

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

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA1

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
Du diplôme de Master académique en science de la nature et de la vie

Option : Biotechnologies Végétales

**Etude du pouvoir antimicrobien de deux huiles essentielles du
(*Pelargonium graveolens*, *Rosmarinus officinalis*) et leurs
utilisations comme conservateurs dans le «Ro-llon »**

Présenter par: Kherfi Marmar

Devant le jury composé de :

M ^{me} STELLA.M	MCA	(USDB)	Président de jury
M ^{me} TOUAIBIA.M	Doctorante	(USDB)	Examinatrice
M ^{me} CHAOUCH .F/z	MCA	(USDB)	Promotrice

ANNEE UNIVERSITAIRE 2012/2013

Remerciements

Le premier remerciement avant tout je tiens à remercier DIEU le tout puissant qui m'a donné le courage, la force, la volonté, la santé, les moyens, pour accomplir mes études et réaliser ce modeste travail.

Le présent document est le couronnement d'une longue formation au cours de laquelle j'ai bénéficié du soutien de plusieurs personnes à qui je présente mes remerciements :

M^{me} CHAOUCH ma promotrice **maitre de conférence à l'université Saad Dahlab de Blida**, pour avoir accepté de m'encadrer et pour la confiance, qu'elle m'a accordé afin de réaliser ce travail.

M^{me} STELLA pour avoir accepté de présider le jury. Je tiens à lui exprimer mes vifs remerciements et mes respects de m'avoir orienté et conseiller, ce qui m'a vraiment m'aider.

Je tiens également à remercier vivement M^r TOUAIBIA pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes remerciements chaleureux à tous mes enseignants qui ont contribué durant tout mon cursus. je tiens à leur dire un immense MERCI.

Permettez-moi de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de travail, nous ont dirigé soutenu, aidé et encouragé.

DEDICACES

Maman, comment ne pas commencer par toi, celle que j'aime et qui est ma raison et ma foi. Ces nuits parsemées d'insomnies, ta patience ta douceur, ton amour et tes encouragements qui ont fait de moi celle que je suis aujourd'hui, je t'aime si fort que tu le croie.

Mon père symbole de force, d'amour et de patience. Tu es l'amour qui ma jamais trahi. Je te dis merci pour tous ce que tu as fait pour moi je t'aime beaucoup.

A mes chères Frères Ramzi et Wael, je vous aime Merci.

A mes sœur Malia et Khadidja et Kaouther Merci.

Ames chères nièces Oumaima et Nihal et ma belle sœur Farah, et beau frères Kamel et Hocine.

A mon chouchou Mohamed Riad que j'adore.

A toute ma famille et surtout Toufik

A toute mes amies :fella, yesmine, Safia, Nacira, Chahra, asma, ilhem.

MARMAR

RESUME

L'objectif de notre travail consiste à extraire les huiles essentielles de la partie aérienne (feuilles) du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) et du romarin (*Rosmarinus officinalis*), récoltés dans la région de Blida, et ce afin de la valoriser comme substance thérapeutique antimicrobienne et comme conservateurs dans un produit cosmétique fini : le « Roll-on ».

L'extraction des huiles essentielles des deux plantes a été effectuée au niveau du laboratoire de la phytothérapie des substances naturelles par l'entraînement à la vapeur d'eau.

Les tests physico-chimiques sur les HE ont révélé que ces dernières répondent aux normes AFNOR en vigueur.

Le screening antimicrobien des HE a été accompli par 02 méthodes différentes (Aromatogramme, et concentration minimale inhibitrice par dilution), sur 7 souches, 4 souches bactériennes, 1 moisissure et 2 levures

L'huile essentielle du géranium rosat a présenté une activité antibactérienne majeure sur *Enterococcus faecalis* (diamètre=17mm), avec une CMI=1.75%, ainsi que toutes les souches fongiques, particulièrement sur *Candida albicans* (diamètre=22) avec une CMI de 0.21%.

En outre, l'essence du romarin s'est révélé, un fongicide puissant avec des valeurs de CMI <1.75%. Cette HE est dotée d'une activité antimicrobienne forte, particulièrement sur *Staphylococcus aureus* (diamètre=23mm), avec une CMI de 0.875%.

L'étude de l'effet antimicrobien des HE utilisées dans le « Roll-on » comme conservateurs à différentes concentrations 0.4% 0.9% 1.5% 2% et la détermination de leur efficacité après 38 jours de conservation des « Roll-on » à la température ambiante (25°C) a révélé que :

✓ Le produit fini ne présente pas de développement microbien, même à très faible concentration 0.4%.

✓ La qualité physicochimique et organoleptique des « Roll-on » est conforme aux normes adoptées par le laboratoire VENUS.

Mots clés : Huile essentielle, effet antimicrobiennes, Conservateurs.

SUMMARY

The objective of our work is to extract the essential oils from the aerial parts (leaves) of geranium (*Pelargonium graveolens*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) harvested in the region of Blida, in order of value as a therapeutic substance antimicrobial and as preservatives in cosmetic finished product: the "roll-on".

The extraction of essential oils from two plants was performed at the laboratory of plant protection substances by natural training method to steam.

The physico-chemical tests on HE revealed that they meet AFNOR standards.

The screening of antimicrobial HE 02 was accomplished by different methods (Aromatogram, and minimum inhibitory concentration by dilution) of 7 strains, 4 bacterial strains, two yeast and mold1.

The essential oil of geranium has presented a major antibacterial activity in *Enterococcus faecalis* (diameter = 17mm), with an MIC = 1.75%, as well as all fungal strains, particularly *Candida albicans* (diameter = 22) with an MIC of 0.21 %.

In addition, the essence of rosemary has proved a powerful fungicide with MIC values <1.75%.

That HE has a strong antimicrobial activity, particularly *Staphylococcus aureus* (diameter = 23mm), with an MIC of 0.875%.

The study of the antimicrobial effect of ET used in the "Roll-on" as conservative at different concentrations 0.4% 0.9% 1.5% 2% and determining their effectiveness after 38 days of storage the "Roll-on" on room temperature (25 ° C) revealed that:

- The finished product shows no microbial growth, even at very low concentration 0.4%.
- The physico-chemical and organoleptic quality of "Roll-on" is consistent with the standards adopted by the VENUS laboratory.

Keywords: essential oil, antimicrobial, Conservatives.

الملخص

الهدف من عملنا هو استخراج الزيوت الأساسية من الأجزاء الهوائية (الأوراق) لنبتتي العطرشة (*Pelargonium graveolens*) و إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) اللتان تم قطفهما في منطقة البليدة، لاستعمالهما كمادة علاجية مضادة للميكروبات وكمادة حافظة في مستحضر تجميل . تم استخراج هذه الزيوت الأساسية لهتين النبتتين في مختبر الصيدلة النباتية للمواد الطبيعية بطريقة التجريد مع بخار الماء.

أظهرت نتائج التحليل الفيزيو-كيميائي توافق مع معايير AFNOR. تم إنجاز فحص مضادات الميكروبات بطريقتين هما (Aromatogram، والحد الأدنى من تركيز المثبطة CMI) على 7 سلالات، 4 سلالات بكتيرية، واثنين من الخميرة والعفن.

الزيت الأساسي لنبتة العطرشة اظهر فعالية النشاط المضاد للبكتيريا خاصة على *Enterococcus faecalis* (قطر = 17م)، مع $\% \text{MIC} = 1.75$ ، وكذلك جميع السلالات الفطرية، وخاصة *Candida albicans* (قطر = 22م) مع $\% \text{MIC} = 0.21$. اما بالنسبة لزيت إكليل الجبل فقد اظهر فعالية كبيرة في اثباط العمل الفطري مع $\% \text{MIC} < 1.75$. بالإضافة إلى ذلك قوته المثبطة لنشاط الميكروبات ، لا سيما *Staphylococcus aureus* (قطر = 23م)، مع $\% \text{CMI} = 0.875$.

نتائج دراسة تأثير الزيتين على Roll-on بتراكيز مختلفة 0.4% 0.9% 1.5% 2% وتحديد فعاليتها بعد 38 يوما من التخزين في درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية) كشفت أن:
-المنتج النهائي لا يظهر أي نمو الميكروبات، وحتى في تركيز منخفض جدا 0.4%.
-اثبت المنتج التجميلي جودة مستقرة و جيدة ابتداء من التركيز 0.4% لكل من الزيتين.

الكلمات المفتاحية : الزيوت الأساسية. النشاط المضاد للبكتيريا. حافظ.

Abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ATCC : *American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes).*

HE : *huile essentielle.*

GN : *gélose nutritive.*

MH : *Muller Hinton.*

PCA : *Agar-Plate-Count.*

S : *Sabouraud.*

IR : *indice de réfraction.*

ID : *indice d'acide.*

IS : *indice de saponification.*

IE : *indice d'ester.*

ZI : *zone d'inhibition.*

CEI : Communauté de l'Etat Indépendant.

Glossaire

- ❖ **Antioxydant** : est une substance qui diminue l'oxydation d'autres substances chimiques et qui protège l'organisme contre les dommages causés par les radicaux libres, entraînant le processus de vieillissement.
- ❖ **Antiseptique** : substance capable de prévenir la manifestation d'infection en contribuant à la destruction des Microbes.
- ❖ **Les glandes sudoripares ou sudorales** : sont des [organes](#) spécialisés, qui sécrètent la [sueur](#).
- ❖ **Olfactive** : qui appartient à la fonction de l'odorat.
- ❖ **Spasmolytique** : ou **antispasmodique** est une substance supprimant les **spasmes** (Contractions musculaires anormales et involontaires).
- ❖ **Stomachique** : stimule les fonctions de l'estomac et facilite la digestion
- ❖ **Sueur** : est un ultrafiltrat du plasma sanguine qui est ensuite transformé notamment par réabsorption des électrolytes au long du segment excréteur.
- ❖ **Sueur apocrine** : sécrété par les glandes sudorales apocrine se trouvent sous les [aisselles](#), dans l'[organe axillaire](#), sur la peau autour de l'[anus](#) et autour des [mamelons](#), leur conduit excréteur débouche dans un [follicule pileux](#).
- ❖ **Sueur eccrine** : Elles se localisent sur presque dans tout le corps mais surtout sur la paume des mains, sur la plante des pieds, et sur le front, le canal excréteur s'étend vers le haut et débouche sur un pore en forme d'[entonnoir](#) à la surface de la peau.
- ❖ **Sueur palmoplantaire** : Sueurs proviennent de la paume des mains et à la plante des pieds.

