplacées par quelques gouttes d'HE, puis on effectue la lecture.

❖ Détermination de l'indice d'acide NFT 75-103

L'indice d'acide I_A est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un gramme de substance.

❖ Mode Opérateur

Nous dissolvons 1 g de la substance à examiner (HE) dans 5 mL d'un mélange à volumes égaux d'alcool et d'éther, le solvant doit être neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0.1 M en présence de 0.5 mL de phénolphaléine. Après dissolution, nous titrons par l'hydroxyde de potassium 0.1 M, nous arrêtons le titrage lorsque la couleur rose persistante apparaît.

❖ Méthode de calcul

L'indice d'acide est exprimé selon la formule suivante :

$$I_A = \frac{5.61 \cdot V}{m}$$

Où :

I_A : L'indice d'acide

V : Le volume de KOH (0.1 M) consommé en mL.

m : La masse de la substance à examiner en g.

II.4 Analyse de la composition chimique d'HE par CPG /DIF

La CPG est une méthode de séparation mais aussi d'analyse. En effet, les temps de rétention peuvent donner une information sur la nature des molécules et les aires des pics fournissent une quantification relative. Depuis peu de temps, la quantification relative par CPG est remise en cause. En effet, l'utilisation des détecteurs

les plus répandus à ionisation de flamme (DIF) et/ou de spectrométrie de masse (DSM), ne donnent pas un facteur de réponse unique. Pour certaines familles de composés chimiques, il peut y avoir une erreur relative pouvant atteindre 60% (Bicchi *et al*, 2008). L'identification d'une substance peut être facilitée par la connaissance de son temps de rétention qui est une valeur caractéristique pour une phase stationnaire donnée. En effet, les temps de rétention de chaque composé dépendent des conditions expérimentales (nature et épaisseur de la phase stationnaire, programmation de la température, état de la colonne, ...etc.).

Une meilleure information peut être obtenue grâce à l'utilisation des indices de rétention, mesurés sur les colonnes apolaire et polaire, qui sont plus fiables que les temps de rétention

Par définition, l'indice de rétention d'un alcane normal est égal à 100 fois le nombre d'atomes de carbones présents dans le composé indépendamment du remplissage de la colonne, de la température et des autres conditions chromatographiques. Les indices de rétention de tous les composés autres que les alcanes normaux varient souvent de plusieurs centaines d'unités avec les paramètres de la colonne (**Skoog *et al*, 2003**).

Méthode de calcul des indices de Kovats : IK

$$IK = 100 \times \left(n + \frac{Tr_{(x)} - Tr_{(n)}}{Tr_{(n+1)} - Tr_{(n)}} \right)$$

n = nombre de carbone de la paraffine éluée avant le produit.

$Tr_{(x)}$ = Temps de rétention réduit du produit X.

$Tr_{(n)}$ = Temps de rétention réduit de la paraffine normale à n atomes de carbones éluée avant la produit X.

$Tr_{(n+1)}$ = Temps de rétention réduit la paraffine normale à n+1 atomes éluée après le produit X.

Conditions opératoires

L'analyse chromatographique de l'HE extraite à partir de la partie aérienne a été effectuées au niveau de C.R.A.P.C (Bou Ismail) sur chromatographe de type gazeuse

HEWLETT-PACKARD-HP-6890, équipée d'une colonne capillaire DN5 de 30 m de longueur, 0.32 de diamètre, d'un détecteur à ionisation de flamme de 260°C et alimenté par un gaz vecteur (N₂) et d'un injecteur splitless réglé à 250° C, la température de la colonne est programmée de 75° à 225°C.

Dans le but de calculer les indices de rétention relatifs aux composés contenus dans l'huile essentielle, une solution d'alcane normalisés (C₈-C₂₂) a été préparée et injectée.

II.5 Etude quantitative de l'effet antimicrobien

➤ Test *in-vitro*

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE, a été réalisé par la technique de diffusion en milieu solide appelée aromatoگرامme. Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (Bengelali et *al.*, 1986).

➤ Principe

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Le principe de l'aromatoگرامme est bien illustré dans la figure suivante.

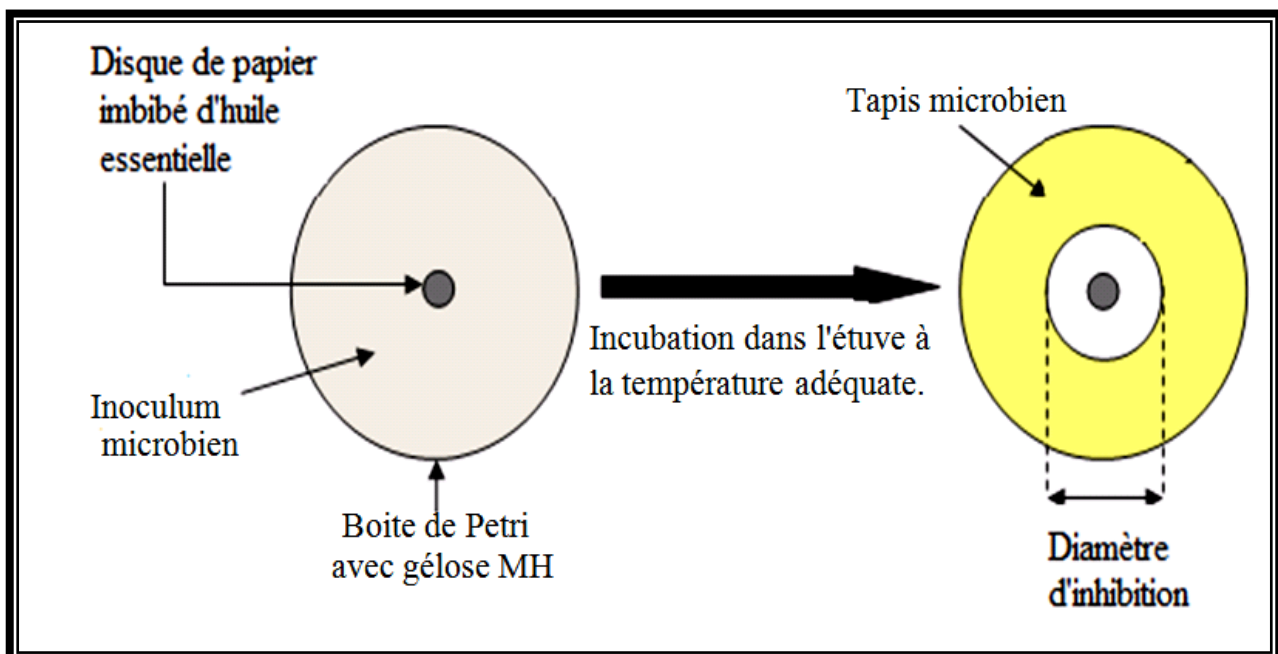


Figure II.2 : Principe de la méthode d'aromatogramme.

➤ **Méthode de diffusion en milieu gélosé.**

La méthode de diffusion en milieu gélosé est décrite par BOLOU (2011).

➤ **Préparation des suspensions microbiennes**

- A partir de colonies jeunes de 18 à 24 h, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau distillée stérile pour chaque souche.
- La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à 10^6 unités formant colonie par millilitre (ufc /mL).

➤ **Mise en test**

- L'inoculum préparé précédemment est ensemencé par inondation sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton
- A l'aide d'une pince stérile, on prélève un disque de cellulose (disque de référence (diamètre : 6 mm) et l'imbiber avec l'HE jusqu'à l'imprégnation totale du disque (5 uL),
- Ces disques sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose.
- Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1 h à la température ambiante pour une prédiffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h.
- L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque.
- L'expérience est répétée trois fois pour chaque HE et pour chaque espèce bactérienne.

➤ **Lecture**

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des H.E (Ponce et *al.*, 2003).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre supérieure à 20 mm.

II.6 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilutions en milieu solide.

Pour choisir des huiles essentielles comme agents de conservation alimentaires, il convient de connaître leur seuil d'efficacité (c'est à dire la plus faible concentration en huile capable d'inhiber toute croissance bactérienne), car selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même (Caillet et Lacroix, 2007).

La CMI est déterminée par la méthode de dilution en milieu solide pour les souches microbiennes présentant une sensibilité accrue vis-à-vis de nos huiles essentielles.

Le protocole de base utilisé dans notre expérimentation est celui rapporté par Billerbeck (2003) in Boubrit et Boussad (2007).

➤ **Préparation de la gamme de dilutions**

Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 %. Elle permet d'obtenir, dans le milieu, une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé. Des dilutions de demi en demi ont été effectuées.

Les boîtes de Pétri sont remplies à moitié par le milieu M.H. et laissées solidifier sur la paillasse. Différentes concentrations d'HE sont incorporées en masse dans le milieu de culture en surfusion (45°C) avec les proportions suivantes : 1 mL de l'HE

diluée et 3 mL du milieu en surfusion, puis on agite convenablement les tubes à l'aide d'un agitateur avant de les verser sur la première couche.

Le tableau ci-dessous représente les valeurs des concentrations finales de l'huile essentielle dans le milieu.

Tableau 7: Valeurs des concentrations (μL d'HE /mL).

Concentration (%)	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78
Concentration ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078

➤ **Ensemencement en milieu solide**

Après solidification, on réalise un ensemencement en surface de 1 mL de suspension bactérienne de 10^6 UFC /mL. L'ensemble est incubé à une T° de 37°C pendant 24 h.

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en HE où on n'observe aucune croissance bactérienne.

Les différentes étapes et analyses de notre travail sont résumées dans le schéma suivant :