Listes des figures

Figure 01 : Aspects morphologiques de géranium rosat (<i>Pelargonium graveolens</i> L)	19
Figure 02 : Aspects morphologiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	22
Figure 03 : le roll-on (commercialiser par venus).....	28
Figure 04 : Matière végétale fraiche.....	29
Figure 05 : Protocol de l'extraction de l'HE	29
Figure 06 : Différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide.....	31
Figure 07 : Différentes étapes de la détermination de l'indice de saponification.....	32
Figure 08 : la méthode d'aromatogramme sur boite de Pétrie.....	34
Figure 09 : les différentes étapes de l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	37
Figure 10 : Contrôle microbiologique des « Roll-on ».....	41

Liste des tableaux

<i>T 01</i> : Microorganismes testés.....	27	<i>T</i>
<i>02</i> : les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités.....	36	
<i>T 03</i> : Caractéristiques organoleptiques des HE.....	45	
<i>T 04</i> : caractéristiques physicochimique des huiles essentielles du <i>Pelargonium graveolens</i> et du <i>Rosmarinus officinalis</i>	47	
<i>T 05</i> : Activité antimicrobienne et antifongique de deux HE du romarin et du geranium rosat (Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés avec une règle simple).....	52	
<i>T 06</i> : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'HE du géranium rosat sur 6 souches microorganismes.....	53	
<i>T 07</i> : Détermination de la concentration minimale inhibitrice de l'HE du romarin sur 6 souches microorganismes.....	54	
<i>T 08</i> : Résultats de l'effet antimicrobiens des deux HE dans le « Roll-on » après 5 jours de conservation.....	55	
<i>T 09</i> : Résultats de l'effet antimicrobiens des deux HE dans le « Roll-on » après 38 jours de conservation.....	57	
<i>T 10</i> : Résultats du contrôle physicochimiques du « Roll-on » après 38 jours de conservation.....	59	

Liste des planches

Planche01 : L'activité antimicrobienne de l'HE du <i>Pélargonium graveolens</i>	50
Planche02 : L'activité antimicrobienne de l'HE du <i>Rosmarinus officinalis</i>	51

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1.Aromathérapie	3
I.2.Huiles essentielles	3
I.2.1.définition	3
I.2.2.Localisation et répartition	3
I.2.3.Classification des huiles essentielle	4
I.2.4.la composition chimique des huiles essentielles	4
a- Les terpènes et leurs dérivés : les terpénoïdes	4
b- Les composés aromatiques	5
c-Les composés d'origines diverses	5
I.2.5.Le rôle des huiles essentielles.....	5
I.2.6 Domaine d'utilisation des huiles essentielles.....	6
• Phytothérapie	6
• L'aromatogramme	7
• En cosmétologie	7
• En agroalimentaire	7
I.2.7.Toxicité des huiles essentielles.....	8
a. Toxicité par ingestion.....	8
b. Toxicité dermique.....	8
c. Toxicité selon la composition.....	8
d. Toxicité sur les cellules les animales ou humaines.....	9
I.2.8. conservation des huiles essentielles.....	9
I.2.9.Les huiles essentielles et les bactéries.....	9
• Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les cellules microbiennes.....	10
I.2.10. caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles.....	10

I.2.11. Caractéristiques organoleptiques.....	11
I.2.12. méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	11
I.2.12.1.Hydrodistillation.....	12
I.2.12.2. L'entraînement à la vapeur d'eau.....	12
I.2.12.3.Hydrodistillation par micro-onde sous vide.....	12
I.2.12.4. Extraction par solvant.....	12
II. Les produits cosmétiques.....	13
II.1. Définition.....	13
II.2. Classification.....	13
II.3. Composition des produits cosmétiques.....	13
II.4. Déodorants et anti transpirants.....	15
II.4.1. Définition d'un anti-transpirant.....	15
✓ Le « Roll-on ».....	15
II.5. Contrôle microbiologique d'un produit cosmétique.....	15
II.5. 1. L'agent conservateur.....	16
II.6. La cosmétique bio.....	16
II.6.1. Les conservateurs naturels.....	17
II.6.2. Conservation des produits finis contenant les huiles essentielles.....	17
II.7. Les principales difficultés rencontrées avec la vente de produits cosmétiques bio.....	17
III. Etude de la plante.....	18
III.1.Géranium rosat.....	18
III.1.1.Généralité.....	18

III.1.2.Description botanique.....	18	
III.1.3.Taxonomie et classification de Géranium rosat.....	19	
III.1.4. Synonymes et noms vernaculaires.....	20	
III.1.5. Origine et répartition.....	20	
III.1.6.Ecologie.....	20	III.1.7.
Récolte	21	
III.1.8.Huile essentielle du Géranium rosat.....	21	
III.1.9.propriétés thérapeutiques.....	21	
III.2.Romarin.....	22	
III.2.1.Généralité.....	22	
III.1.2.Description botanique.....	22	
III.2.3.Taxonomie et classification du romarin.....	23	
III.2.4. Synonymes et noms vernaculaires.....	23	
III.2.5. Origine et répartition.....	23	
III.2.6.Ecologie.....	24	III.2.7.
Récolte.....	24	
III.2.8.Divers usages de romarin.....	24	
Chapitre II : Matériels et méthodes		
Lieu et durée de stage.....	26	
II.1.Matériel biologique.....	26	
II.1.1.Matériel végétal.....	26	
II.1.2. Microorganismes	26	
II.2.Matériel non biologique.....	27	
II.2.1.Méthodes de laboratoire.....	27	
II.2.2.Le roll-on	28	
II.3.2.Méthode de travail	28	
II.4. Rendement en huile essentielle	30	
II.5.caractéristique des huiles essentielles	30	
II.5.1.caractéristiques organoleptiques	30	
II.5.2Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle	30	
II.5.2.1Mesure des indices physiques	30	
a-Détermination de la densité	30	
b- Détermination de l'indice de réfraction	30	

II.5.2.2. Mesure des indices chimiques	31
a-Détermination de l'indice d'acide	31
b-Détermination de l'indice de saponification.....	32
c- Détermination de l'indice d'ester	33
II.6.Evaluation de l'activité antimicrobien.....	33
II.6.1.Evaluation qualitative (l'aromatogramme)	34
II.6.2.Evaluation quantitative (CMI)	38
II.7. Etude de l'effet antimicrobien des deux huiles essentielles dans le Roll-on...39	
II.8.Contrôle physicochimique et organoleptique du « Roll-on » après un mois de conservation	42
II.8.1. Détermination de la densité relative à 20 °C.....	42
II.8.2. Mesure du potentiel d'Hydrogène (pH)	42
Chapitre III : Résultats et discussions	
III.1. Rendement en l'huile essentielle pour les deux plantes	44
III.2. Etude analytique	465
III.2.1.Tests organoleptique des deux huiles essentielles	45
III.2.2.Caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles	46
III.3.Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle	48
III.3.1. Evaluation qualitative : l'aromatogramme	48
III.3.2. Evaluation quantitative : concentration minimal inhibitrice.....	53
III.4. L'effet des HE dans le « Roll-on ».....	55
III.5. Contrôle physicochimique et organoleptique des « Roll-on ».....	59
Conclusion générale.....	61

Références bibliographiques
Annexes

INTRODUCTION

Introduction

Depuis la plus haute antiquité, l'homme a travaillé en permanence à l'amélioration de son image; religion, magie et beauté ont largement été confondues et se sont illustrées par l'usage de poudre, de fards, de senteurs, mais aussi de peintures souvent guerrières.

Les « cosmétiques bio » désignent une famille de produits composés d'ingrédients naturels ou d'origine naturelle. Elles limitent ou excluent l'utilisation de substances pouvant entraîner des effets nocifs sur l'utilisateur. La majorité d'ingrédients sont issus du monde végétal et sont exploités sous différentes formes (huiles essentielles, huiles végétales, poudres...), mais aussi des substances d'origine animale produites naturellement (**Lacharme, 2011**).

L'immense chance pour un scientifique de travailler actuellement dans les domaines, comme celui de la cosmétologie, réside principalement dans la variété des nombreuses technologies, qui sont utilisées pour concevoir, fabriquer et conditionner un produit cosmétique (**Aubry et Sebag, 2005**).

L'industrie cosmétique est depuis toujours un gros consommateur de produits végétaux. Cette consommation s'est accrue ces dernières années, avec la diminution de l'utilisation des matières premières d'origine animale dans les produits cosmétiques. Ainsi que les produits chimiques synthétiques, qui sont connus pour leurs propriétés cancérogènes.

Aujourd'hui, les consommateurs recherchent l'efficacité et le produit cosmétique « végétale » n'échappe pas à cette règle (**Martin et Seiller, 2006**).

Parmi les extraits naturels les plus utilisés, nous avons les huiles essentielles qui possèdent des applications importantes en médecine, soit pour leurs qualités odorantes ou bien pour soulager la douleur (**Allou, 2005**).

De plus, les huiles essentielles sont utilisées comme conservateurs, parfums naturels et agents actifs efficaces dans les produits « cosmétiques bio », pour leurs incroyables vertus (**Demange et Serrano, 2007**).

Dans cette optique, nous nous sommes intéressées à l'étude des huiles essentielles de deux espèces ; *Pelargonium graveolens* et *Rosmarinus officinalis*. Le choix de ces espèces s'est basé d'abord sur la valorisation de la flore Algérienne en cosmétologie, leurs propriétés médicinales et antiseptiques, ainsi que sur leur disponibilité.

L'objectif de notre travail est l'étude du pouvoir antimicrobien de deux huiles essentielles et de mettre en évidence leur efficacité comme conservateurs dans le « Roll-on » anti transpirante.

Synthèse bibliographique

I.1.Aromathérapie

L'histoire de l'aromathérapie remonte aux civilisations les plus anciennes. Cette discipline, que certains définissent comme un art, ne se limite pas à une question de parfum. Elle se fonde plutôt sur des principes holistiques, toute comme l'homéopathie, la naturopathie et la phytothérapie, l'aromathérapie cherche les liens susceptibles d'exister entre les différents troubles et tente de remonter à la cause du symptôme. Il lui faut pour cela connaître le profil de l'individu à traiter, car chaque personne réagit de manière différente face à une même thérapie. (Salle, 1991)

I.2. Huiles essentielles (HE)

I.2.1. définition

Les HE appelées aussi essences sont des mélanges complexes de substances odorantes et volatiles contenues dans les végétaux. Ce sont des substances aromatiques naturelles, que sécrète la plante. L'HE est le résultat de la distillation à la vapeur d'eau des plantes aromatiques (Odile et Danielle, 2007).

La norme **AFNOR NF T 75-006** établie par **AFNOR** définit l'HE comme : « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydro-distillation. L'HE est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ». La majorité des HE sont des liquides très peu colorés, volatiles à température ambiante. Les HE dégagent une odeur caractéristique et sont en général plus légères que l'eau tout en possédant des caractéristiques hydrophobes (AFNOR, 2002).

Ces essences se distinguent des huiles grasses, qui sont fixes et tachent le papier d'une manière permanente, en ce sens qu'elles se volatilisent à la chaleur sans laisser de taches (Sallé, 1991).

I.2.2.Localisation et répartition

Les HE n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs : il y aurait, selon Lawrence 17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les HE sont répartis dans un nombre limité de familles, comme Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae, Piperaceae...ect.

Les HE peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : fleurs (bergamotier, tubéreuse), feuille (citronnelles, eucalyptus, laurier noble) bien que cela soit moins habituel dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, santal), des racines (vétiver), des rhizomes (curcuma, gingembre), des fruits (anis, badiane), des graines (muscades).

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement, associées à la présence de structures histologique spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la plante : cellules à HE des Lauraceae ou des Zingiberaceae, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (**Bruneton, 1999**).

I.2.3. Classification des huiles essentielles

Selon la fonction du constituant prédominant, **Le Laurant (1994)**, classe les HE en trois catégories :

- HE hydrocarbonées riches en terpènes (Pin, Citron : 90% en limonène).
- HE oxygénés riches en alcools et esters, (roses : 50% en géraniol, Thym : $\geq 30\%$ en Thymol, Coriandre : 70 à 80% en linalol).
- HE sulfurées (Conifères).

I.2.4. la composition chimique des huiles essentielles

Les propriétés des HE proviennent de leur composition chimique, les composés qui les constituent, peuvent être classés en deux groupes distincts, ayant chacun des caractéristiques spécifiques.

a- Les terpènes et leurs dérivés : les terpénoïdes

Ce sont des hydrocarbures cycliques ou acycliques, qui constituent un vaste groupe de métabolites secondaires de structures diverses, importantes dans de nombreuses interactions biotiques (**Luttage et al., 2002**).

Ce sont des polymères formés par la réunion d'unités Isoprènes à 5 carbones (C₅H₈), d'où le nom d'isoprénoides sous lequel les terpénoïdes sont parfois désignés [**Judd et al., (2002) ; Luttage et al., (2002)**].

Les mêmes auteurs déclarent, que l'isoprène est donc le constituant de base de la polymérisation. Selon le nombre d'unité, on distingue :

- Les hemiterpènes : une seule unité isoprène C₅H₈.
- Les monoterpènes : deux unités en C₅ (une unité en C₁₀).
- Les sesquiterpènes : trois unités en C₅ : C₁₅H₂₄.
- Les diterpènes : quatre unités en C₅ (deux unités en C₁₀) C₂₀H₃₂.
- Les triterpènes : six unités en C₅ (trois unités en C₁₀) C₃₀H₄₈.
- Les tetraterpènes : huit unités en C₅ (quatre unités en C₁₀) :C₄₀H₅₆.