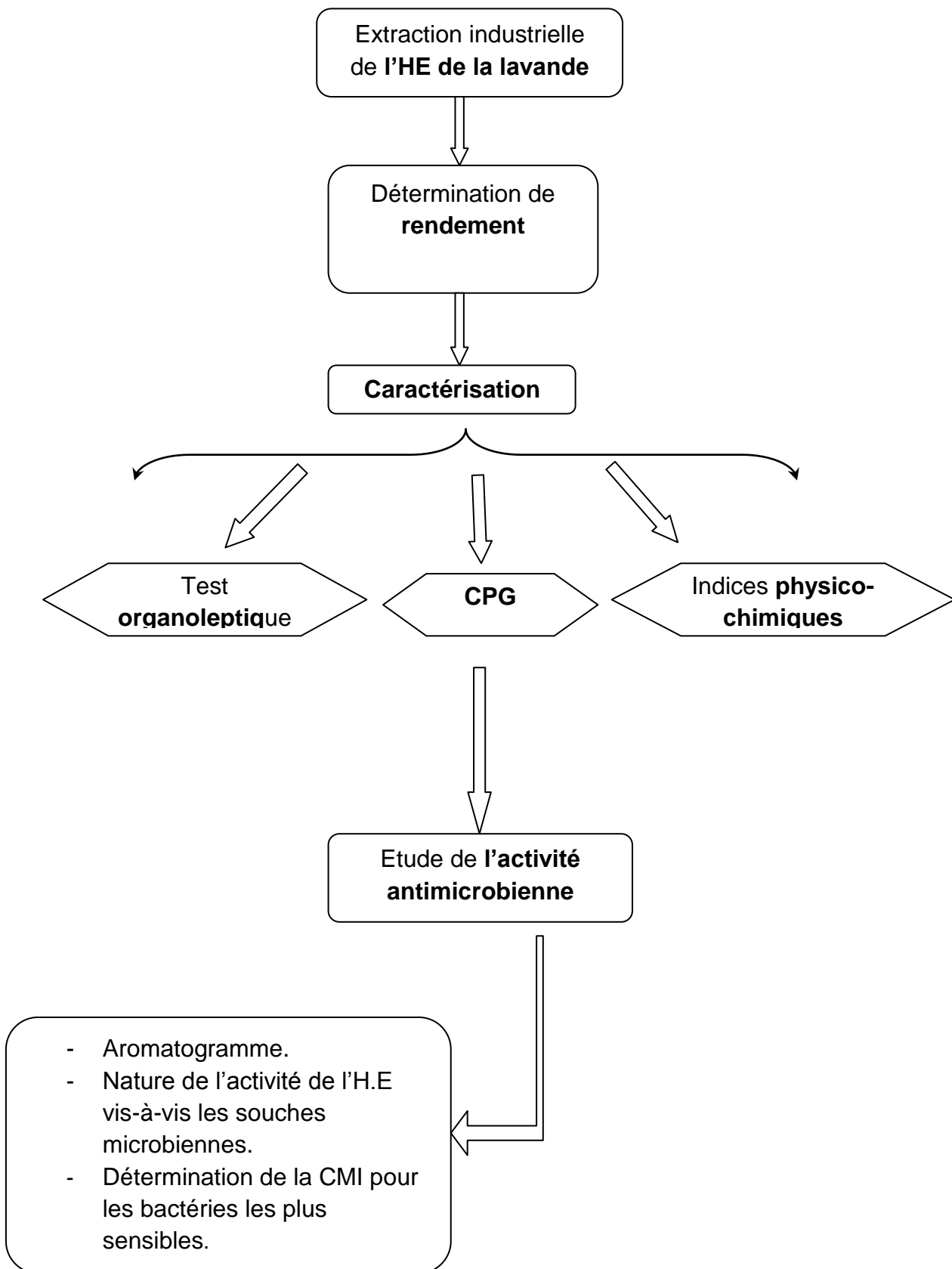


Figure II.3 : Schéma récapitulatif représente la procédure expérimentale

I. Historique

Les plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ième} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Les huiles essentielles sont des substances odorantes concentrées, obtenues à partir de plantes par entraînement à la vapeur d'eau, hydro distillation ou expression (pression à froid). Le terme " huile essentielle " a été inventé au 16^{ième} siècle par le médecin suisse Parascelsus Von Hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel (Anonyme, 2006).

On trouve des inscriptions datant de 4000 ans en Mésopotamie et des écrits égyptiens datant de 3500 ans. Les Égyptiens obtenaient des huiles essentielles en pressant des plantes. Les Romains utilisaient également les huiles essentielles. Mais la grande épopée des huiles essentielles débute au 15^{ième} siècle jusqu'en 1935, date à laquelle elle fut reléguée en arrière-plan avec la découverte de la pénicilline...

En 1937, le chimiste français René-Maurice Gattefossé publia ses découvertes dans son livre intitulé "Aromathérapie". Il est considéré comme le père de l'aromathérapie moderne (Zhiri et Baudou, 2005).

Durant la guerre de 1939-45, le Dr. Jean Valnet guérissait les blessures de guerre en utilisant des huiles essentielles. Les notions curatives des huiles essentielles furent vulgarisées par son premier livre : "L'aromathérapie, traitement des maladies par les essences des plantes" (publié en 1964).

En 1937, le chimiste français René-Maurice Gattefossé publia ses découvertes dans son livre intitulé "Aromathérapie". Il est considéré comme le père de l'aromathérapie moderne (Zhiri et Baudoux, 2005).

II. Définition

Une huile essentielle est un liquide concentré en substances végétales, obtenu par extraction ou distillation de molécules volatiles de la plante d'origine. On retrouve majoritairement des terpénoïdes et des molécules aromatiques. Les huiles essentielles issues de différentes plantes possèdent donc des propriétés différentes, dépendantes de la composition d'origine.

La plante aromatique contient suffisamment de molécules aromatiques avec plusieurs producteurs comme les feuilles, les fruits, l'écorce, les racines ...

L'essence est une substance aromatique naturelle que la plante secrète dans ses organes producteurs. L'essence est directement extraite par l'expression.

L'huile essentielle est le résultat de la distillation à la vapeur d'eau des arbres ou la plante aromatique pour en extraire l'essence. l'huile essentielle c'est de l'essence distillé pourtant l'huile essentielle et l'essence sont deux substances différentes (Belouad A, 2001).

Le terme «huile » provient du fait que les substances volatiles sont visqueuses et hydrophobes et qu'elles ont la propriété de se solubiliser dans l'alcool et l'huile grasse mais pas dans l'eau. La dénomination « essentielles » reflète le caractère principale des plantes à dégager des odeurs agréables (Marinier et Lobstein,2013).

D'après BERUNETON (1999), les huiles essentielles sont des composée organiques d'un caractère huileux ; qui contient des terpènes et des sesquiterpènes et d'autres composants. Elles possèdent une action unique comme elles peuvent avoir de multiples fonctions : **antifongique, antidiurétique**, tonique ...etc.

Et ceci du fait de ses éléments chimiques variés. Elles possèdent cependant une indication majeure due à l'importance éminente d'un principe actif.

III. Composition chimique

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables. Connaître avec exactitude les constituants d'une huile essentielle est fondamental, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés et prévoir sa toxicité potentielle.

Une huile essentielle renferme majoritairement des terpènes volatils, issus de la condensation d'unités **isopréniques**, et des dérivés aromatiques dérivés du phénylpropane (Couic-marinier, 2013).

III.1 Composés terpéniques

Seuls les monoterpènes en C₁₀ et les sesquiterpènes en C₁₅ peuvent être extraits par distillation, les autres terpènes (diterpènes en C₂₀ et triterpènes en C₃₀) n'étant pas entraînés par la vapeur d'eau (Couic-marinier, 2013).

III.1.1 Les monoterpènes

Les monoterpènes (figure 1) sont surtout présents chez les conifères. Composés anti-infectieux (bactéricides virucides et fongicides), qui doivent être utilisés parallèlement aux phénols, selon les cas, lors d'infections, ce sont également d'excellents immuno-stimulants. Ils ont une action révulsive sur la peau et sont utiles en cas de douleurs localisées : ce sont de bons antalgiques à action percutanée (Couic-marinier, 2013).

III.1.2 Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes (figure 2), sont légèrement **hypotenseurs**, calmants et anti-inflammatoires. Les **azulènes** confèrent aux HE qui les renferment une couleur bleu sombre (HE de **matricaire**). Ils peuvent être **dermocaustiques et néphrotoxiques** (Couic-marinier, 2013).

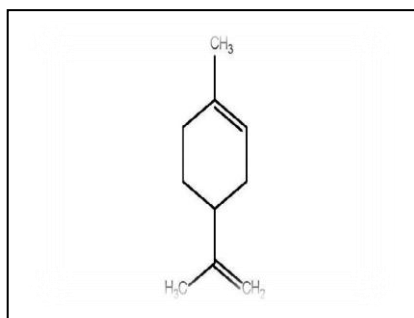


Figure 1: Monoterpène

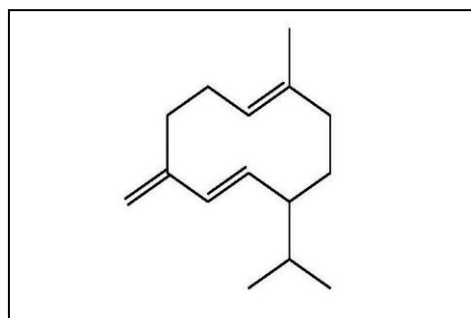


Figure 2 : Sesquiterpène

III.3 Les composés aromatiques

Dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes. Citons l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), l'anéthol et l'aldéhyde (HE de badiane, d'anis, de fenouil).

Les lactones dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines, sont, pour la plupart, entraîna­bles par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines huiles essentielles (ex. HE de céleri) (Couic-mar­inier, 2013).

IV. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération est des plus difficiles et des plus délicates puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité.

IV.1 La distillation à la vapeur d'eau

Cette méthode est le procédé le plus couramment employé. Elle s'effectue à l'aide d'un appareil appelé « Alambic » (figure 3). Celui-ci est constitué :

- d'une chaudière (2) ;
- d'un vase ou chaudron en cuivre dans lequel sont placés les végétaux à distiller (3), isolés du fond du vase par un plateau grillagé. Ce vase possède une évacuation inférieure (4) pour vidanger l'eau de condensation.
- d'un chapiteau qui coiffe le vase. Il est prolongé par un col de cygne (5).
- d'un serpent­in de refroidissement (6) plongé dans une cuve d'eau froide. Cette cuve possède trois ouvertures : une pour l'arrivée d'eau froide (8), une pour l'évacuation de l'eau chaude (7) et une pour accéder au vase florentin (9).
- d'un vase florentin ou essencier (9), chargé de recueillir l'HE. Celle-ci, moins dense que l'eau, flotte à la surface de l'eau de distillation. Le fond du chaudron est rempli d'eau. Les parties de la plante à distiller sont déposées, sans être tassées, dans le chaudron sur le plateau grillagé. Le chapiteau avec col de cygne est posé sur le chaudron. Le feu est allumé (1). La vapeur, qui se forme peu à peu sous l'effet de l'eau bouillante, traverse la matière avant d'être entraînée dans le col de cygne, puis dans le serpent­in. Cette vapeur, imprégnée des essences végétales, refroidit par étapes, passant progressivement de 100°C, à la température ambiante. C'est donc de l'eau mêlée d'huile essentielle qui s'échappe au bas du serpent­in. L'huile essentielle est plus légère que l'eau florale donc elle surnage au dessus de l'eau florale. Le rendement de ce procédé est très variable selon les plantes. Il faut par

exemple quatre tonnes de pétales de rose pour obtenir 1 kilo de cette huile essentielle, une des plus chères (Peyron, 1992, Garnero, 1996).

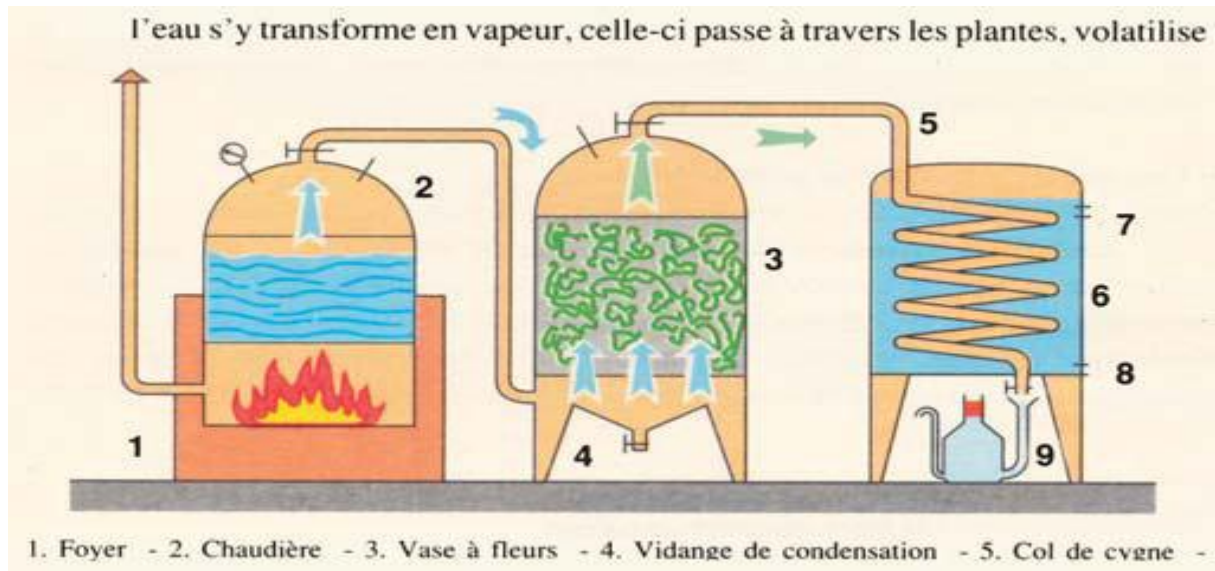


Figure 3. Principe de l'alambic pour distiller les huiles essentielles (Smadja, 2009).