Les monoterpènes et les sesquiterpènes représentent les terpènes proprement dit, ce sont les principaux composants des HE, les plus volatils à cause de leur masse moléculaire, qui n'est pas trop élevée (**Bellakhdars, 1997**).

b- Les composés aromatiques

Ce sont des dérivés du phenylpropane en C₆ C₃, l'un des constituants des HE, mais beaucoup moins fréquent que les terpènes, se sont souvent des allyles et propenylphénols et parfois des aldéhydes.

Les terpénoides et les composés aromatiques, donnent aux HE des propriétés nouvelles, en plus de celles spécifiques à chaque constituant pris séparément [**Bruneton, (1993) ; Luttag et al., (2002)**].

c- Les composés d'origines diverses

Compte tenu de leur mode de préparation, les HE peuvent renfermer divers composés aliphatiques : alcools (Menthol, Géraniol), (Citronellal, géraniol), ester (Acétates de menthyle, Acétates de citronellyle), cétones (Camphre, Menthone), éthers (Cinéole, Eucalyptol), phénols comme, Thymol et Carvacrol (**Bruneton, 1993**).

I.2.5.Le rôle des huiles essentielles

Elles ont des fonctions multiples dans la nature. En effet, expérimentalement, il a été établi qu'elles interviennent dans les interactions «végétaux-animaux» où elles constituent un moyen de communication appelé langage chimique (**Bruneton, 1997**).

En raison de leur structure chimique unique, les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer les parois cellulaires et de transporter l'oxygène, les nutriments et d'autres composés biochimiques vitaux, jusqu'à l'intérieur de chaque cellule. Elles contiennent de puissants

composés biochimiques qui donnent aux plantes la capacité de croître, de réparer les dommages à leur structure.

Back et Pemberton (1970) in MILADI, ajoutent que les huiles essentielles d'agrumes protègent les fruits contre les proliférations et les attaques d'insectes.

Les huiles essentielles sont utiles et efficaces, dans de nombreux aspects de la vie quotidienne, elles ont des fonctions très variées depuis très longtemps (**Valnet, 1984**).

Les huiles essentielles ont une toxicité aigue, une action répulsive, une inhibition de l'alimentation et un effet nocif sur le système de reproduction des insectes. Les métabolites issus des plantes sont récemment utilisés, comme de nouveaux pesticides synthétiques comme la toxaphene (insecticide et herbicide) (**Bruneton, 1993**).

Les constituants volatils des monoterpènes qui sont alcool, linalool, aldéhydes Acide carboxylique, d- limonène, b-myrcene. α - terpinéol, ces substances ont une action toxique sur la mouche domestique, la blatte, le charançon du riz (**Prates, 1998**).

La fonction des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure. Il est toute fois vraisemblable, qu'elles ont un rôle dans le domaine des interactions végétales (comme agents allélopathiques, notamment inhibiteurs de germination) et aussi dans les interactions végétal-animal: protection contre les prédateurs ; comme les insectes et les champignons et l'attraction des pollinisateurs (**Bruneton, 1993**).

I.2.6 Domaine d'utilisation des huiles essentielles

- **Phytothérapie**

C'est une branche de la phytothérapie qui utilise les HE pour traiter un certain nombre de maladies. Le terme aromathérapie vient du chimiste français **Gattefosse**, qui a utilisé l'HE de lavande pendant la première guerre mondiale, pour soigner des blessures et des infections. Selon lui la lavande était plus appropriée pour traiter les infections, que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité préoccupe de plus en plus des médecins et des pharmaciens, qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie (**Roulier, 1992**). Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux) [**Kato et al., (1990)** et **Schwartz et al., (1992)**]

Les HE du thym et du romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires.

Des études très récentes ont montré que le géraniol a une action sur les cellules cancéreuses du colon (**Carnesecchi et al., 2001**), en plus de l'activité anti-inflammatoire par **Siani et al.(1999)**.

- **L'aromatogramme**

L'aromatogramme (Du grec,*arôma* signifiant «arôme», et *gamma* signifiant «lettre, écriture»), est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (**Belaiche, 1997**).

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence, réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques [**Benjilali, (1986)** et **Satrani et al., (2007)**].

- **En cosmétologie**

Les HE sont largement utilisées dans la fabrication des produits cosmétiques tels que les parfums, savons, lotions et pommade de soins [**Wilson, (2002)** ; **Worwood, (2001)** ; **Aquino, (2002)**].

D'après **Demange et Serrano (2007)**, les huiles essentielles sont connues depuis des millénaires pour leurs incroyables vertus, elles sont utilisées comme conservateurs, parfums naturels et agents actifs efficaces dans les produits cosmétiques bios. Cependant, étant des produits actifs très concentrés, il est nécessaire de respecter le dosage.

Les HE sont destinés à être utilisés sous forme diluée dans les produits cosmétiques (**Anton et al., 2006**).

- **En agroalimentaire**

Les HE peuvent être utilisées comme additifs alimentaires (**Deba et al, 2008**). Elles sont actuellement employées comme arômes alimentaires, et peuvent servir en même temps comme agents de conservation des aliments, grâce à leur effet antimicrobien, et ce d'autant plus qu'elles sont reconnues comme saines (**Caillet et Lacroix, 2007**).

I.2.7. Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des HE est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées, en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées.

On trouve cependant quelques informations sur les toxicités :

e. Toxicité par ingestion

En règle générale, les HE d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec la DL (dose létale ou mortelle à 50% de la population examinée), ceci à des doses administrées à plus de 5 g/kg. En ce qui concerne la sarriette et l'origan, la toxicité est un plus élevée autour des 1.4 g/kg dont les données sont observées chez l'animal (**Bruneton, 1999**). Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, le plus souvent observés chez les enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'HE : Girofle (eugénol), Eucalyptus, Gaulthérie (salicylate de méthyle).

f. Toxicité dermique

Le large usage que font la parfumerie et la cosmétique de ces HE, a suscité de nombreux travaux sur leur éventuelle toxicité (aigüe ou chronique) par application locale. Tous les ouvrages traitant des HE donnent des concentrations maximales, les évictions et les mises en garde nécessaires. Le thym, l'origan, la sarriette sont connues pour leur pouvoir irritant, l'angélique et la bergamote sont photo-sensibilisantes, la cannelle est dermocaustique et allergisante pour les terrains sensibles (**Pibiri, 2006**).

g. Toxicité selon la composition

Certains auteurs comme **Franchomme et Pénoel, (1990)** et **Mailhebiau, (1994)**, se basent sur la composition des HE et les toxicités relatives des familles biochimiques, auxquelles elles appartiennent. Une utilisation prolongée des HE à thuyones (thuya, l'absinthe, sauge officinale) est neurotoxique. Ces huiles, dont la liste n'est pas exhaustive, sont inscrites dans un décret du Code de la Santé Publique Française datant de **1986**, visant à interdire leur vente en France. Certaines d'entre elles sont néanmoins en vente libre dans les autres pays européens moins restrictifs.

h. Toxicité sur les cellules les animales ou humaines

Certaines HE se révèlent cytotoxiques. Les HE de thym et de lavande selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande) (**Inouye, 2003**), sont cytotoxiques pour des cellules de hamster chinois. Par ailleurs, des HE de différentes variétés d'origan ont montré une forte cytotoxicité sur des cellules humaines dérivés de cancers (**Sivropoulou et Papanikolaou, 1996**).

I.2.8. conservation des huiles essentielles

Elles se présentent et se conservent dans des flacons de verre fumé, fermés par un bouchon bien hermétique, ce qui les préserve de la lumière et de l'air.

En effet, il importe d'éviter leur oxydation (à l'air) et leur polymérisation (à la lumière). Elles se conservent à une chaleur ambiante, sauf les HE d'orange, de mandarine, de pamplemousse, de citron, de limette toutes, les HE qui sont obtenues par expression à froid. Ces dernières se conservent à 3°C ou 4°C, autrement il apparaît un dépôt dans ces huiles (**Sallé, 1991**).

I.2.9. Les huiles essentielles et les bactéries

Il est souvent nécessaire de contrôler la multiplication des bactéries afin de prévenir ou traiter les maladies infectieuses, ou pour limiter la croissance de microorganismes indésirables responsables par exemple de la dégradation d'aliments ou de produits industriels (**Arnie et française, 2001**). Les chercheurs étudient toujours de nouvelles substances antimicrobiennes, parmi elles les HE qui ont fait l'objet de plusieurs recherches.

Deans et Ritchie (1987), dans leur étude sur l'effet de 50 HE de plantes sur 25 genres de bactéries, indiquent qu'elles inhibent au moins un genre bactérien. Les neuf HE qui ont manifesté les propriétés inhibitrices sur plus de 20 genres de bactéries testées sont celles de l'angélique, du laurier, de la cannelle, du clou de girofle, du thym, de l'amande amère, de la marjolaine, du piment et du géranium.

Cette étude, ainsi que beaucoup d'autres, comme celles de **Canillac et Mourey (1996)**, **Morris et al. (1997)**, confirment les propriétés antibactériennes de certaines HE. Ce pendant, les HE sont souvent des mélanges complexes de différents composés, dont certains sont dotés de propriétés

antimicrobiennes. Il est donc important de séparer et d'identifier les composants actifs présents dans une huile possédant des pouvoirs inhibiteurs. En effet, **Katayama et Nagai (1960)** ; **Knoblock et al. (1989)** ; **Adam et al. (1998)** et **Inouye et al. (2001)**, ont démontré que différents constituants des HE possèdent des activités antimicrobiennes. Ces composants sont classés selon leur degré d'inhibition.

- **Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les cellules microbiennes**

Les mécanismes d'action des produits antimicrobiens autre que les antibiotiques restent encore généralement peu connus. L'intérêt de leur étude est apparu particulièrement avec la mise en évidence accrue des souches résistantes aux antiseptiques (**Flurette et al., 1995**).

Selon leur nature et la concentration utilisée, les HE peuvent avoir une ou plusieurs cibles. Mais dans la majeure partie des cas, l'accès à la cible nécessite le franchissement de la paroi cellulaire qui est un obstacle à la fois physique et chimique. **Salton (1968)** a décrit les étapes de l'action des agents antimicrobiens :

- Adsorption sur la cellule suivie de la pénétration dans la paroi.
- Réactions complexes avec la membrane cytoplasmique conduisant à sa désorganisation,
- Sortie des composants de faible poids moléculaire du cytoplasme,
- Lyse de la paroi causée par des enzymes autolytiques.

I.2.10. caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles

Les HE ne sont pas des huiles grasses, leurs composants volatils ne tachent pas le papier, leur rapidité et leur puissance d'effet, l'étendue du champ thérapeutique contrôlé et surtout leurs actions électromagnétiques et vibratoires sont autant de paramètres actifs et étonnants qui fondent leur particularité (**Grosjean, 2007**).

Les HE sont généralement liquides à la température ambiante, d'odeurs aromatiques, rarement colorées, quand elles sont fraîches. Leur densité est plus souvent inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et le plus souvent sont dotées d'un pouvoir rotatoire. Elles sont

volatiles et entraînaibles par la vapeur d'eau. Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, elles fixent la plupart de solvants organiques (**Guenther, 1975**).

I.2.11. Caractéristiques organoleptiques

Bruneton, (1999) cite les principales caractéristiques organoleptiques des HE :

- **L'aspect**

L'aspect d'une HE dépend des produits qui la constituent. Il peut apparaître sous forme solide, liquide.

- **L'odeur**

L'odeur est un sens chimique très sensible de plus d'après la nature; une substance pour être sentie doit être volatile.

- **La couleur**

Les HE sont généralement incolores et peuvent peu à peu prendre une coloration jaune plus ou moins foncée avec quelques exception : jaune rougeâtre (Cannelle), vert (Absinthe), bleu (Camomille).

I.2.12. méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'obtention des HE fait appel à deux méthodes générales :

-Soit l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation.

-Soit l'expression à froid des écorces ou zestes de fruits de citrus (**Garnéro, 1991**).

La technique à employer devrait être choisie selon les caractéristiques d'HE (**Crespo et al., 1991**).

I.2.12.1.Hydrodistillation

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé; dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité (**Bruneton, 1999**).