IV.2 L'expression à froid

L'expression ou la pression à froid est réservée aux écorces des agrumes par écrasement en pressant les zestes on obtient une émulsion d'eau et d'HE qui doit ensuite être centrifugée et filtrée.

Exemples : le citron (*Citrus limonum*), la mandarine (*Citrus reticulata*), l'orange douce (*Citrus Sinensis*), l'orange amère (*Citrus Aurantium*), le pamplemousse (*Citrus paradisi*)... On emploie alors l'appellation essence (Baudry et al., 2004).

IV.3 L'extraction par solvants

Cette méthode est utilisée pour les plantes fragiles qui sont plongées dans une préparation chimique provoquant la dissolution des substances aromatiques. Après séparation du solvant par distillation, on obtient un produit cireux qui doit être dissout avec de l'alcool. Ce dernier est ensuite éliminé par évaporation. L'HE ainsi obtenue est dite « absolue » (Baudry et al, 2004). Comme il est difficile d'éliminer complètement les traces de solvants, on utilise que très exceptionnellement ces HE en médecine (Endrias, 2006).

IV.4 L'extraction par hydrodiffusion

Cette méthode (figure 4), diffère de la distillation à la vapeur seulement par le fait que la vapeur entre dans l'alambic par le haut, donc au-dessus des plantes, et non par dessous. La percolation convient parfaitement aux bois ou aux matériaux fibreux, car la vapeur peut s'y infiltrer (Yahiaoui,(2005).

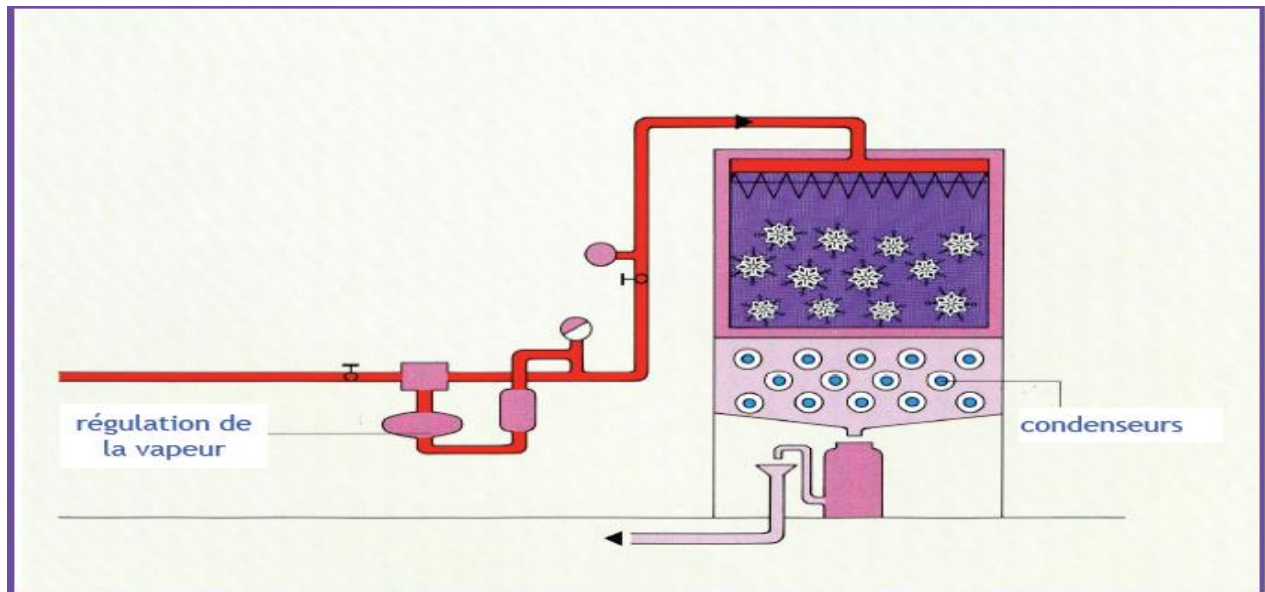


Figure 4 : Extraction par hydrodiffusion (Smadja, 2009).

IV.5 Extraction par micro ondes

Les micro-ondes agissent sur certaines molécules, telles que l'eau qui absorbe l'onde, et convertissent son énergie en chaleur.

Contrairement au chauffage classique par conduction ou convection le dégagement de chaleur a lieu dans la masse, ainsi dans une plante les micro-ondes sont absorbées par les parties les plus riches en eau puis converties en chaleur, il en résulte une soudaine augmentation de la température à l'intérieur du matériel jusqu'à ce que la pression interne dépasse la capacité d'expansion des parois cellulaires, la vapeur détruit la structure des cellules végétales et les substances situées à l'intérieur des cellules peuvent alors s'écouler librement à l'extérieur des cellules peuvent alors s'écouler librement à l'extérieur du tissu biologique et l'huile essentielle est entraînée par la vapeur d'eau (Anizon et al, 2003).

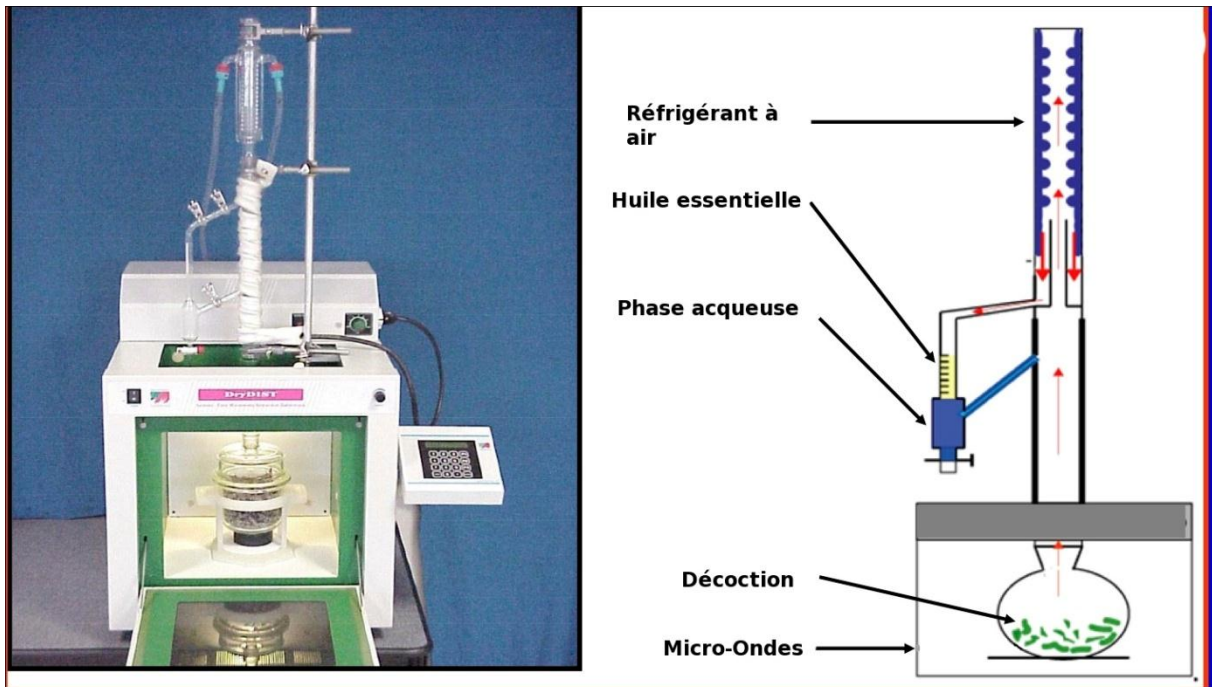


Figure 5 : Extraction par micro-ondes (Smadja, 2009).

IV.6 Extraction au CO₂ supercritique

D'après Bruneton (1995), l'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé : il s'agit du CO₂ en phase **supercritique**. À l'état supercritique, le CO₂ 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 CO₂ sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux. Les avantages de ce procédé sont les suivants :

- le CO₂ est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et peu coûteux,
- on utilise des basses températures pour sa 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 CO₂ 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 CO₂ est continuellement recyclé).

V. Caractéristique physico-chimique et organoleptique des huiles essentielles.

V.1 Caractéristiques physico-chimique des huiles essentielles :

Les caractères physico-chimiques sont les critères de qualité des huiles essentielles visibles avec des analyses simples, les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante, et volatiles ce qui les différencie des huiles dites fixes (Bruneton. J, 1999).

1- La densité : en générale inférieur à celle de l'eau sauf exceptions (huiles essentielles de cannelle, girofle en particulier).

2- La solubilité : les huiles essentielles sont solubles dans les solvants organiques usuels, peu soluble dans l'eau.

3- L'indice de réfraction : l'indice de réfraction est utilisé pour l'identification et comme critère de pureté des huiles essentielles et de composés liquides divers. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande.

4- Un pouvoir rotatoire : On peut mesurer le pouvoir rotatoire avec un polarimètre appareil de mesure de la polarisation (Propriété des ondes électromagnétiques) d'un corps.

5- L'indice d'acide : c'est le nombre en milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres dans un gramme d'huile essentielle.

6- L'indice d'ester : c'est le nombre en milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle.

V.2 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques communes comme le fait d'être liquides à température ambiante, d'être volatiles et entraînés à la vapeur d'eau :

1- La couleur : elle varie avec le vieillissement et l'oxydation, allons souvent dans le sens d'un brunissement.

2- L'odeur : est caractéristique à chaque huile essentielle.

3- La saveur : constitue également un bon indicateur ; généralement les huiles essentielles de mauvaise qualité ont un goût désagréable qui s'amplifie avec le vieillissement.

V.I La conservation des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des produits Très volatiles par nature, et peuvent rapidement perdre leurs propriétés. Très vite, elles commencent à vieillir, généralement au bout de 6 mois. Au mieux, elles peuvent conserver leurs propriétés thérapeutiques pendant environ trois ans (Kinesther, 2007).

Pour cela, la conservation de l'huile essentielle est un point essentiel à prendre en compte pour garantir l'entière qualité du produit. Elle ne doit pas être exposée aux rayons UV ou à de fortes températures pour éviter son oxydation, c'est pourquoi les huiles essentielles sont commercialisées dans des flacons en verre teinté qui permet de filtrer la plupart des rayons UV.

Il est aussi important de vérifier que l'huile essentielle n'est pas en contact avec une partie plastique du flacon car elle a un fort pouvoir corrosif, risquant de ronger le plastique. Comme le flacon doit être totalement hermétique pour éviter toute évaporation ou la transformation de l'huile essentielle en résine (Rombi, 1991)



Figure 6 : Les flacons contenant des huiles essentielles sont en verre teinté.

VII. Domaines d'application des huiles essentielles :

Les huiles essentielles peuvent avoir d'intéressantes applications dans différents secteurs :

VII.1 En pharmacie :

L'importance des plantes est indiscutable. Leur contenu en essence et la nature chimique des constituants de celle-ci leur confèrent de grandes perspectives d'application, ces substances sont d'un grand intérêt dans le domaine médical et pharmaceutique (Beckechi et Abdelouahid, 2010).

L'emploi des huiles essentielles en thérapeutique est en relation avec leur propriétés pharmaceutique divers et souvent marquées (Paris et Moyse, 1976).

Les huiles essentielles ont un champ d'action très large, elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des levures et des moisissures. L'effet biologique à souvent été supérieur à celui de plusieurs fongicides du commerce. En effet, les huiles essentielles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques de désinfection.