1.2.12.2. L'entraînement à la vapeur d'eau

La plante est placée sur une grille perforée au-dessus de la base d'alambic, et n'est pas en contact avec l'eau (**Belaiche, 1979**). Les particules de vapeur d'eau, se dirigeant vers le haut, font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite à travers un récipient réfrigérant ou la température diminue, provoquant le déclenchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condensent. L'huile et l'eau se séparent du fait de leur poids spécifique différent (**Padrini et Lucheroni, 1997**).

I.2.12.3. Hydrodistillation par micro-onde sous vide

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement micro-onde, dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : l'HE est traité (sans ajout d'eau pour les produits traités en frais). Très rapide et peu consommateur d'énergie, le procédé livre un produit qui, le plus souvent est de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (**Bruneton, 2009**).

I.2.12.4. Extraction par solvant

Cette technique utilisera des solvants comme l'hexane, le toluène, les dérivés chlorés. Le solvant est ensuite éliminé par distillation. Elle ne doit pas être employée, si l'on veut préparer un HE à usage thérapeutique car il pourrait rester des traces de solvant.

II. Les produits cosmétiques

II.1. Définition

Plusieurs définitions ont vu le jour depuis la loi française de 1975. La définition inscrite à la 7^{ème} directive cosmétique européenne du 27 Février 2003, définit les produits cosmétiques comme : «On entend par produit cosmétique toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain (épiderme, systèmes pileux et capillaires, ongles, lèvres et organe génitaux externes) ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, et/ou de corriger les odeurs corporelles, et/ou de les protéger ou les maintenir en bon état» (**Martini, 2008**).

II.2. Classification

Selon **Lacharme (2011)**, la première classification a été établie en 1990 et reste la plus utilisée. Les produits cosmétiques définis par les différentes législations ont des fonctions spécifiques et peuvent être regroupés en trois catégories:

- ❖ **Les produits d'hygiène** : dont le but est de nettoyer la peau et ses annexes, les dents et les muqueuses (shampooings, savons.....etc.).
- ❖ **Les produits de parure** : permettent les modifications de l'aspect de la peau, on retrouve dans ce groupe les produits de maquillage, les teintures capillaires....etc.
- ❖ **Les produits de soins** : ils ont pour fonctions de protéger la peau, les phanères et d'en corriger certaines altérations considérées comme non pathologiques, Exemples : formulations hydratantes, protectrices, antisolaireetc.

II.3. Composition des produits cosmétiques

Selon **Thiers (1986)**, les produits cosmétiques sont, en général, composés de :

- A.** *Les molécules insolubles et inertes chimiquement* : elles sont incorporées à des poudres, des fards, des crèmes et dentifrices. Leur caractère essentiel est l'insolubilité dans l'excipient, qu'elles soient organiques (les laques) ou minérales (oxyde de zinc).
- B.** *Les molécules hydrophobes* : elles peuvent se solubiliser l'une dans l'autre sous des conditions précises. On peut les disperser et de façon stable dans leur ennemie naturelle, l'eau. Parmi ses molécules nous pouvons citer:
 - Les carbures d'hydrogène : qualifiés à tort d'huile ou graisse sous prétexte qu'ils sont onctueux au doigt. Exemple : vaseline, paraffine, liquide ou solide.
 - Les diglycérides : les graisses animales ou végétales sont des esters de glycérol et d'acide gras saturés ou non, telles que : les huiles végétales naturelles et les cérides.
- C.** *Les molécules hydrophiles* : hydrosolubles, ces molécules permettent d'incorporer dans l'eau une molécule hydrophobe. Exemple : La lanoline.
- D.** *L'eau* : presque toujours présente, mais elle est coûteuse et difficile à obtenir car elle doit être chimiquement pure et stérile, elle ne doit pas être confondu avec l'eau potable.
- E.** *Les molécules assurant la stabilité de l'émulsion* : cette stabilité est assurée par l'intermédiaire d'une énergie mécanique. Exemple :

*Les tensioactifs : seuls un petit nombre est toléré par les téguments et par la conjonctive oculaire.

*Les colloïdes protecteurs dont la viscosité stabilise l'émulsion : naturels (gommes, alginates) ou de synthèse (Dérivés de cellulose).

*Les humectant stabilisant la teneur en eau du produit, quelque soit l'hygrométrie des milieux cosmétiques et atmosphériques : glycérol...etc.

F. Les antioxydants: naturels ou de synthèse.

G. Les conservateurs antimicrobiens:ils empêchent la contamination microbienne ou mycélienne du produit cosmétique pendant sa fabrication ou à la cour de son usage.

H. Les colorants: ils posent toujours des problèmes de haute technicité et révèlent d'une véritable spécialisation.

I. Les molécules odoriférantes: toujours complexes parfois dangereuses.

J. L'excipient: un cosmétique intervient par son excipient que ses qualités distinguent de l'excipient pharmaceutique.

II.4. Déodorants et anti transpirants

Ces produits, répandus dans tous les circuits de distributions, ont pour but soit seulement de supprimer les odeurs corporelles, soit d'empêcher une trop forte sécrétion des glandes sudorales.

Les odeurs corporelles proviennent principalement de la décomposition de la sueur apocrine et secondairement eccrine. La décomposition de la sueur est due à la présence sur la peau de microorganismes tels que *Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, avec formation d'acides gras à chaîne courte, acides valérianique, caprylique, caprique. Le film hydrolipidique se décompose également et les composants responsables de l'odeur sont principalement ceux du sébum, le cholestérol et les esters de cholestérol (Martini, 2006).

II.4.1. Définition d'un anti-transpirant

D'après Martini (2006), les antitranspirants, appelés aussi antisudoraux ou antiperspirants, sont destinés à supprimer ou à limiter la production excessive de sueur axillaire et palmoplantaire. Il existe plusieurs types d'anti transpirants à savoir les sticks et les «Roll-on».

✓ Le « Roll-on »

Il est composé principalement par des solutions d'ACH qui sont souvent hydro alcooliques et peuvent atteindre des concentrations élevées, de 20 à 25%. Elles sont conditionnées en flacons munis d'une large bille ou « **Roll-on** » qui dispense, lors du frottement sur la peau, la quantité désirée. Le produit est irritant et l'on recommande de ne l'appliquer que pendant trois ou quatre jours consécutifs suivis d'une interruption de plusieurs jours ou de ne l'appliquer qu'un jour sur deux. Il est déconseillé aux peaux fragiles, aux peaux sensibles ou réactives, aux sujets ayant eu des antécédents de dermatite atopique (**Martini, 2006**).

II.5. Contrôle microbiologique d'un produit cosmétique

La propreté microbiologique d'un produit cosmétique est assurée d'abord par l'application des bornes pratiques de fabrication (propreté des matières premières, du matériel, des locaux, et du personnel) et par la présence des conservateurs (**Martini, 2008**).

Pour les produits cosmétiques et les autres produits topiques, la détection de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* peut être justifiée car ceux-ci peuvent engendrer des infections cutanées ou oculaires. La recherche d'autres sortes de microorganismes peut aussi présenter un intérêt car ceux-ci (y compris des indicateurs de contamination fécale, par exemple : *Escherichia coli*) laissent penser à une défaillance de l'hygiène au cours du processus de fabrication (**Martini, 2008**).

Selon le même auteur, le contrôle concerne en une numération des germes éventuellement présents dans le produit et en une recherche des germes dits pathogènes. Le produit cosmétique ne doit pas renfermer de germes pathogènes, tels que : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*.

II.5. 1. L'agent conservateur

La présence des conservateurs est indispensable dans la plus part des produits cosmétiques (**Martini et Seiller, 2006**). La directive européenne cosmétique entend par agents conservateurs « les substances qui sont ajoutées comme ingrédient à des produits cosmétiques principalement pour inhiber le développement de microorganismes dans ces produits ».

Toutefois, certains **conservateurs synthétiques** se sont avérés nocifs pour la santé publique comme :

- Le formol, formaldéhyde ou les libérateurs de formaldéhyde, reconnus comme allergisants, modificateurs de protéines et de l'ADN.
- Les conservateurs trop puissants comme le Triclosan qui détruisent la flore naturelle protectrice de la peau (**Demange et Serrano, 2007**).

II.6. La cosmétique bio

Ce que l'on appelle communément les « cosmétiques bio » regroupent une grande famille de produits de beauté dont le principal point commun est la composition à base d'un maximum d'ingrédients naturels, ainsi que, le refus d'utiliser des matières synthétiques nocives ou non biodégradables et les ingrédients obtenus par des procédés chimiques lourds (**Demange et Serrano, 2007**).

II.6.1. Les conservateurs naturels

La cosmétique bio cumule, différentes techniques pour optimiser la conservation des produits de manière naturelle, sans ajout de conservateurs. Les huiles végétales se conservent bien à l'abri de l'air et de la lumière, tandis que les HE possèdent des propriétés antibactériennes (**Demange et Serrano, 2007**).

Le pouvoir des principes actifs naturels incorporés aux «cosmétiques bio» se cumule donc avec ceux contenus dans la base et renforcent l'action générale du produit. Dans un produit de cosmétique bio, tous les ingrédients sont actifs et agissent en synergie. Par exemple, les huiles essentielles ont à la fois un pouvoir parfumant, des propriétés de conservation et une action sur la peau (**Demange et Serrano, 2007**).

II.6.2. Conservation des produits finis contenant les huiles essentielles

Tous les produits de soins à base d'huiles végétales et d'huiles essentielles comme les huiles antirides, les huiles et les beurres de massage, se conservent naturellement dans des bouteilles de verre teintées. Ce mode de conditionnement est fréquemment utilisées en cosmétique bio, les crèmes hydratantes contiennent une part importante d'eau et sont donc plus difficile à conserver (**Demange et Serrano, 2007**).

II.7. Les principales difficultés rencontrées avec la vente de produits cosmétiques bio

Parmi les difficultés rencontrées lors de la mise sur le marché de produits cosmétiques bio nous pouvons citer, selon **Lacharme(2011)**:

- ❖ L'odeur des produits cosmétiques bio n'est pas toujours agréable.
- ❖ La texture des produits n'est pas habituelle: mauvaise pénétration, effet gras sur la peau etc.
- ❖ Les prix trop élevés pour certaines gammes.
- ❖ La période après ouverture est trop courte.

III. Etude des plantes

III.1.Géranium rosat

III.1.1.Généralité

Les géraniums rosat *Pelargoniums sp*, originaires d'Afrique australe où ils sont indigènes. Les géraniums (*Pelargoniums*) ont été importés en Europe vers 1690 et y sont communément répandus de nos jours comme plante d'ornement. Le genre *Pelargonium* comprend plus de deux cents espèces, mais cinq ou six variétés seulement sont exploitées pour la production des HE. On regroupe sous le nom générique de « Géranium rosat » le *Pelargonium graveolens*, le *P.roseum*, le *P.odoratissimum*, *P. capitatum* et le *P. radula*, cultivés à grande échelle au Congo, à la Réunion, à Madagascar, en Egypte, et dans les régions méditerranéennes (**Bardeau,2009**).

En provenance d'Algérie, de Madagascar, d'Afrique du sud ou de Nouvelle Guinée, les *Pelargoniums* ont évolué régulièrement en Occident (**Fuinel, 2002**).

III.1.2.Description botanique

Le géranium est une plante pérenne vivace qui peut atteindre une hauteur de 90 cm et dont les tiges recouvertes de poils, forment des feuilles vertes découpées et dentelées. C'est avant la fleuraison qu'on récolte les tiges feuillées pour distiller sur place et obtenir une essence huileuse, appelée traditionnellement essence de rosat. Les rameaux se lignifient au bout de 5 à 6 mois. Les fleurs sont roses claires (fig1) tirant au mauve (**Nyabyenda., 2006**).