Les perspectives d'application peuvent s'étendre à d'autres domaines comme, par ex : la stomatologie, le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité buccale, les soins dentaires ou simplement pour L'hygiène dentaire sous forme de pâte à mâcher (Beckechi et Abdelouahid, 2010).

VII.2 En cosmétologie :

L'industrie des cosmétiques et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le cout souvent élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier, pour les formulations de grande diffusion, les produits synthétiques (Bruneton, 1999).

Puisque la majorité des cosmétiques contiennent une certaine quantité d'huile essentielle comme élément parfumant, il serait probable que ces essences servent aussi à préserver ces cosmétiques tout en leur assurant une odeur agréable. (Beckechi et Abdouahid, 2010).

A la limite de la pharmacie et des produits d'hygiène, on notera la présence d'huiles essentielles dans les préparations pour bains (bains « calmants » ou « relaxants »).

On notera qu'il y a une possibilité d'absorption percutanée des constituants terpéniques (Bruneton, 1999).

VII.3 Dans l'industrie agro-alimentaire :

L'activité antimicrobienne des extraits des plantes utilisées dans l'assaisonnement des aliments a été reconnue depuis longtemps c'est pour cela, que l'on pense de plus à les utiliser dans la conservation des denrées alimentaires, sans pour autant en dénaturer le goût puisque ces aromates entrent dans la composition des préparations alimentaires. C'est ainsi que Bekhchi et Abdelouahid (2010) et Busta et Foegeding (1983), ont eux aussi étudié la conservation alimentaire par les épices, les aromates et les huiles essentielles qui sont rajoutés aux aliments pour rehausser le goût ainsi qu'un effet antimicrobien empêchant les contaminants alimentaires de se développer.

Plusieurs huiles essentielles, ont en laboratoire, une activité antimicrobienne avérée. Mais avant leur adoption en tant qu'agent de conservation alimentaire, il convient de vérifier les résultats expérimentaux dans l'aliment sélectionné. En général, les résultats expérimentaux obtenus en milieu modèle se confirment sur les aliments, mais avec des concentrations d'huiles essentielles un peu plus élevées. Les études faites à travers le monde, montrent que les huiles essentielles peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments. Ainsi, les huiles essentielles d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes; l'huile essentielle de menthe pour les produits frais (salades, yaourts...); les huiles essentielles à base de carvacrol ou de citral pour les poissons; les huiles essentielles de thym, de noix de muscade ou de gingembre pour les céréales (plus particulièrement celles riches en carvacrol pour le riz); et les huiles essentielles à base de carvacrol ou de cinnamaldéhyde pour les fruits.

Toutefois, quelques limites existent à l'utilisation des huiles essentielles comme agents de conservation dans les aliments, notamment le pouvoir aromatisant de certaines d'entre elles. Cependant des techniques de désaromatisation existent et sont de plus en plus efficaces. D'autre part, les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'huile essentielle selon le type d'aliment considéré, mais il est important de noter, que dans la plupart des cas, les

concentrations d'huiles utilisées sont si faibles, qu'elles ne modifient pas les qualités organoleptiques de l'aliment.

Un autre aspect à prendre en compte, c'est de vérifier que l'huile essentielle sélectionnée n'a pas d'effet antimicrobien contre les bactéries utiles, notamment les ferments d'acidification, d'aromatisation et d'affinage, indispensables à la fabrication des produits. Moyennant ces précautions d'usage, l'emploi des huiles essentielles lors de la transformation des aliments peut présenter un triple intérêt: aromatisant, antioxydant et antimicrobien.

VII.4 Dans divers industries :

Ils sont utilisés surtout dans les industries chimiques, qui utilisent encore, à côté de produits de synthèse, des isolats (substances pures isolées des huiles essentielles) ces molécules constituent des matières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes, etc. Ex : utilisation du safrole (extrait d'ocotea brésiliens ou d'espèces de cinnamomun, de chine) pour la synthèse de l'héliotropine utilisée en parfumerie ou celle du butoxyde de pipéronyle, un synergiste des pyréthrinoides (Bruneton, 1999).

II.1 Généralité

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les huiles essentielles et leurs composants, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" ou approuvés comme additifs alimentaires. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais cependant des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne. (Cosentino ., Tuberoso et *al.*, 1999)

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycelium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Billerbeck., 2000)

II.2 Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries, mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases : (Zaika , 1998) .

- 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.

II.2.1 Effet de la composition chimique des huiles essentielles sur l'activité antimicrobienne

Les huiles essentielles sont extraites soit des feuilles, des graines, des écorces, des racines ou d'autres structures spécialisées. Une huile essentielle est un mélange complexe de plusieurs composés d'arômes volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : phénols (ex : carvacrol), hydrocarbures (composés terpéniques comme le limonène), alcools (ex : linalool), aldéhydes (ex : cinnamaldéhyde), cétone (ex : menthone), esters (ex : acétate de linalyle) et éthers. La plupart de ces composés est dotée de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes (voir tableau 1) : carvacrol (origan, sarriette), eugénol (feuille de cannelle de Ceylan, clou de girofle), linalool (coriandre), cinnamaldéhyde (cannelle de Chine), thymol (thym).

La composition des huiles essentielles d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée... Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également. Il est donc important de sélectionner une huile essentielle standardisée dont les composants actifs sont clairement identifiés et quantifiés. (Oussalah et *al*, 2007).

II.2.2 Effet d'autres facteurs sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

D'autres facteurs influencent les propriétés antimicrobiennes des huiles. Selon les aliments, certains facteurs comme la température, les conditions de stockage, le pH ou la composition de l'aliment, peuvent avoir une influence sur l'action des huiles. Il est établi que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage ou encore de la quantité d'oxygène dans l'emballage. Cela est d'autant plus intéressant que les quantités d'huiles nécessaires pour le contrôle de la croissance bactérienne dans les aliments conservés à basse température pourraient être réduites. Il est également prouvé qu'une même huile sera plus efficace dans un aliment pauvre en gras et/ou en protéines. Les fortes teneurs en eau et en sels d'un aliment vont aussi favoriser l'action de l'huile

essentielle, alors qu'une structure gélatineuse va au contraire la limiter (Leyral et Vierling, 2007).

II.3 Nature de l'activité antimicrobienne (Bactéricide et bactériostatique)

À la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des H.E. sur les microorganismes: une activité létale (bactéricide et fongicide) (Carson, 1995) et une inhibition de la croissance (bactériostatique) (Freeman et Careemal, 2012).

Au cours d'un travail au laboratoire, Dorman et Deans (2000) ont démontré que l'activité bactéricide des H.E. vis-à-vis des cellules bactériennes pourrait être expliquée par une dénaturation des protéines provoquée par le rôle solvant et déshydratant des huiles.

Une étude réalisée par Fleurentin et ses collaborateurs (1990) pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) pour 4 variétés de Thym (*Thymus vulgaris*) portant sur 14 souches bactériennes (dont *Staphylococcus aureus*) ont montré que dans la majorité des cas, les valeurs des CMI sont identiques aux CMB. Les mêmes auteurs ont conclu que les H.E. testées dans cette étude sont bactéricides.

D'autre part, certaines études ont été réalisées par Vaubourdolle, 2007 dans le but d'illustrer les dommages provoqués par certaines H.E. sur des cibles bactériennes à travers des images de haute résolution en utilisant la microscopie électronique.

II.4 Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne

La technique utilisée pour déterminer le pouvoir antimicrobien des HE 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. A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *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. (Sherwood et al., 2010).

II.4.1 Technique en milieu solide (Méthode de la diffusion en disque)

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai.

Généralement, plus la zone est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible.

La mesure manuelle des zones d'inhibition peut prendre du temps. Les dispositifs automatisés avec zone de lecture sont disponibles et peuvent être intégrés avec le rapport de laboratoire et les systèmes de manipulation de données. Les disques devraient être distribués également de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens dans l'essai de diffusion en disque ne se chevauchent pas et qu'ainsi la zone d'inhibition puisse être déterminée. Généralement cela peut être effectué si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque et de la capacité de l'antimicrobien à diffuser dans la gélose. (Vaubourdolle, 2007).

II.4.2 Technique en milieu liquide (méthode de dilution)

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg /mL ou mg /L). Cependant, la CMI ne représente pas toujours une valeur absolue. La « véritable » CMI est un point entre la plus basse concentration qui empêche la croissance de la bactérie et la concentration inférieure immédiate (Sherwood et *al.*, 2010).

II.4.3 La dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 mL (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution). L'utilisation de ces plaques avec un

protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses. (Sherwood et *al.*, 2010).

II.4.4 La dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte. (Dorman et Deans, 2000).

III.1. Présentation et description

La lavande vraie (*Lavandula vera* ou *angustifolia* ou *officinalis*) fait partie des Labiées. Elle croît en Europe méditerranéenne, sur des terrains calcaires, de 700 m jusqu'à 1800 m d'altitude. Ses feuilles sont longues, étroites et blanchâtres (fig1), toute la plante a une odeur aromatique très agréable.



Figure 8: Feuilles de *Lavandula angustifolia*

L'étymologie de lavande viendrait de « lavare » qui signifie « laver » d'où le nom de lavandières de nos campagnes et la tradition de la lavande dans le linge. En Europe, la lavande a été cultivée pour son huile essentielle dès le XVI^{ème} siècle. La lavande vraie est inscrite dans la liste des tisanes à la Pharmacopée française (X^{ème} édition).

La grande lavande dite spic ou aspic (Fig 7) (*Lavandula spica* ou *latifolia*), qui croît également sur terrains calcaires, ne se développe pas au-dessus de 800 m d'altitude. Elle est plus grande, à odeur camphrée. Les hybrides de lavande aspic et de la lavande vraie donnent les lavandins, cultivés pour leur forte teneur en huile essentielle.



Figure 7: *Lavandula angustifolia* ou *officinalis*

Il existe une autre espèce qui croît sur terrains siliceux à basse altitude : la lavande stoechade (*Lavandula stoechas*), stoechas d'Arabie ou lavande des îles d'Hyères (appelées par les Anciens « Isles Stécades »), aux fleurs pourpres, à l'odeur entêtante.

La lavande stoechade et la lavande aspic sont surtout provençales, mais se trouvent également en Algérie. Elles fleurissent 1 mois après la lavande vraie. La lavande stoechade se caractérise par une forte teneur en oxyde (1,8 cinéole).

III.2. Origine de la lavande

La lavande est une plante spontanée dans les régions méditerranéennes, sur les coteaux ensoleillés et les montagnes jusqu'à 1800 m d'altitude, la lavande fleurit en juillet-août. A l'état sauvage, il en existe plus d'une centaine de variétés et de chémotypes différents. (Fig9)



Figure 9: Territoire de la lavande (Botineau, 2010).

III.3 Composition chimique d'huile essentielle de lavande

Selon Mastelic et Kustrak (1997) ; Lawrence (1996) ; Ferreres et *al.* (1986), les constituants chimiques potentiellement actifs de genre *Lavandula* sont :

- Monoterpènes : alpha-pinène, beta-pinène, beta-ocimène, camphène, camphre, limonène, p-cymène, sabinène, terpinène.
- Alcools de monoterpène : alpha-terpinéol, bornéol, lavandulol, linalol, p-cymen-8-ol, transpivocarveol.
- Aldéhydes de monoterpène : aldéhyde de cumin.
- Ethers de monoterpène : 1,8-cineole (eucaluptol)
- Esters de monoterpènes : acétate linalylique, acétate terpénylique.
- Cétones de monoterpène : carvone, coumarine, cryptone, fenchone, methylheptenone, n-octanone, nopinine, p-methylacetophenone.
- Benzenoids : eugénol, coumarine, cavacrol, acide hydroxycinnamique, acide rosmarinique, thymol.
- Sequiterpènes : caryophyllène, oxyde de caryophyllène, alpha-photosantanol-photosantanol, alphanorsantalénone, alpha santalal.

III.4. domaine d'application d'huile essentielle de lavande

Elle est calmante, utile contre les insomnies, l'anxiété et les maux de tête. Elle est aussi cicatrisante pour les plaies, les brûlures, les piqûres d'insectes et bénéfiques pour les problèmes de peau en général, acné et dermatoses.

Elle est aussi utiliser pour :

- contre les problèmes de peau (brûlures, piqûres d'insectes, boutons...) mettre 3 gouttes sur un coton et appliquer directement sur la plaie, laisser le coton 5 à 10 minutes.
- contre l'anxiété, les insomnies : mettre 1 à 2 gouttes d'huile essentielle sur votre oreiller et sur un mouchoir que vous respirerez dans la journée.
- contre la migraine et les maux de tête : dans 50 mL d'huile végétale, ajouter 10 gouttes de lavande et 2 gouttes de menthe et frictionner vous les tempes le front, la nuque avec quelques gouttes de ce mélange, 2 à 3 fois par jour.
- contre les otites : 2 gouttes de lavande + 2 gouttes d'eucalyptus radié + 2 gouttes de niaouli dans 2 cuillères à soupe d'huile végétale et masser autour de l'oreille.
- pour les soins des bébés et des jeunes enfants :
- contre les coliques: 1 goutte dans une cuillère à soupe d'huile végétale en massage sur le ventre. pour l'aider à s'endormir: 1 goutte dans une cuillère à soupe de base neutre pour bain moussant.

II.1 Rendement en huile essentielle

Nous avons procédé à une extraction à une échelle industrielle de l'huile essentielle de la lavande durant 1h, le rendement est exprimé en pour cent dans le tableau 4.

Tableau 4: Le rendement (%) en H.E. de la plante utilisée

Méthode d'extraction	Entrainement à la vapeur
Durée d'extraction	1 heure
Rendement (%)	0,44

D'après le tableau on constate qu'après l'extraction de la partie aérienne de *Lavandula officinalis* par l'entraînement à la vapeur à l'échelle industrielle notre espèce a donné un rendement de 0,44 %.

Selon Bendimerad et *al.* (2005) ; pour optimiser le rendement en HE, beaucoup d'études ont été réalisées sur des parties végétales fraîches et la concentration en eau du matériel végétal a été prise comme facteur de variation. Les résultats obtenus ont démontré que les rendements en huile essentielle sont très inférieurs chez les parties végétales fraîches. Ceci pourrait être expliqué par la grande proportion d'eau présente dans le végétal

D'après les résultats cités dans la littérature scientifique, il est bien évident que notre espèce renferme un moyen rendement en HE. Le résultat obtenu est presque similaire aux travaux de Porto et *al.* (2009) qui ont extraite l'HE à partir des fleurs de la lavande cueille de nord-est d'Italie par l'utilisation de procédé de l'hydrodistillation et ils ont estimé un rendement de 0,5 %.

En revanche Saadatian et *al.* (2013) ont démontré 0,3 %, alors que, Djenane et *al.* (2012), ont observé des rendements allant de 0.15 à 0,21 % aussi par la distillation de la partie aérienne récoltée de la région de Tizi-Ouzou en Algérie. Et Costa et *al.* (2012), qui ont estimé un rendement de 0,53 %. Cette différence pourrait être expliquée selon Kelen et *al.* (2008), par le choix de la période de récolte car elle est primordiale en terme de rendement et qualité de l'HE, le climat, la zone géographique, la génétique, la méthode d'extraction employée, les produits et les réactifs, degré de séchage, la température et la durée de séchage

etc..Ce sont des facteurs en autres qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en HE.

II.2 Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de la lavande

L'huile essentielle de la partie aérienne de *Lavandula officinalis* obtenue par entrainement à la vapeur présente les caractères organoleptiques regroupés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des caractéristiques organoleptiques étudiées.

	Aspect	Odeur	Couleur
HE de <i>L. officinalis</i>	Liquide mobile	Fraiche, florale rappelant celle des sommités fleuries de la plante.	Jaune

Huile essentielle obtenue présente une odeur aromatique agréable. La couleur des HE varie d'une variété à une autre, et d'une matière à une autre.

II.3 Les indices physico-chimiques

Le tableau suivant résume les résultats des propriétés physiques et chimiques de l'HE de la lavande.

Tableau 6: Tableau récapitulatif des analyses physico-chimiques effectuées.

	Densité	Indice de réfraction	Indice d'acide
HE de <i>L. officinalis</i>	0.890	1.468	1.2

Les résultats obtenus sont conformes à ceux rapportés par l'association française de normalisation (AFNOR, 2000) et (la pharmacopée européenne, 2001).

II.4 Analyse de la composition chimique

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'H.E de «*Lavandula officinalis*» extraite par entrainement à la vapeur a permis d'identifier 14 composés chimiques cités dans le tableau 7 par ordre séparation.

Tableau 7 : Principaux composés chimiques de l'huile essentielle de '*Lavandula officinalis*' obtenus par CPG.

IR	Taux (%)	Composés
906	11,47	alpha-thyène
913	18,7	alpha-pinène
926	1,6	Limonène
964	40,8	Linalool
1005	1,6	acétate de 1-octène-3-yl
1027	3,6	Camphre
1039	1,2	Bornéol
1056	2,5	Lavandulol
1069	1,6	terpinène-4-ol
1085	2,4	terpinène-4-ol
1097	1,6	terpinène-4-ol
1108	1,9	acétate de linalyle
1139	1,3	acétate de lavandulyle
1308	3.5	béta-caryophyllène

Nous observons d'après les résultats recueillis dans le tableau ci-dessus que l'huile de lavande est caractérisée par un taux élevé de linalool qui a atteint un taux de 40,8 % représentant le composé majoritaire suivi de alpha-pinène et alpha-thyène qui représente respectivement 18,7 % et 11,47 %. Notons aussi la présence de camphre, lavandulol, terpinène-4-ol, acétate de linalyle avec des quantités peu appréciables, comme on remarque la présence de composés sesquiterpiniques comme le béta-caryophyllène qui représente une teneur de 3.5%.

D'après la figure qui représente le chromatogramme de l'analyse de l'HE de *Lavandula officinalis* on remarque la dominance des composés monoterpéniques.

Le chromatogramme de l'analyse est représenté dans la figure 13.

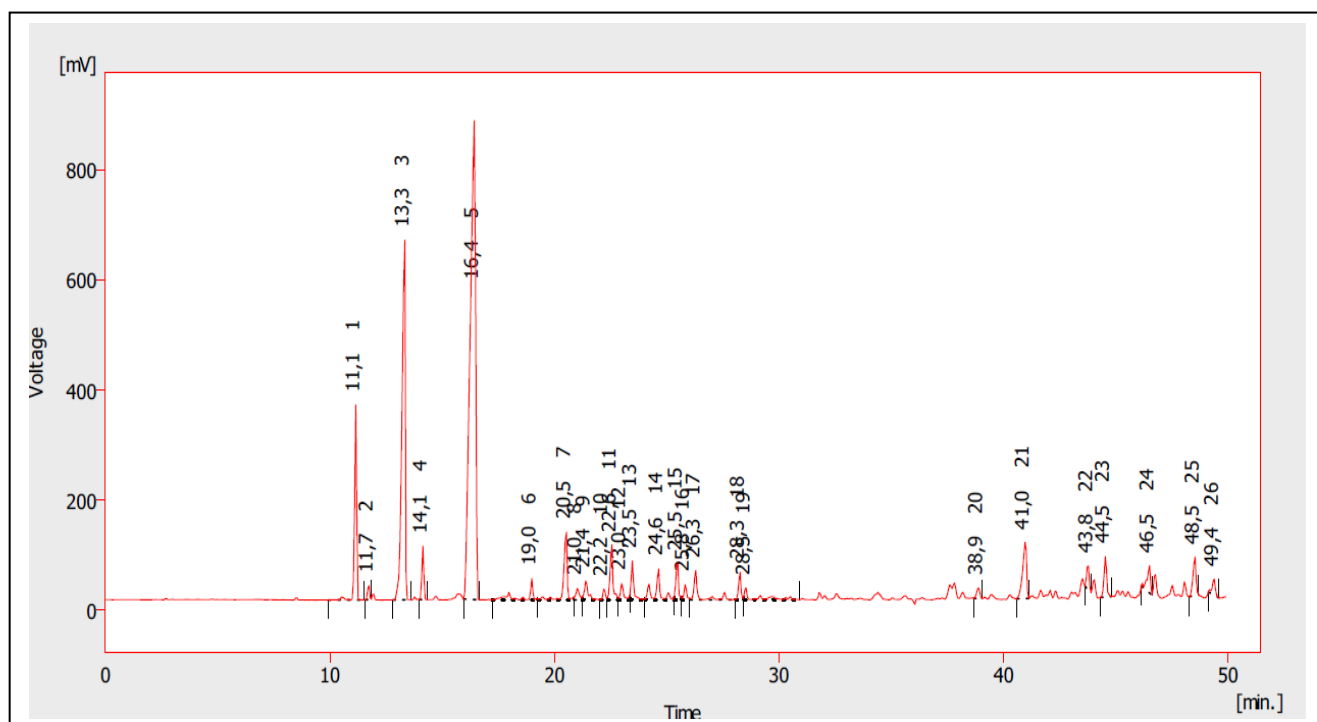


Figure 13 : Chromatogramme de l'HE de *Lavandula officinalis* obtenue par CPG/FID

Notre résultat est similaire de celui trouvé par Porto et *al.* (2009), où il a observé la présence des mêmes composés monoterpéniques mais avec des taux différents. En revanche, Yazdani et *al.* (2013) et Guyot-Declerch et *al.* (2002), ont signalé la dominance d'acétate de linalool et 1,8-cinéol.

Selon Senatore et *al.* (2000), les variations rencontrées dans la composition chimique des HE du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs : le patrimoine génétique, l'âge, l'environnement de la plante, et la présence de chimiotype.

II.5 Les résultats de l'activité antimicrobienne

II.5.1 Aromatogramme

Dans la recherche des méthodes alternatives de lutte antimicrobienne, le règne végétal offre beaucoup de possibilités. De nombreuses études se développent actuellement pour isoler et identifier les composés de la plantes qui ont une activité antimicrobienne, antioxydante, antifongique et insecticide (Bousbia, 2004).

La sensibilité des bactéries de notre huile essentielle est déterminée selon le diamètre de l'halo d'inhibition par la méthode de diffusion sur gélose.

Selon Ferhat et *al.*, (2010) les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne étaient rangés en 4 classes regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 8: Les différentes classes des diamètres des zones d'inhibition

Degré d'inhibition	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
Fortement inhibitrice	>28 mm
Modérément inhibitrice	compris entre 16 mm et 28 mm
Légèrement inhibitrice	compris entre 10 mm et 16 mm
Non inhibitrice	<10 mm

Les observations effectuées sur l'effet d'HE de la lavande sur la croissance des souches testées : *S.aureus*, *B.subtilis*, *E.coli*, *P. aeruginosa* et *C.albicans* ont représentées dans le tableau 9.