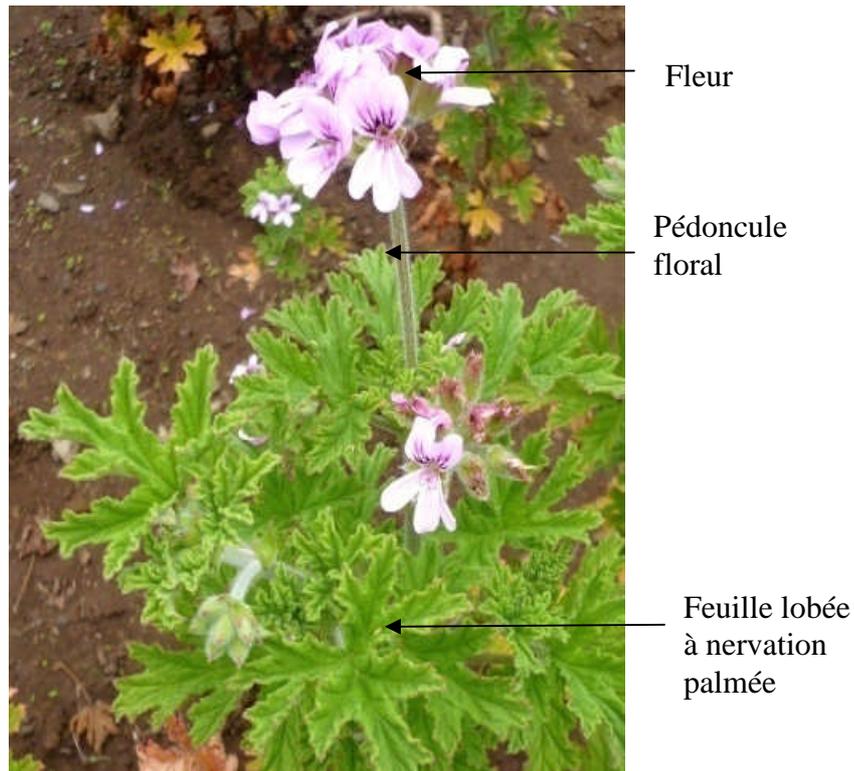


Figure 1 : Aspects morphologiques de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L) (photo originale, 2013).

III.1.3. Taxonomie et classification de Géranium rosat

Le Géraniaceae c'est une famille de Dicotylédones Dialypétales renfermant 3 genres regroupant 750 espèces herbacées ou arbustives. [Demarne, (1985) ; Judd et al, (2002)

Demarne (1989)]. Dans la famille des géraniacées, on distingue le *geranium*, qui compte 375 espèces, le *Pelargonium* avec 220 espèces et l'*Erodium* comprenant seulement une centaine d'espèces.

Ces 3 genres possèdent une caractéristique commune au niveau du fruit, dont la forme est comparable à de longs becs d'oiseau. Une autre différence entre ces 3 genres réside dans le nombre d'anthères : 5 pour *Erodium*, 7 pour *Pelargonium* et 10 pour *Geranium* (Fuinel, 2002).

D'après Fuinel (2002), le géranium est classé comme suit :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Dialypétales

Ordre : Geraniales

Famille : Geraniaceae

Genre : *Pelargonium*

Espèce : *Pelargonium graveolens*

III.1.4. Synonymes et noms vernaculaires

Selon **Seidemann (2005)**, plusieurs appellations sont attribuées au géranium rosat. Nous citerons quelques unes :

- En français : Géranium rosat, géranium odorant,
- anglais: Attar of rose, rose-scented geranium, scented pelargonium, rose geranium
- En arabe : حشيشة العطر، عطر الورد، العطرشة

III.1.5. Origine et répartition

Le Géranium rosat est originaire du cap de Bonne-Espérance, il a été introduit en Europe en 1690, il est très répandu dans les jardins. On le cultive en Algérie et en Provence, mais il ne supporte pas toujours les hivers à grasse. En Algérie, il a acquit des proportions gigantesques. Les principaux producteurs d'essence de géranium sont la Chine, l'Egypte, le Maroc, les autres producteurs importants sont l'Algérie, l'Inde et certains pays de CEI (**Anonyme, 2002**)

III.1.6. Ecologie

Le Géranium se multiplie par semis ou par bouturage. Il doit être cultivé sur un terrain profond et sain (**Gustave, 1800**). Il supporte peu les températures inférieures à 3°C, bien qu'il soit cultivé sur les hauteurs dans certaines régions. Des précipitations de l'ordre de 1000 à 1500 mm d'eau par an, sont recommandées, cette plante à parfum s'adapte à tous les types de sols pourvus qu'ils soient perméables et correctement drainés [(**Charabot, (1913)** ; **Halpern, (2006)** ; **Nyabyenda, (2006)** ; **Benini, (2007)**].

III.1.7. Récolte

La récolte des pousses se fait à plusieurs reprises. En Algérie, on pratique ordinairement la première coupe en Juin. On doit livrer les tiges et les feuilles aux distilleries aussitôt qu'elles ont été récoltées. Chaque pied y fournit en moyenne 1kg de feuilles, et 1 hectare, produit environ 40000kg (**Gustave, 1800**).

III.1.8. Huile essentielle du Géranium rosat

L'huile ou essence de géranium est obtenue par distillation à la vapeur d'eau, à partir des feuilles, des tiges, des fleurs et des pousses fraîches (**Nyabyenda, 2006**). La feuille desséchée rend moins d'essence que la feuille, fraîche, mais l'huile essentielle qu'elle fournit est de qualité supérieure (**Gustave, 1800**).

Selon **Demarne (1992) et Bardeau (2009)**, Les teneurs en HE sont très faibles, de l'ordre de 0,15 à 0,2%. Cependant, ce taux diminue encore plus, durant la saison des pluies, et que le rendement est variable selon les variétés, le climat et la nature des sols.

III.1.9. propriétés thérapeutiques

Selon **Bardeau (2009) et Nyabyenda(2006)**, les HE de géranium rosat sont très employées en parfumerie. Quelques applications en cosmétologie et en pharmacie. L'huile essentielle de géranium rosat est tonique, astringente, hémostatique, cicatrisante et antispasmodique, antiseptique, anti-inflammatoire, antibactérien efficace, fongicide puissant. Employée avec succès dans la cicatrisation des plaies, coupures, brûlures, ulcération et lésions diverses, elle donne aussi de bons résultats dans le traitement des eczémas, engelures, dartres, pédiculose ophtalmies, dermatoses, ainsi que pour calmer le prurit et l'inflammation des hémorroïdes.

III.2. Romarin

III.2.1. Généralité

Le romarin du latin *Rosmarinus officinalis* L, signifiant «<ros de mer>> était considéré comme plante sacrée.

Le romarin est répandu en Espagne, en Italie, sur la côte Atlantique et en Algérie du nord. En Algérie : c'est l'une des plantes les plus populaires, on la trouve dans plusieurs régions. Le romarin affectionne les sols calcaires marneux, accompagnés d'espèces caractéristiques de la forêt de pin d'alep. Exigeant une forte luminosité, des hivers doux et des étés secs, il ne craint pas la sécheresse, mais redoute le gel et le froid (**Boudjada, 1996**).

III.1.2. Description botanique

Rosmarinus officinalis L est un arbuste très odorant et bien ramifié, pouvant atteindre 2m de hauteur. Ses feuilles sont nombreuses, dures, étroites, linéaires et mesurent jusqu'à 3 cm de long. Elles sont gaufrées, verdâtres au dessus, plus ou moins hispides et blanchâtres en dessous. Ses fleurs longues de 1 à 3 cm, sont disposées en épis court et serrés partant de l'aisselle des feuilles (**fig2**). Elles présentent un calice en cloche, bilabié à corolle tubuleuse de 2 cm de long de couleur blanchâtres, ou bleu variable [**Gubb, (1913) ; Battandier et Trabut, (1988)**]



Figure 2. : Aspects morphologiques de *Rosmarinus officinalis* L (photo originale, 2013).

III.2.3. Taxonomie et classification du romarin

La classification botanique complète du genre *Rosmarinus* L. n'était achevée qu'au début du 20^{ème} siècle en raison de l'extrême variabilité des espèces. L'une des plus importantes de la flore d'Algérie, compte plus de 200 genres et 3500 espèces (**Boelens, 1985**).

Trois espèces du genre *Rosmarinus* L. ont été décrites : *Rosmarinus officinalis* L., *Rosmarinus eriocalyx* et *Rosmarinus tomentosus* (**Quezel et Santa, 1963**).

Selon **Quezel et Santa. (1963)**, le romarin est classé comme suit:

Règne : Plantae.

Embranchement : Spermaphytes.

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones.

Sous-classe : Dialypétales.

Ordre : Lamiales (labiales).

Famille : Lamiaceae.

Genre : *Rosmarinus*.

Espèce : *Rosmarinus officinalis*L.

III.2.4. Synonymes et noms vernaculaires

Le nom scientifique *Rosmarinus officinalis* L vient du latin. Il a plusieurs noms vernaculaires : Rose marine, encensier, herbe aux couronnes, herbes des troubadours. Les grecs l'appelaient la fleur par excellence (**Mességué, 1983**).

Selon **Beloued(2001)** plusieurs appellations sont attribuées au *Rosmarinus officinalis* L :

Les noms arabes : klil, Hatssa, Loubon, hassalban.

Les noms berbères : Iazir, Aziir, Ouzbir, Touzala.

III.2.5. Origine et répartition

Il est originaire du sud de l'Europe notamment des régions de la mer Méditerranée, l'Espagne, le sud de la France, l'Italie, la Grèce (**Teuscher et al., 2005**). Le romarin est commun dans toute l'Algérie jusqu'au Sahara, sur les collines arides des garrigues, non loin de la mer et dans les forêts claires (**Beloued, 2001**).

Le romarin est cultivé à large échelle en Espagne, en Tunisie, en Maroc, en Italie, en France, et au Portugal, principalement pour en extraire de l'EH. En Inde, la CIMAP (Central Institute of medicinal and Aromatic plants) a introduit le romarin à la fin des années 80, qui s'est développée au cours des années 90. Cette production est concentrée dans le sud, dans les Nilgiri et autour de Bangalore (**Baba Aissa, 2011**).

III.2.6. Ecologie

La plante est exigeante en intensité lumineuse, elle préfère les hivers doux et convient aux étés secs. Elle ne craint pas la sécheresse mais, elle redoute la gelée et le froid. Il est préconisé de la planter dans des endroits protégés du vent et sur un sol perméable. A partir du mois d'Août les arrosages sont réduits, ils permettent de maintenir seulement la motte humide. Le pH idéal pour le romarin serait entre 6 et 7,5. Elle préfère le sol calcaire marneux et les terrains arides. Sa multiplication se fait par semis, ou par bouturage à partir de pousses peu ligneuses [**Norbet, (1983) ; Boudjada, (1996)**].

III.2.7. Récolte

Pour la production destinée à l'herboristerie ou à l'industrie alimentaire, la récolte intervient au printemps (avril-mai) avant la floraison, plus exceptionnellement à l'automne en raison de la sécheresse de l'été. Pour la production des pousses fraîches, la récolte peut se réaliser toute l'année, en fonction des impératifs commerciaux (**Péron, 2006**).

III.2.8. Divers usages de romarin

Le *Rosmarinus officinalis* possède des propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, anti-tumorale et antihépatotoxiques. L'activité antioxydante est liée aux composés phénoliques présents dans le romarin (acide carnosique et carnosol, diterpènes abietanes, acide rosmarinique, ester de l'acide hydroxycinnamique). Ces composés avec d'autres isoprenoides (stérols, isoprène, mono- et diterpènes, tocophérols ou caroténoïdes) jouent le rôle de protection ; ils sont considérés comme constituants bioactifs (**Touafek, 2010**).

Le romarin a aussi des propriétés sur les fonctions digestives, il les facilite, en particulier l'activité de la vésicule biliaire. C'est aussi un antispasmodique et il a des propriétés stimulant le

système nerveux. Autrefois il était utilisé en compresse contre les rhumatismes. Il est aussi un excellente mellifère, condimentaire, cholagogue, désinfectant, stimulant, emménagogue, antidépresseur, soulage l'arthrose, aide à la digestion des graisses, antipelliculaire. Il est utilisé aussi comme antiseptique, antifongique, stomachique, carminatif, cholérique, antitussif, antinévralgique, antibactérienne, antimutagenique, tonique, vulnéraire, contre les problèmes circulatoires (en frictions), cicatrisant (sommités fleuries) (**Touafek, 2010**).