Tableau 9: Résultats des zones d'inhibition

La souche	Ø Zone d'inhibition (cm)	Degré d'inhibition
<i>S. aureus</i> (ATTC 25923)	1.4 ± 0.10	Modérément inhibitrice
<i>B. subtilis</i> (ATTC 6639)	2.2 ± 0.00	Modérément inhibitrice
<i>E. coli</i> (ATTC 25922)	1.1 ± 0.12	Légèrement inhibitrice
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 49616)	0.1 ± 0.00	Non inhibitrice
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	3.5 ± 0.00	Fortement inhibitrice

L'extrait de l'HE de *lavandula officinalis* a montré une activité antimicrobienne : Modérément inhibitrice vis-à-vis *Saureus* (1.4 ± 0.10 cm) et *B. subtilis* (2.2 ± 0.00 cm), légèrement inhibitrice envers *E. coli* (1.1 ± 0.12cm), non inhibitrice envers *P.aeroginusa* (0.1 ± 0.00 cm) et fortement inhibitrice vis-à-vis *C. albicans* (3.5 ± 0.00 cm).

La photographie suivante montre les diamètres d'inhibition de chaque souche.

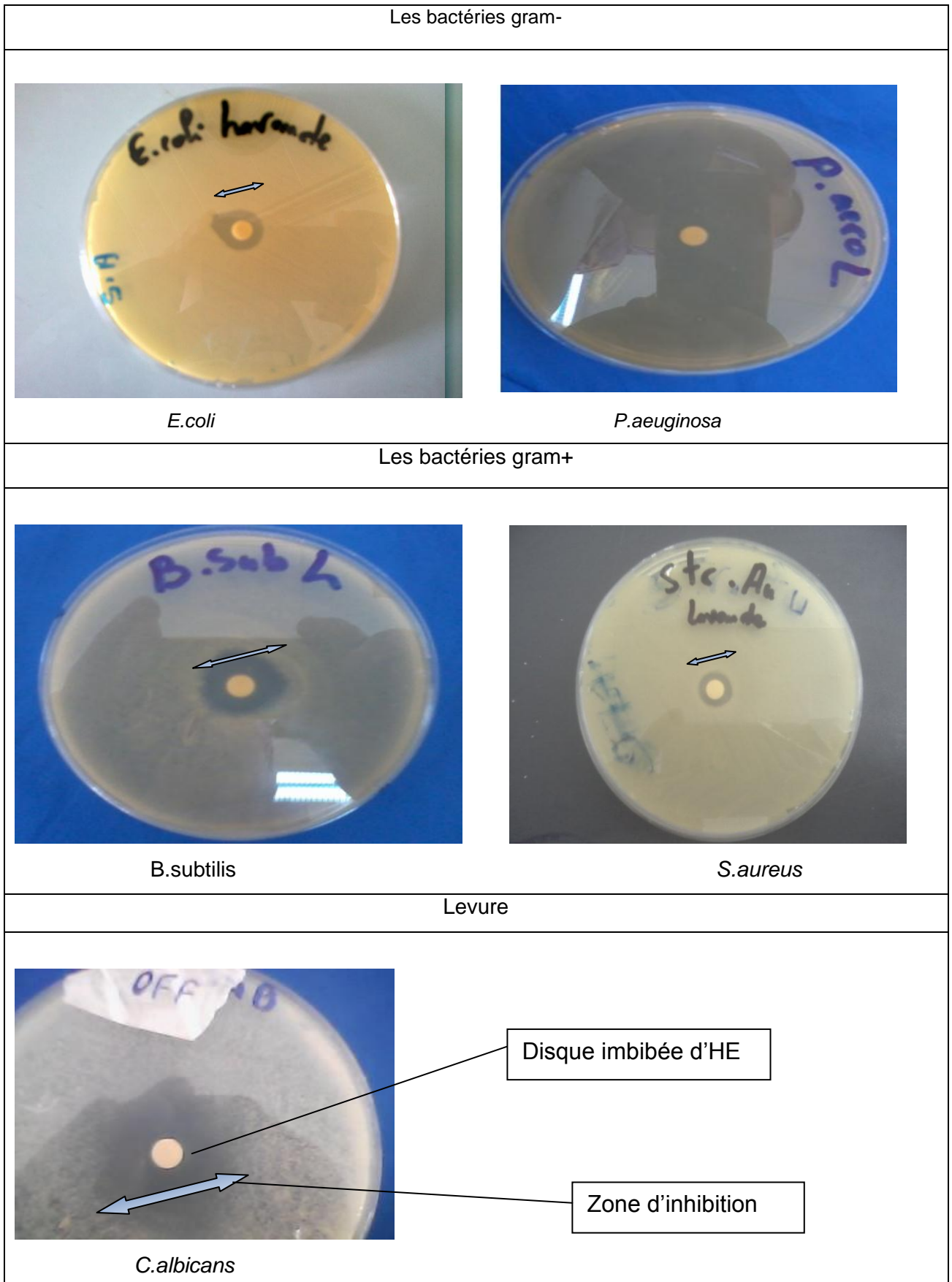


Figure 14 : Effet antimicrobien de l'HE de lavande

Les résultats de l'activité antimicrobienne montre que l'huile essentielle de la lavande est avérée de très bonne activité antifongique alors qu'une sensibilité modérée a faible ou nulle dans certains cas voire une inhibition forte dans le cas de *B. subtilis*.

La représentation suivante nous montre la sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis notre HE.

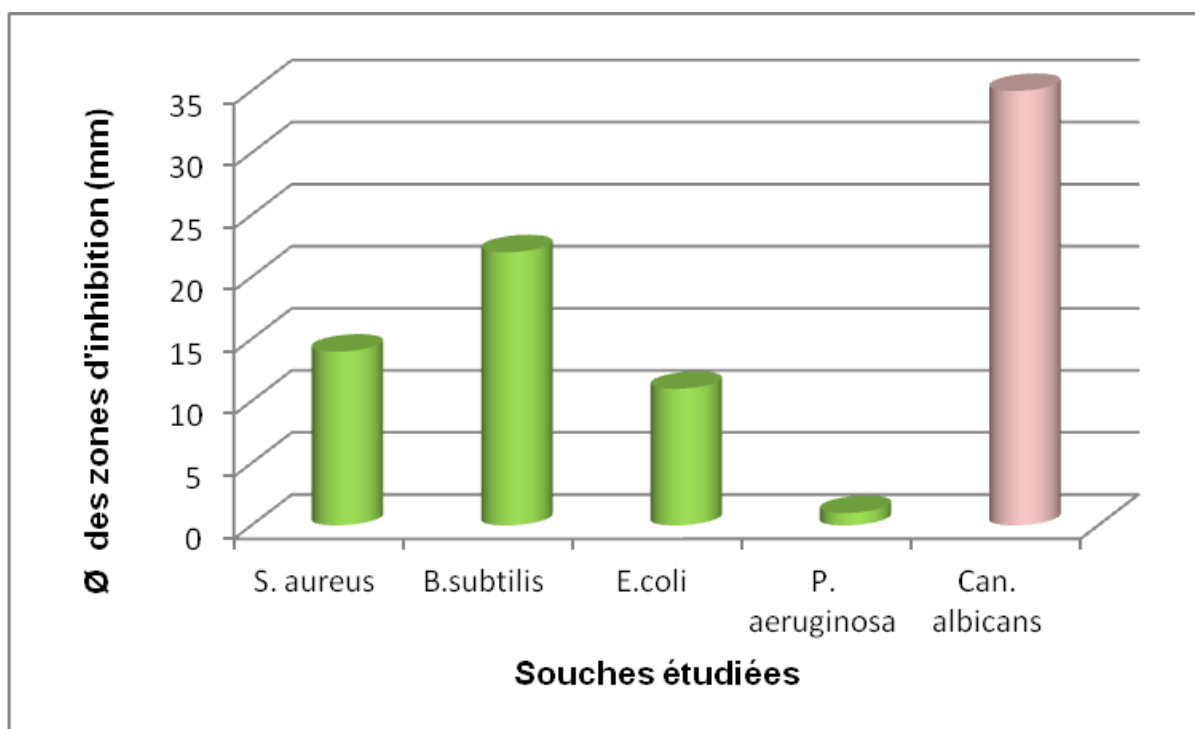


Figure 15 : représentation graphique de sensibilité des souches.

Les résultats obtenus lors de notre étude s'avèrent d'une façon générale en accord avec de nombreuses études rapportées dans la littérature.

Les huiles essentielles attaquent les cellules par divers mécanismes antimicrobiens, y compris la membrane ce qui perturbe les systèmes d'enzymes et puis le matériel génétique et la formation d'hydroperoxydase causée par l'oxygénation des acides gras insaturés.

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de plusieurs plantes aromatiques et médicinales ont été attribuées à leur profil chimique et surtout aux alcools terpéniques (Kurita et al., 1982., Bouchikhi, 1994., Tantaoui-Elarki et al., 1994., Faid et al., 1996; Chang et al., 2001, Karaman et al., 2001, Baydat et al., 2004, Pibiri, 2005, Satrani et al., 2006). Leur spectre d'action est très étendu, car

elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (Kalemba Etkunicka, 2003). Selon Dormans en 2000, le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne d'HE est le type et la structure moléculaire des composants actifs présents dans cette HE.

Selon Bouaoun et ses collaborateurs (2007), la plupart des composés chimiques des H.E. sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes.

Selon plusieurs études (Thomson et *al.*, 2003 ,Burt, 2004 , Zhiri et *al.*, 2005 , Viuda-Martos et *al.*, 2008), les interactions synergiques entre les différents composés peuvent être l'origine d'une activité beaucoup plus prononcée que celle prévisible pour les composés majoritaires.

Le type des bactéries aussi a une influence sur l'effet des huiles essentielles ou il était observé que les bactéries de gram – sont moins sensibles a l'action des huiles essentielles que les bactérie de gram+ ; La différence de cette sensibilité est due à la structure de leur membrane cellulaire ou les bactérie gram - sont composées de deux couches qui protègent la cellule et de fournir une rigidité, et les bactéries de gram positif n'ont pas la membrane externe qui peut être la raison pour laquelle elles seraient plus sensibles à l'action des composés des huiles essentielles. En effet, la membrane des bactéries de gram négatif rend leurs surface très hydrophobe tandis que les acides lipotéichoiques de la membrane cellulaire des bactéries de gram + peuvent faciliter la pénétration des composés hydrophobes (Mona et *al.*, 2013).

En raison des lipopolysaccharides présents dans la membrane externe, mais ce n'était pas toujours vrai (Oussalah et *al.*, 2007). Il semble que le mécanisme d'action de ces huiles est lié essentiellement à la structure de la paroi (Berche, 2003). Les mécanismes d'action des H.E. et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidés. Selon plusieurs auteurs (Dormans et, 2000).

Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antimicrobiennes sont également fongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus

longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et lactones sesquiterpeniques avaient une activité antifongique.

Selon Giordani et Kaloustian (2006) la lavande et ses diverses espèces est dotée d'un bon pouvoir inhibiteur de la croissance des levures.

Les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thym et d'eucalyptus se révèlent particulièrement efficaces contre les staphylocoques dorés résistants et les entérocoques (May *et al.*, 2000 Tohidpour *et al.*, 2010).

Les investigations des Hanamanthagouda *et al.*, 2010, Gómez-Estaca *et al.*, 2010 qui ont étudié l'effet de l'huile essentielle de la lavande sur quelques souches bactériennes et ils ont trouvé que les bactéries gram positive par rapport gram négative et *P. aeruginosa* est révélée la plus résistante.

Pseudomonas aeruginosa a la réputation d'être très résistante à toutes sortes d'agents antimicrobiens et antibiotiques en général. Cela est probablement dû à la capacité qu'a la bactérie à de former un biofilm. Un biofilm est une organisation complexe, composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se trouvent dans des états physiologiques spécifiques à leur situation. Ainsi toute la population bactérienne n'est pas exposée simultanément et identiquement au produit. Il est établi que le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antimicrobiens (Fleurette *et al.*, 1995).

II.6 Les résultats de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice sont représentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Valeur de CMI de l'H.E testée sur les souches les plus sensibles.

Souches bactériennes	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
Concentration (μL d'HE /mL)	125	125	500

Les résultats de la diffusion des disques sur gélose ont montré une activité antimicrobienne importante, les CMI ont été calculées et sont comprises de 125 μ L d'HE/mL à 500 μ L d'HE /mL.

L'ensemble des espèces bactériennes étudiées ont subi une action inhibitrice à des concentrations différentes.

Les CMI obtenues variaient en fonction des souches testées.

La valeur la plus élevée de CMI obtenues qui est 500 μ L d'HE /mL est enregistrée avec la souche *E. coli*.

La souche *S. aureus* et *B. subtilis* sont inhibées à la même concentration (125 μ L d'HE /mL).

La représentation graphique montre que la concentration minimale nécessaire pour inhiber la souche *E. coli* est la plus grande.

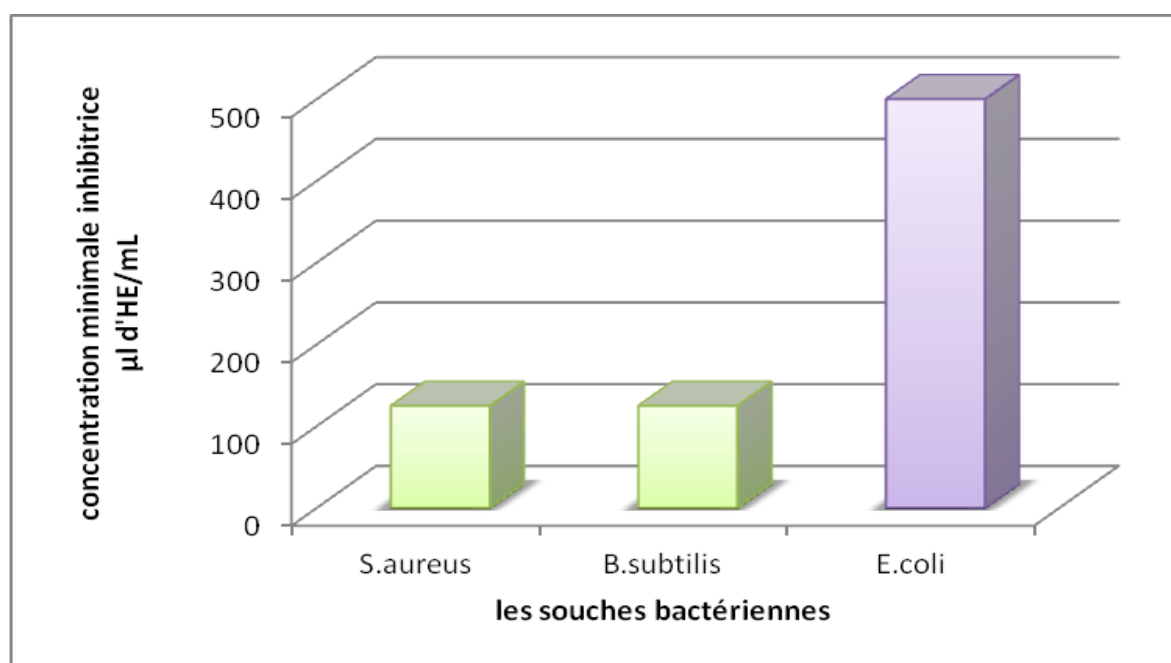


Figure 16: représentation graphique des CMI calculées.

Les représentations photographiques suivantes montrent les résultats des CMI de l'HE de *Lavandula officinalis*.

Lors des travaux de Hoet et al. (2006), Santana-Rios et al. (2001), ont observé que l'inhibition augmente avec la concentration de linalol pour toutes les bactéries examinées. Varona et al. (2012) et Ipek et al. (2005) ont trouvé que la concentration

minimale inhibitrice maximale de plusieurs bactéries par l'huile essentielle de la lavande était à 75 % ce qui est en accord à ceux que nous avons démontré.

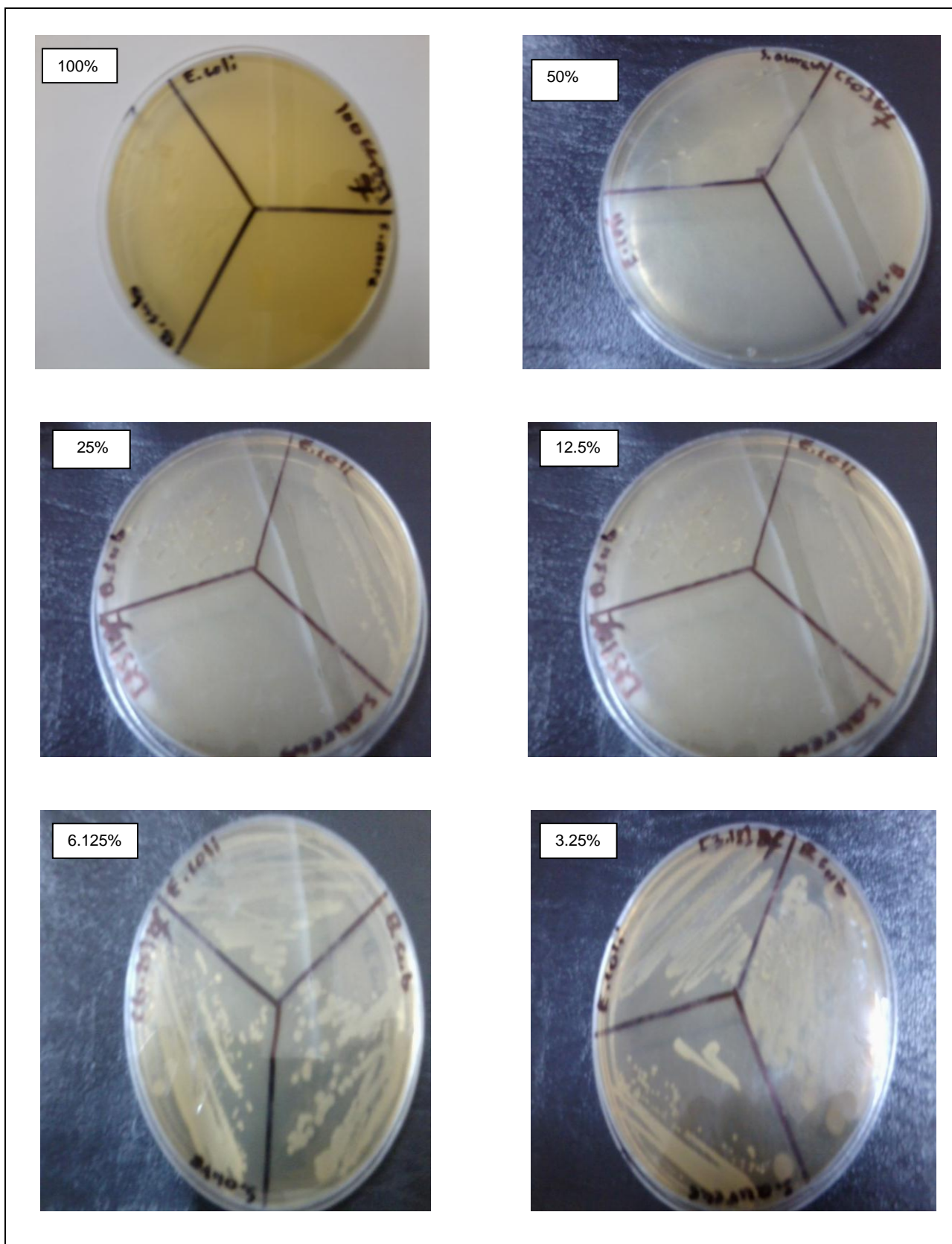


Figure 17 : Photographies des résultats de CMI d'HE de *Lavandula officinalis*.

Il est à noter que l'efficacité d'une H.E. est inversement proportionnelle à la valeur de sa CMI vis-à-vis d'une souche donnée.

En générale Ossalah et *al.* (2007), ont rapporté que la différence dans les activités antimicrobiennes des huiles essentielles peut être liée à la concentration, à la nature et le contenu, aux groupements fonctionnels, à la configuration des composés et, leur interaction synergique possible. Cependant la comparaison de l'efficacité des huiles essentielles à travers les différentes publications reste difficile à réaliser, et cette difficulté réside au niveau des différents paramètres externes incontrôlables : comme la composition chimique qui varie selon les conditions les conditions environnementales de la plante, même au sein d'une espèce. Donc les activités antimicrobiennes d'huile essentielle peuvent changer par sa composition chimique par les géotypes, aux méthodes employées pour évaluer l'activité antimicrobienne (la technique de diffusion par disques sur agar ou par méthode de dilution) les résultats obtenus par chacune de ces deux méthodes peuvent être différente :selon le choix et les condition physiologiques des micro-organismes, la période de l'exposition du microorganisme à l'HE, aux doses d'HE utilisées, le choix de l'émulsifiant pour solubiliser les HE. Ceux-ci autant de facteurs pouvant expliquer parfois des résultats contradictoires des différentes études.

Conclusion

La connaissance empirique des plantes remonte à l'aube de l'humanité, l'époque actuelle voit le retour en force de la recherche du naturel, la famille de lamiaceae est constituée de plusieurs espèces très répandues sur le littoral algérien, l'une de ses espèces la lavande vraie (*Lavandula angustifolia*) qui est connue par son usage médicinale sous le nom *Lavandula officinalis*.

Dans ce mémoire nous avons obtenu un rendement de 0,44 % en HE extraite industriellement pendant une heure de la lavande à l'état fraîche. L'étude de ses caractéristiques organoleptiques, physico-chimiques a montré qu'elle est conforme aux normes AFNOR. Ainsi nous avons analysé sa composition chimique de l'extrait par la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme, les résultats indiquent une abondance des composés monoterpéniques dominée par le linalool qui est le composé majoritaire (40,8 %) et l' α - pinène (18,7%) suivi par l' α - thymène (11,47%).

Finalement nous avons évalué le pouvoir antimicrobien qualitativement et quantitativement de cette huile vis-à-vis de certaines souches microbiennes connues comme des souches pathogènes présentes dans les produits alimentaires. Nous avons remarqué une activité très importante vis-à-vis la souche fongique *C. albicans*, et modérée à légèrement inhibitrice dans le cas de *B. subtilis*, *S. aureus* et *E. coli*, alors que *P. aeruginosa* est représentée la souche la plus résistante. Aussi les résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice pour les souches les plus sensibles ont révélé des valeurs comprises entre 125 μ L/mL à 500 μ L/mL à savoir les Gram positif et négatif.

Il est à noter que le pouvoir antimicrobien dépend de la composition chimique des huiles essentielles non seulement les composés majoritaires mais la synergie de ces derniers et les composés mineurs.

Des études ultérieures plus approfondies doivent être effectuées afin de cerner l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, donc il serait intéressant de :

- Vérifier leur innocuité par des tests de toxicité et des tests d'allergénicité semble d'une grande importance.
- Mener une étude détaillée sur la composition qualitative et quantitative de ces huiles par le couplage de la CPG/SM car l'identification de la composition exacte d'une huile essentielle constitue la première étape dans la quête de la compréhension du fonctionnement de ces molécules.
- Tester l'extrait de l'HE sur d'autres agents microbiens afin de confirmer son efficacité.
- D'étudier l'activité antioxydante et les aptitudes technologiques de cette HE.
- Poursuivre l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, notamment l'action isolée de chacun de ses constituants et la détermination de la concentration minimale bactériostatique (CMB).
- Et enfin l'application de ses résultats dans le domaine agro-alimentaire.