L'huile essentielle de romarin est largement utilisée comme composant aromatique dans l'industrie des cosmétiques (savons, parfums, crèmes etc), mais aussi dans l'industrie alimentaire pour boissons alcoolisées, les desserts et les bonbons (**Cuvelier et al., 1996**).

Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

• Lieu et durée de stage

Notre stage pratique s'est étalé sur une période de six mois, de Juin à Novembre 2013. Les différentes expérimentations ont été effectuées au niveau de:

- L'université Saad Dahleb-Blida, département d'Agronomie, au laboratoire de la phytopharmacie des substances naturelles : pour l'extraction des huiles essentielles.
- L'entreprise VENUS SAPCO à Blida : laboratoire de microbiologie et physicochimie, pour l'activité antimicrobienne, les tests physico-chimiques et pour le contrôle microbiologique.
- L'hôpital de Boufarik : laboratoire de bactériologie pour l'évaluation quantitative (CMI).

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Matériel végétal

Nous avons utilisé la partie aérienne fraîche du géranium rosat et du romarin (feuilles) et ce pour l'extraction des essences aromatiques des deux espèces.

Les deux plantes sont récoltées au mois de Juin 2013 (le choix de la récolte est lié à la disponibilité de l'appareillage de l'extraction)

Lieu de récolte

Pour le romarin : la récolte a eu lieu au département d'Agronomie de l'Université Saad Dahleb-Blida.

Le géranium rosat : a été récolté à Boufarik (Ghraba). Elle pousse naturellement.

II.1.2. Microorganismes

Le support microbien utilisé est composé de sept souches de références fournies dans des milieux de conservation (GN) par le laboratoire de bactériologie au niveau de l'hôpital de France-Fanon de Blida et laboratoire de bactériologie de Venus (Tableau 01).

Tableau 01 : Microorganismes testés.

Microorganismes testés	Gram	Souches	Référence	Source
Bactéries	Gram+	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	L.B.F
		<i>Staphylococcus aureus</i>	AT CC 25923	L.B.F
	Gram-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	L.B.F
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	L.B.F
Champignon	Levure	<i>Candidas albicans</i>	ATCC 10231	L.B.V
		<i>Candidas géotrichum</i>	ATCC 10231	L.B.V
	Moisissure	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10231	L.B.V

II.2. Matériel non biologique

II.2.1. Matériel du laboratoire

L'ensemble du matériel de laboratoire utilisé est composé de verreries d'appareillage ; de milieux de culture (annexe 1, 2).

- Verreries et appareillage.
- Milieux de culture.
- Produits chimique.

II.2.2. Le roll-on

Afin de valider l'effet antimicrobien de nos HE, et suivre leur effet conservateur sur la qualité et stabilité d'un produit cosmétique nous avons utilisé un roll-on (**Figure 3**)



Figure 3 : le roll-on (commercialiser par venus)

II.3. Méthodes de travail

Nous avons utilisé la méthode d'entraînement à la vapeur comme méthode d'extraction de l'HE des feuilles de romarin et de géranium rosat, en raison de la présence des cellules sécrétrices exogènes (localisées sur ou à proximité de la surface des feuilles).

Mode opératoire

- Nous avons mis environ 400 g de matière végétale fraîche coupée en petits morceaux dans un perçoir (**fig4**).
- Remplir d'eau distillée dans une cocote minute à environ un litre.
- Le perçoir est déposé au-dessus de l'eau, puis la cocote minute est fermée (sans contact direct avec la matière végétale).
- Chauffer à l'aide d'une plaque chauffante à 300°C pendant 30 min, après ébullition de l'eau en diminue la température jusqu'à 200°C.
- La vapeur d'eau entraîne les constituants volatiles dans le tube principal, pour ensuite se condenser dans un serpentín du réfrigérant qui est rempli d'eau.
- Ouvrir le robinet de la burette graduée pour récupérer l'hydrolat goutte à goutte dans une fiole, l'HE reste dans la burette jusqu'à l'obtention de la quantité maximale ; après 2 heures de temps (**figure 5**).

La conservation des HE se fait à une température de 4°C, à l'abri de la lumière, dans des flacons en verre teinté. En se référant aux normes **AFNOR (2000)**, le rendement en HE est calculé comme suit :



Feuilles de géranium



Feuilles de

Fig 4 : Matière végétale fraîche

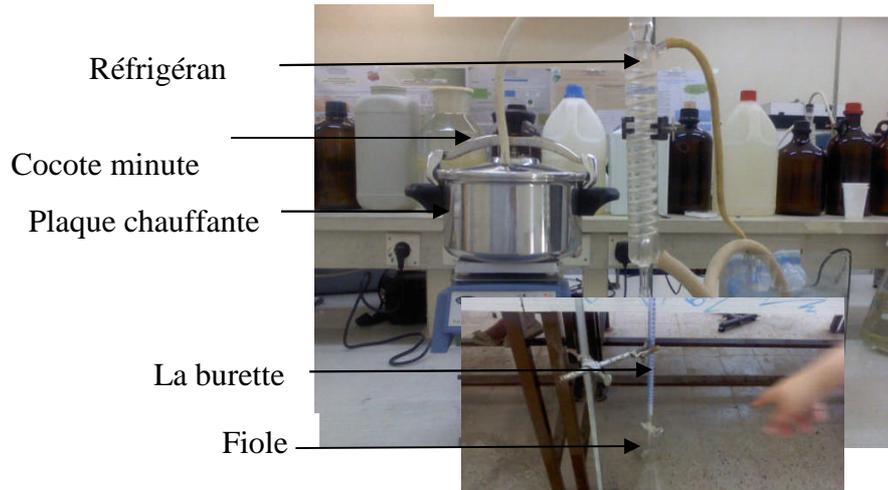


Figure 5: Protocol de l'extraction de l'HE

II.4. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses d'huile essentielle et de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcent (%) et calculé par la formule :

$$R(\%) = M_{HE} / M_{MV} * 100$$

R (%): Rendement en huile essentielle (%)

M_{HE}: Masse de l'huile essentielle (g)

M_{MV}: Masse de la matière végétale utilisée (g)

II.5. caractéristique des huiles essentielles

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur et saveur).
- Déterminer ses indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction...ect).

II.5.1. caractéristiques organoleptiques

Les testes pour les caractères organoleptiques (aspect, couleur et odeur) ont été effectués par un personnel qualifié du laboratoire.

II.5.2 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle

II.5.2.1 Mesure des indices physiques

a-Détermination de la densité

La densité est définie comme étant la masse volumique de l'huile essentielle rapportée à celle de l'eau pour une température donnée. Elle est mesurée à l'aide d'un pycnomètre d'un volume de 10 ml.

b- Détermination de l'indice de réfraction (AFNOR NF T75-112:1999)

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. La mesure a été effectuée en utilisant un refractomètre.

II.5.2.2. Mesure des indices chimiques

a-Détermination de l'indice d'acide (AFNOR NF T 75-103:1999)

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. Les acides libres sont neutralisés par une solution d'hydroxyde de potassium KOH éthanolique. Les différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide. Sont composées de a, b, c (Fig6).

L'indice d'acide (IA) en mg de koh est calculé par la formule suivante :

$$IA = V * 5,61 / P$$

IA : indice d'acide

V : est le volume, en ml, de solution de KOH utilisé pour le titrage,

P : poids de la prise d'essai en grammes, de l'huile essentielle,

5,61 : nombre de mg de potasse équivalent à 1ml de soude à 0,1N.



a)



b)



c)

Fig 6: Différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide

b- Détermination de l'indice de saponification

C'est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation et à la saponification des esters, présents dans 1g de substance. La figure 7 illustre les différentes étapes de la détermination de l'indice de saponification sont (Fig7).

Mode opératoire et calcul

Dans une fiole de 250ml de verre borosilicate munie d'un réfrigérant à reflux, on introduit la prise d'essai (mg).

On ajoute 25ml d'hydroxyde de potassium alcoolique à 0,1M et quelques billes de verre.

Adaptez le réfrigérant et chauffez à reflux pendant 15 min, sauf indication, ajoutez 2 à 3 gouttes de solution phénophtaléine RI et titrez immédiatement par l'acide chlorhydrique 0,1 M, effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions.

Il est calculé d'après la formule :

$$I_s = 5,61 \left(\frac{\quad}{\quad} \right)$$

V_0 : volume en ml de la solution d'HCL utilisée pour l'essai à blanc.

V_1 : volume en ml de la solution d'HCL utilisée pour la détermination.

m : Masse en g de la prise d'essai.



a)



b)



c)

c- Détermination de l'indice de saponification

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle. L'hydrolyse des esters présents dans l'huile essentielle se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution d'acide chlorhydrique HCl.

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour saponifier les acides gras liés contenus dans un gramme de corps gras.

Ce paramètre est donné par différence entre l'indice de saponification et l'indice d'acide

L'indice d'ester (IE) est donné par la formule suivante :

$$IE = IS - IA$$

$$IS = (V_0 - V_1) \cdot 28 / P$$

IE : Indice d'ester ;

IS : Indice de saponification

V₀ : est le volume, ml, de la solution titré de HCl utilisé pour doser l'essai à blanc ;

V₁ : est le volume, ml, de la solution titré de HCl utilisé pour doser la prise d'essai ;

P : est la masse, en grammes, de l'huile essentielle ;

IA : est la valeur de l'indice d'acide déterminé selon la norme NF T 75-103

28 : poids KOH mortalité

II.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'évaluation qualitative et quantitative de l'activité antimicrobienne de nos HE, nous avons utilisé respectivement la méthode de l'aromatogramme et la méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Pharmacopée Européenne, 2008**).

II.6.1. Evaluation qualitative (l'aromatogramme)

1) Principe

Cette méthode (Fig8) consiste à déposer un disque imbibé d'HE sur la surface du milieu gélosé préalablement inoculé, puis de mesurer la zone d'inhibition après incubation. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible, plus il est petit, plus la bactérie est résistante (**Fauchère et Avril, 2002**).

2) Mode opératoire

Dans cette méthode, nous utilisons des disques de 9 mm de diamètre, imprégné d'une quantité de 20 µl d'HE (environ 0,02g). Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne (bactérie ou levure).

L'étude du pouvoir antibactérien et antifongique par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques. (**Fauchère et Avril, 2002**).