Annexe 1 : Matériels utilisés pour la détermination de l'activité antimicrobienne

- Agitateur
- Bec benzen
- Boîtes de Pétri
- Disques d'antibiogrammes stériles
- Etuve
- Micro-seringue
- Papier aluminium
- Pince
- Pipette Pasteur
- Tubes à essai
- Eau distillé
- Eau physiologique

Annexe 2: Composition des principaux milieux de culture utilisés

➤ **Milieux liquides** : Composition en g/l

- **Eau physiologique stérile**

Chlorure de sodium (NaCl).....9g

Eau distillée.....1000ml

pH = 7

Sterilisation à 121°C/mn.

- **Eau peptonnée**

Proteose peptone10g

Peptone10g

Chlorure de sodium5g

pH = 8,6

Stérilisation à 121°C/15mn

- **Bouillon BRAIN HEART INFUSION (BHIB)**

Proteose-peptone.....10g

Infusion de cœur de bœuf.....5g

Chlorure de sodium.....5g
Phosphate disodique.....2,5g
Glucose.....2g
Eau distillée qsp.....1000ml
pH= 7,4
Stérilisation à 121°C/15mn

➤ **Milieux solides** : Composition en g/l

- **Gélose Muller Hinton** :

Extrait de viande3g
Hydrolysat acide de caséine17,5g
Agar18g
pH = 7,4
Sterilisation à 121°C/15mn

- **Gelose Chapman** :

Extrait de viande.....1g
Extrait de levure3g
Tryptone 5g
Peptone bacteriologique 10g
Chlorure de sodium70g
Mannitol.....10g
Rouge de phénol.....0,025g
Agar.....15g
Ph = 7,4
Stérilisation à 121°C/15mn

- **Gélose nutritive**

Peptone.....10g
Extrait de viande.....3g
Extrait de levure.....3g
Chlorure de sodium5g
Agar.....18g
pH =7,3±0,2

Stérilisation à 121/15mn.

- **Sabouraud :**

Glucose.....20g

Peptone.....10g

Agar.....20g

pH =6 – 6,5

Stérilisation à 121/15mn

Annexe 3 : tableau de l'analyse de la composition chimique

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	11,147	2295,774	354,643	6,4	11,4	0,11	
2	11,733	161,837	25,537	0,5	0,8	0,16	
3	13,333	6715,262	653,907	18,7	21,1	0,21	
4	14,133	569,764	97,516	1,6	3,1	0,11	
5	16,427	14642,671	870,195	40,8	28,0	0,32	
6	18,967	569,637	38,996	1,6	1,3	0,11	
7	20,533	1298,618	123,098	3,6	4,0	0,21	
8	21,013	234,245	21,085	0,7	0,7	0,21	
9	21,387	415,480	34,617	1,2	1,1	0,21	
10	22,187	154,533	19,488	0,4	0,6	0,16	
11	22,560	897,270	100,283	2,5	3,2	0,16	
12	22,967	299,941	29,551	0,8	1,0	0,16	
13	23,467	577,603	70,975	1,6	2,3	0,16	
14	24,640	857,625	56,194	2,4	1,8	0,16	
15	25,493	564,637	65,574	1,6	2,1	0,16	
16	25,813	236,415	27,541	0,7	0,9	0,16	
17	26,293	676,937	53,632	1,9	1,7	0,16	
18	28,267	366,839	50,134	1,0	1,6	0,16	
19	28,533	475,815	21,766	1,3	0,7	0,16	
20	38,880	191,348	19,515	0,5	0,6	0,21	
21	40,960	1253,492	102,391	3,5	3,3	0,27	
22	43,787	361,871	43,282	1,0	1,4	0,16	
23	44,533	612,073	73,237	1,7	2,4	0,21	
24	46,507	542,617	50,106	1,5	1,6	0,16	
25	48,533	642,003	69,554	1,8	2,2	0,16	
26	49,387	302,463	29,620	0,8	1,0	0,16	
	Total	35916,769	3102,435	100,0	100,0		

Sequence : as

By : crapc

Description :

Created : 12/10/2013 11:33:36

Modified : 25/11/2013 10:01:15

Sequence Type : Active

Idle Time : 20,00 min.

Etude bibliographique

Partie expérimentale

Introduction

Sommaire

Annexes

Références bibliographique

Résultats et discussion

- AFNOR (Agence Française de Normalisation), (1989).** Huile Essentielle 3^{ème} Edit, Paris (France).
- AFNOR, 1996.** Huiles essentielles. Paris, France.
- AFNOR, 2000.** Huiles essentielles. Échantillonnage et méthodes d'analyses.
- BAYDAT H., SAGDIC O., OZKAN G., KARADOGAN T., 2004.** Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymus* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Contro* 15, 169-72.
- BENDIMERAD N. , TALEB S.A., BENABADJI B., FERNANDEZ X., VALETTE L., LIZZANI-CUVELLIER L., 2005.** Composition and antimicrobial activity of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb) essential oil from Algeria. *Journal and food Chemistry* 53, 2947-2952.
- BENJILALI B., TANTAOUI-ELARA A., ISMAÏLI-ALAOU M., et AVADI A., 1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*, Tome XX, n° 2, p. 155-167.
- BERCHE P. 2003.** Bactériologie générale. PCE M 2. Faculté de médecine Necker-Enfants malades (France). pp 89.
- BICCHI C., LIBERTO E., CAGLIERO C., CORDEO C., SGORBINO B., RUBIOLO P., 2008.** Conventional and narrow bore short capillary columns with
- BILLERBECH., 2004.** Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *Int. J. Aromather.* 14, 192–197.
- BOLOU G. E. K., ATTIOUA B., N'GUESSAN A. C., COULIBALY A., N'GUESSAN J.D., DJAMAN A.J., 2011.** Évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 80, 2011, p. 772 - 790 Côte d'Ivoire.
- BOUAOUN D., HILAN C., GARABETH F., SFEIR R., 2007.** Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. *Phytothérapie* 5, 129-134.

- BOUBRIT S., BOUSSAD N., 2007.** Détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Mémoire d'Ingéniorat, Tizi-Ouzou.
- BOUCHIKHI T., 1994.** Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles. Thèse de doctorat d'État : Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand (France).
- BURT S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- CAILLET S., LACROIX M., 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) INRS-Institut Armand-Frappier, Université de Laval (Québec).
- CHANG S.T., CHEN P.F., CHANG S.C., 2001.** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloem*. *J. Ethnopharmacol* 77, 123-127.
- COSTA P., GROSSO C., GONCALVES S., ANDRADE P.D., VALAENTAO P., BERNARDO-GIRL M.G., RAMONO A. 2012.** Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. *Food Chemistry* 135, 112–121.
- cyclodextrin derivatives as chiral selectors to speed-up enantioselective
- DJENANE D., AIDER M., YANGGUELA J., IDIRI L., GOMEZ D., RONCALES P., 2012.** Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science* 92, 667–674.
- DORMAN H.J., DEANS S.G., 2000.** Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *J. of Appl. Microbiol* 88, 308-316.
- Edition De Boeck Diffusion s.a., p 956.

- FAID M., CHARAL M. MOSADDAK M., 1996.** Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *J. Essent. Oil Res* 8, 657-664.
- FLEURETTE, J., FRENEY J., 1995. "Antiseptie et désinfection".**
gas chromatography and enantioselective gas chromatography–mass spectrometry analyses. *Journal of Chromatography A* 1212, 114–123.
- GIORDANI R., KALOUSTIAN J. (2006).** Action anticandidosique des huiles essentielles, leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *Phytotherapie* 3,121-124.
- GOMEZ-ESTACA J. A., LACEY L., LOPEZ-CABALLERO M.E., GOMEZ-GUILLEN P. M., 2010.** Biodegradable gelatinechitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology* 27, 889-896.
- HANAMANTHAGOUDA M.S., KAKKALAMEL S.B., NAIKA P.M., NAGELLA P., SEETHARAMAREDDY H.R., MURTHY H.N., 2009.** Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chemistry* 118, 836–839.
- HOET S., STEVIGNY C., HERENT M.F., QUETIN-LECLERCQ J. 2006.** Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.* 72, 480-482.
- IPEK E., ZEYTINGLU H., OKAY S., BERRIN A., T., KURKCUOGLU M., CAN BASER C H., 2005.** Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella /microsomal test. *Food Chemistry* 93, 551–556.
- KALEMBA D., KUNICKA A .2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem* 10, 813-829.
- KARAMAN S., DIGRAK M., RAVID U. & IICIM A., 2001.** Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacol* 76, 183-186.

- KELEN M. et TEPE B. (2008).** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technology* **99**, 4096- 4104.
- KURITA N., KOIKE S., 1982.** Synergetic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oils components. *Agric. Biol. Chem* **46**, 159-165.
- MAY J., CHAN CH., KING A., WILLIAMS L, FRENCH G.L.,2000.** Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother* **45**, 639-643.
- MONA M. ORABY, ALI M. EL-BOROLLOS. 2013.** Essential oils from some Egyptian aromatic plants as an antimicrobial agent and for prevention of potato virus transmission by aphids. *Annals of Agricultural Science* **58**, 97–103.
- OUSSALAH M., CAILLET S., SAUCIER L., LACROIX M. (2007),** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **18**, 414-420.
- PHARMACOPEE EUROPEENNE**, 4ème édition, (2001).
- PIBIRI M.C., 2005.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat. Suisse. P161.
- PONCE A.G., FRITZ R., DEL VALLE C., ROURA S.I., 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard **36**, 679-684.
- PORTO D., C, DECORTI D., KIKIC I., 2009.** Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry* **112** , 1072–1078.
- QUEZEL P. et SANTA S., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed, CNRS, Paris. P86.
- SAADATIAN M., AGHAEI M., FARAHPOUR M., BALOUCHI Z., 2013.** Chemical composition of lavender (*Lavandula officinalis* L.) extraction extracted by two solvent concentrations. *Global Journal of Medicinal Plant Research* **1(2)**, 214-217.

- SANTORE F., NAPOLITANO F., OZCAN M., 2000.** Composition and antimicrobial activity of essential oil from *Crithmum maritimum* L (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance journal* 15, 186-189.
- SATRANI B., FARAH A. & TALBI M., 2006.** Effet de la distillation sur la composition chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de Myrte (*Myrtus communis* L.) du Maroc. *Acta Bot. Gallica* 153(2), 235-242.
- SKOOG D.A., HOLLER F.J. NIEMAN T.A., 2003.** Principes d'analyse instrumentale.
- TANTAOUI-ELARAKI A., BERAUD L., 1994.** Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol* 13, 67-72.
- THOMSON J.D. 2003.** Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J. Chem.*
- TOHIDPOUR A., SATTARI M., OMIDBAIGI R., YADEGAR A., NAZEMI J 2010.** Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine* 17, 142-145.
- VARONA S., RODRIGUEZ-ROJO S., MARTIN A., COCERO M.J., DUARTE C.M.M.C.** Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch. *J. of Supercritical Fluids* 58, 313–319.
- VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERNANDEZ-LOPEZ J., PEREZ-ALVAREZ J., 2008.** Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata*), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.), essential oils. *Food control* 19, 1130-1138.
- ZHIRI A., 2006.** Aromathérapie, un peu d'histoire. Edition NUTRA NEWS, France. P 6, 8.
- ZHIRI A., BAUDOUX D., 2005.** Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies : aromathérapie scientifique. Luxembourg : Édition Inspir Development Ecol 29, 859-880.

ALITONOU G.A., AVLESSI F., SOHOUNHLOUE K.C., ALLISNET D.,
2008. Aromathérapie - Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien
avéré. *Fondation pour le Libre Choix.*