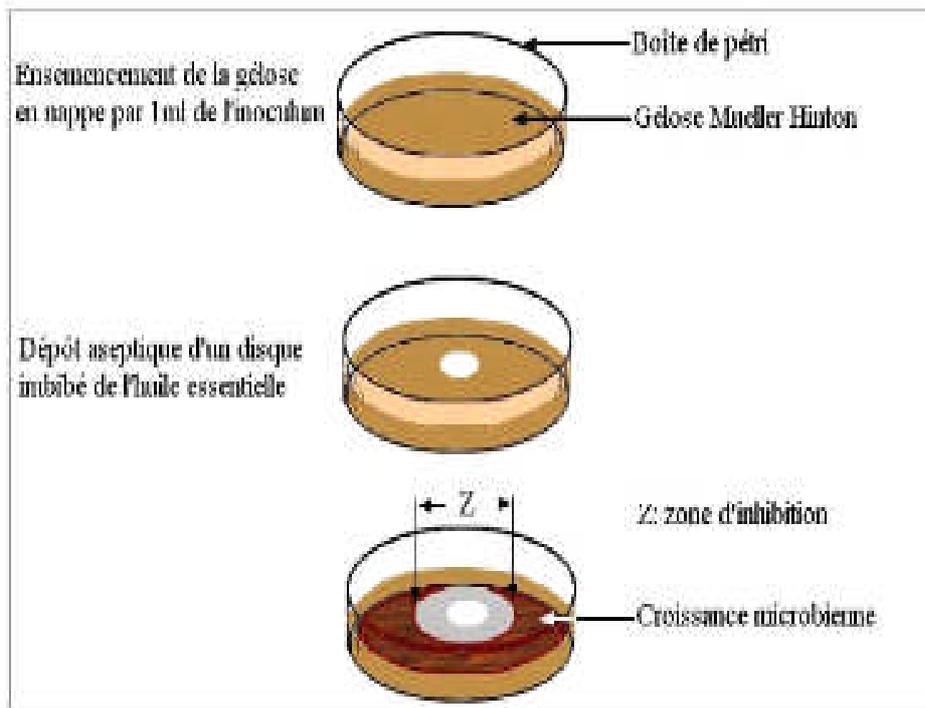


Figure 8 : la méthode d'aromatogramme sur boîte de Pétrie (Pibiri, 2006)

a. Revivification et repiquage des germes

La revivification des souches microbiennes est réalisée par la méthode de stries sur gélose nutritive pour les bactéries et sur milieu sabouraud (annexe 3) pour les levures et moisissures. Les cultures sont incubées à l'étuve à 37°C, pendant 24 heures pour les bactéries et pendant 48h à 25°C pour les levures et les moisissures. Les souches obtenues sont repiquées dans des boîtes de Pétri renfermant le milieu MH (bactéries) et Sabouraud (levures et moisissures) puis incubées.

b. Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure et jeune de germes (bactéries, levure) à tester sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une pipette pasteur, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Agiter la suspension microbienne (bien homogénéiser) à l'aide d'un agitateur. Son opacité doit être équivalente à 0,5Mc pour les bactéries et 1,5Mc pour les champignons (mesurer à l'aide d'un Mc Farland densitomètre).
- Ajuster l'inoculum, soit en ajoutant quelques colonies, s'il est trop faible ou l'eau physiologique stérile, s'il est trop fort.

c. ensemencement

- Les milieux des cultures utilisées sont : Muller-Hinton (M-H) pour les bactéries, et Sabouraud pour les champignons.

-Tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne.

- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

-Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sécher de haut en bas, en stries serrées, répéter l'opération quatre fois, en tournant la boîte de Pétri de 45° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

d. Incubation et lecture

- L'incubation est faite dans une étuve à 35°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C durant 48 h pour les levures.
- Observer l'absence ou la présence de zone claire autour des disques.
- Mesurer le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'une règle.
- Le diamètre des zones d'inhibition (ZI), nous permet d'estimer la résistance ou la sensibilité des différents germes testés par l'HE, pour classer les germes nous avons utilisé les normes (Tableau2) établies par **Ponce et al. (2003)**.

Tableau 02 : les diamètres d'inhibition et leurs degrés de sensibilités

Diamètre d'inhibition	Degré de sensibilité
Inferieur à 8 mm	non sensible ou résistante -
Entre 9-14 mm	sensible +
Entre 15-19mm	très sensible ++
Supérieur à 20	extrêmement sensible +++

(Ponce et al., 2003)

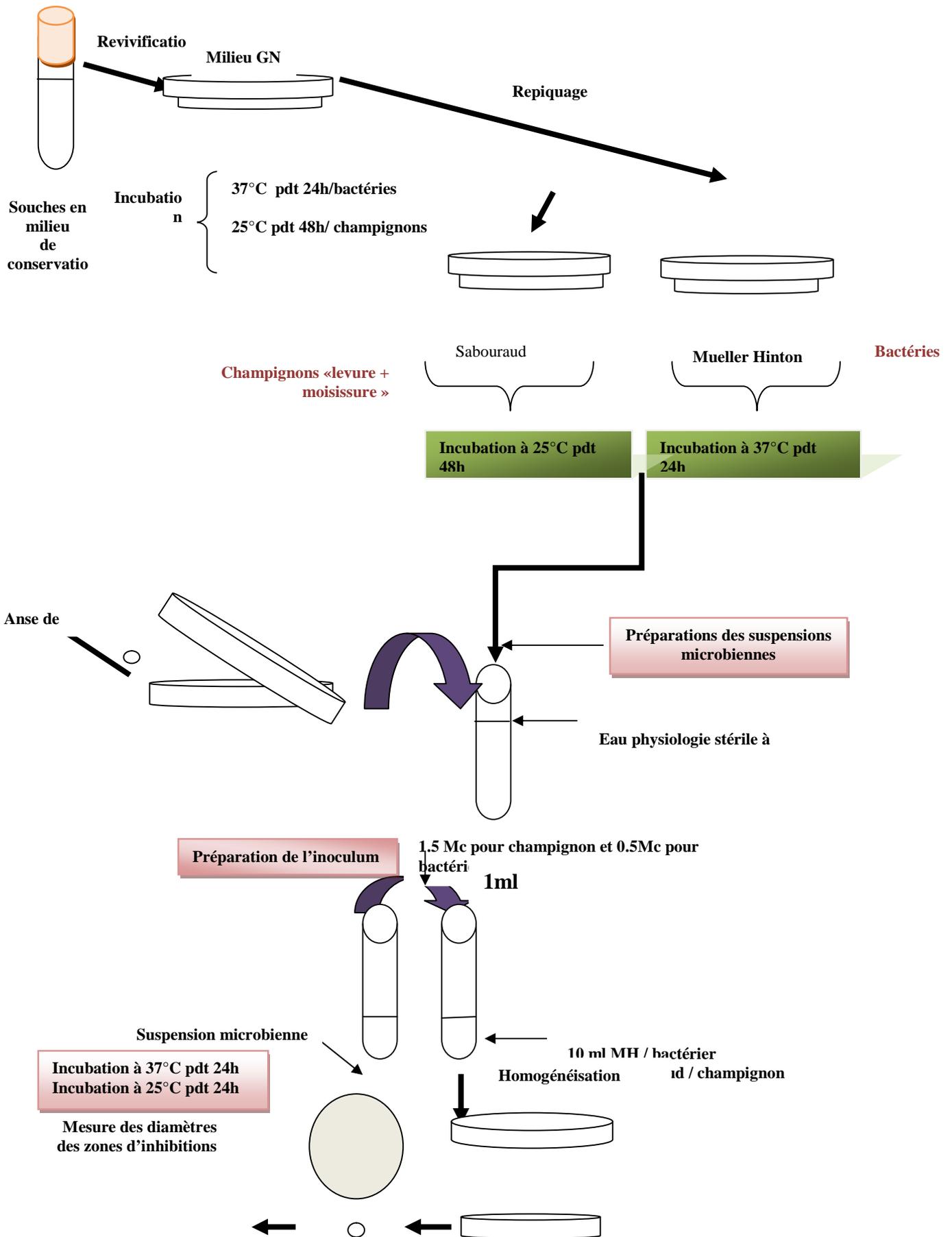


Fig.9: les différentes étapes de l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

II.6.2.évaluation quantitative : concentration minimale inhibitrice (CMI) :

II.6.2.Evaluation quantitative (CMI)

Le but de la concentration minimale inhibitrice consiste à déterminer la plus faible concentration de l'HE inhibant la croissance des germes.

1) Principe

La CMI représente les différents degrés d'inhibition de notre HE se fait par inoculation de milieux de culture qui contient différentes concentrations d'HE. (Hammer et al., 1999)

2) Mode opératoire

Du fait de la non miscibilité des HE dans la gélose, l'incubation d'un dispersant (Tween 80) a été nécessaire pour la réalisation de cette étude. De même que nos essais ont révélé que ce tensio-actif n'exerce aucune inhibition sur la croissance des germes testés.

a)Préparation de suspension microbienne

Une solution mère d'HE de 20 mg/ml (HE/milieu de culture) (environ 2%) a été préparée:

❖ Pour la CMI des bactéries :

- Mélanger 700 mg d'HE (environ 0.7ml) avec 0.7 ml de tween 80
- Ajouter 20ml de milieu M-H a ce mélange
- Agiter le tout jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène

❖ Pour la CMI des levures :

Le même procédé a été appliqué avec le milieu Sabouraud

Une série de dilution de chaque HE est préparée avec un intervalle de concentration en HE qui varie entre 35 mg/ml (3.5%) à 0.027mg/ml

La réalisation des dilutions se fait comme suit :

-verser la moitié du premier flacon (solution mère) dans une boite pétri.

Ajuster la moitié qui reste avec 10 ml de milieu gélose pour obtenir une dilution de 10 mg/ml.

Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention finale ainsi obtenue correspond à 3.5, 1.75, 0.87, 0.437, 0.218, 0.109, 0.054, et 0.027mg/ml.

La préparation de l'inoculum a été faite de la même manière que l'aromatogramme.

L'ensemencement de la souche microbienne se fait par touche à l'aide d'un écouvillon.

L'incubation se fait dans les mêmes conditions décrites auparavant.

La lecture des résultats se fait à l'œil nu en observant s'il ya l'apparition d'une éventuelle colonie microbienne, en comparaison avec une boîte témoin sans HE.

II.7. Etude de l'effet antimicrobien des deux huiles essentielles dans le « Roll-on »

L'étude de l'effet antimicrobien des HE dans le « Roll-on » doit d'abord garantir la sécurité du consommateur et assurer une bonne qualité hygiénique du produit lors de son utilisation.

Les deux HE ont été rajoutés au « Roll-on » comme conservateur à différentes concentrations (0.4%, 0.9%, 1.5%, 2%). Leur activité antimicrobienne a été testée sur les germes aérobies mésophiles et les levures et moisissures. De plus nous avons estimé cette activité après 5 jours et 38 jours de conservation du produit fini.

❖ Préparation du « Roll-on » fini

- Prendre 8 boîtes stériles et fumées et mettre dans chaque boîte 100g de « Roll-on ».
- Ajouter un volume de l'HE de romarin et de géranium rosat selon les concentrations désiré (0.4%, 0.9%, 1.5%, 2%) dans chaque boîte.
- Conserver ses boîtes à la température ambiante 25°C.

❖ Recherche des germes aérobies mésophiles

- Le test microbiologique a été réalisé dans des conditions d'asepsie sous hotte à flux laminaire.
- Introduire 10ml de chaque boîte (préalablement préparée) dans des flacons stériles (Fig10)
- Ajouter à chaque flacon 90 ml de bouillon de neutralisation (D/E) servant à la neutralisation des désinfectants. Bien homogénéiser le mélange.
- À partir de chaque flacon préparé, prélever 1ml et l'introduire dans une boîte de Pétri.
- Un volume de 10 à 15ml du milieu PCA porté à une température de 25°C est ajouté à chaque boîte.

- Faire des mouvements circulaires pour une bonne dispersion du mélange avec le milieu PCA.
- Les boîtes sont incubées après solidification à $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ au minimum 48 heures.
- Un témoin ne contenant pas le produit à analyser est inclut, tout développement microbien sur le témoin rend le test non valable.

Lecture

L'apparition de colonie correspond à une contamination du produit « Roll-on ».

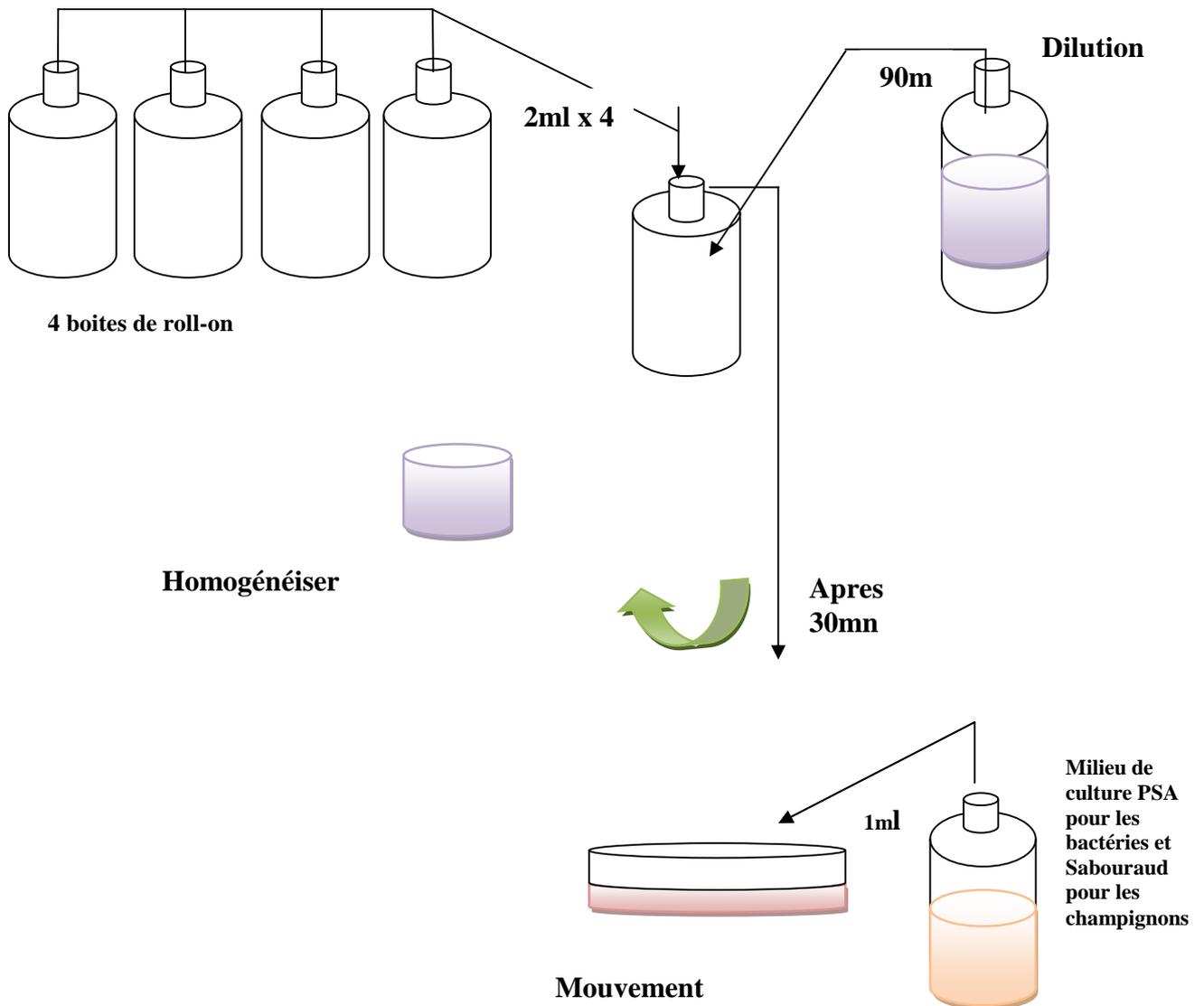
❖ Recherche des levures et moisissures

La même procédure a été appliquée pour la recherche des levures et moisissures, sauf que c'est le milieu Sabouraud qui a été utilisé au lieu du milieu PCA.

-Les boîtes sont incubées après solidification à 25°C , pendant 05 jours.

Un témoin ne contenant pas le produit à analyser est inclut, tout développement microbien sur le témoin rend le test non valable.

Lecture L'apparition de colonie correspond à une contamination du produit « Roll-on ».



Après 15 min incubation à 37°C pendant 3 jours pour les bactéries et à 25°C pendant 5 jours pour les champignons.

Figure 10 : Contrôle microbiologique des « Roll-on »

II.8. Contrôle physicochimique et organoleptique du « Roll-on » après un mois de conservation

Afin de déterminer la qualité du produit suite à l'utilisation des H.E nous avons calculé sa densité relative à 20 °C (d 20) ainsi que son pH. L'aspect organoleptique (odeur, consistance et couleur) a été également noté.

II.8.1. Détermination de la densité relative à 20 °C (d 20) : (AFNOR, 2000)

Principe

C'est le rapport de la masse d'un volume de « Roll-on » à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C.

Mode opératoire et calcul

- Remplir un pycnomètre avec l'eau distillé à 20°C.
- Peser le pycnomètre, muni de son bouchon
- Vider le pycnomètre, puis le rincer et le sécher
- Effectuer les mêmes opérations, en remplaçant l'eau par le « Roll-on ».

La densité relative, est donnée par la formule suivante :

$$D20 = (M_{\text{produit}}/M_{\text{eau}}) + (0.00073 \times (T_{\text{échant}} - 20)).$$

M : masse en gramme. ($M_{\text{eau}}=23\text{g}$)

$T_{\text{échant}}$: température en °C=20°

II.8.2. Mesure du potentiel d'Hydrogène (pH)

Cette mesure est effectuée à l'aide d'un pH mètre.

- **Principe**

La mesure du pH d'une solution s'appuie sur la mesure du potentiel d'une électrode à hydrogène plongée dans la solution, cette mesure s'effectue à l'aide d'un pH mètre (la norme algérienne (NA) 367,1990)

- **Mode opératoire**

Selon NA 376, 1990, la mesure se fait de la manière suivante :

- Etalonner le PH- mètre avec deux solutions tampon, la première à PH=4, et la deuxième PH=7.

- Une fois l'appareil est étalonné, on rince les électrodes à l'eau distillée ou par la solution d'essai.
- Verser une quantité suffisante de la d'essai dans le récipient de mesure.
- Introduire l'électrode dans la solution à examiner.
- Lire la valeur du PH sur l'écran de l'appareil.

Résultats et discussion

III.1. Rendement en l'huile essentielle pour les deux plantes

Le rendement de l'HE du géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) obtenu par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau, a donné un rendement de **0.14%**. Ce taux est en conformité avec celui des normes AFNOR en vigueur (0.1% à 0.2%) (AFNOR, 2000). Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs dont les rendements varient entre 0.12 et 0.16% [Rao *et al.*, (2002) ; Andriamanalina, (2003) ; Shawl *et al.*, (2006) ; Gomes *et al.*, (2007) ; Saxenaa *et al.*, (2008). Selon Bruneton (1999)], la période estivale reste la mieux propice pour extraire des quantités appréciables en HE du géranium rosat avec un rendement satisfaisant.

Concernant le romarin (*Rosmarinus officinalis*), le rendement en l'HE obtenu par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau, a donné un rendement de **0.39%**. Les rendements obtenus concordent avec ceux cités par El Guidour, (2003), qui mentionne des taux variant entre 0.1 et 0.4%. Cependant Guy, (2005), indique des taux supérieurs 0.5 et 0.6%. Les valeurs de l'Office Nationale Interprofessionnelle des Plantes Aromatique et Médicinale (ONIPPAM) sont supérieures à nos résultats, elles de l'ordre de 1.5 et 2%.

Plusieurs études, de part le monde, ont été menées pour trouver une explication aux variations qui affectent le rendement en HE et de cerner la période adéquate à même de garantir l'obtention d'une grande quantité d'essence aromatique. Les conclusions qui en découlent de ces travaux révèlent que, d'une façon générale, le rendement en HE est tributaire de plusieurs paramètres. Parmi ces paramètres on trouve : Les méthodes d'extraction (Gomes, 2007) les pratiques culturales comme utilisation des engrais organiques [Ram *et al.*, (2002) ; Araya *et al.*, (2006)] ou l'élimination des mauvaises herbes (Rao *et al.*, 2005), exercent une grande influence sur la quantité d'essences végétales susceptibles d'être sécrétées par les plantes à parfum.

III.2. Etude analytique

L'étude analytique a été réalisée sur les HE obtenus par entraînement à la vapeur d'eau.

III.2.1. Tests organoleptique des deux huiles essentielles

Les caractéristiques organoleptiques de l'HE de *Pelargonium graveolens* que nous avons étudiée, présente une couleur verdâtre, alors qu'elle est jaune ambrée à jaune verdâtre selon AFNOR (2000) tableau 3.

Pour le *Rosmarinus officinalis*, nos résultats sont comparables à ceux donnés par les normes AFNOR (2000).

Tableau 03 : Caractéristiques organoleptiques des HE

Espèce	Caractéristiques organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
Géranium rosat (notre étude)	Liquide limpide	Jaune verdâtre	Rosée légèrement citronnée
Normes AFNOR 2000	Liquide, mobile limpide	Jaune ambrée à jaune verdâtre	Rosée, ± menthée
Espèce	Caractéristiques organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
Romarin	Liquide mobile limpide	Jaune pâle	Odeur caractéristique fraîche plus ou moins camphrés
Normes AFNOR	Liquide, mobile limpide	Incolore à jaune pâle	Odeur caractéristique cinéolée plus ou moins camphrés

III.2.2. Caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles

Le contrôle des paramètres physico-chimiques des HE pour les deux plantes «*Pelargonium graveolens*» et «*Rosmarinus officinalis*», a été déterminé selon des méthodes de référence.

D'après les résultats obtenus (tableau6), les indices physico-chimiques des HE étudiées semble être en accord avec ceux des normes AFNOR. Ainsi l'indice d'acide obtenu pour les deux espèces est en conformité.

Le control de l'indice d'acide I_A permet d'évaluer la qualité des HE : qualité des d'acides gras libres présent (Goetz, 2007). Une valeur élevée indique une dégradation d'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation. Inversement, un I_A inférieur à 2 est un indice de bonne conservation de l'HE (Salle, 1991).

L'HE de romarin présente un I_A de 1.01 (<2), ce qui révèle sa stabilité et une bonne conservation de l'HE. En outre, le géranium possède un I_A de 4.23. Cet indice est certes dans les normes, mais demeure relativement élevé. Cela peut être dû à la dégradation de l'HE durant la conservation.

L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé. Pour certains auteurs le faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière, ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (**Kanko et al., 2004**), ce qui est le cas dans notre étude.

Un indice de saponification correspond à des acides gras comportant une chaîne de carbone plus longue. Dans notre étude, l'indice de saponification de l'HE du géranium est de 60.13 et du romarin 14.65. Il n'y a pas de normes pour cet indice.

L'indice d'ester renseigne sur la quantité des acides gras liés, (**Kanko et al., 2004**) Dans notre étude, l' I_E des deux HE est dans les normes.

Pour ce qui est des paramètres physiques, les densités à 20 °C, des HE du géranium 0.887 et de romarin 0.897 restent inférieures à celles de l'eau. Ceci explique leur non miscibilité aux solutions aqueuses (tableau4).

Tableau04: caractéristiques physicochimique des huiles essentielles du *Pelargonium graveolens* et du *Rosmarinus officinalis*

paramètres	HE géranium rosat	Normes AFNOR	HE romarin	Normes AFNOR
Indice d'acide	4.23	< 10	1.01	1
Indice de réfraction	1.47	1.461 à 1.47	1.46	1.464 à 1.470
Indice de saponification	60.13	ns	15.65	ns
Indice d'ester	55.90	53 à 76	14.69	2 à 15
Densité à 20°C	0.887	0.884 à 0.910	0.897	0.895 à 0.905

III.3.Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle

III.3.1. Evaluation qualitative : l'aromatogramme

a. *Pélargonium graveolens*

- *Candida albicans* est extrêmement sensible (d=22).
- *Enterococcus faecalis* et *Aspergillus niger* sont très sensibles (d=17,17).
- *Staphylococcus aureus* et *Candidas géotrichum* et *Escherichia coli* sont sensibles (d=14, 13,11).
- *Pseudomonas aeruginosa* est résistante (d=9).

b. *Rosmarinus offisinalis*

- *Staphylococcus aureus* et *Candidas géotrichum* sont extrêmement sensible (d=23,21).

- *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans* sont très sensibles (d=16,17).
- *Escherichia coli* et *Aspergillus niger* sont sensibles (d= 12,12).
- *Pseudomonas aeruginosa* est résistante (d=9)

L'HE du géranium rosat et du romarin présente une bonne activité inhibitrice sur la croissance de certaines bactéries et pratiquement sur toutes les souches fongiques (levures et moisissures).

On prend en considération les diamètres d'inhibition, les deux HE sont plus active sur, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Candida géotrichum*, *Aspergillus niger* avec des ZI qui varient entre 11 et 23 mm (planche1 et planche2). Les résultats obtenus révèlent que les bactéries Gram + sont les plus sensibles. En effet, tous les Gram+ ont manifesté une sensibilité vis-à-vis de l'action inhibitrice de l'HE avec un diamètre de 14, 16,17 et 23mm d'inhibition alors que certaine bactérie Gram- ont présenté une certaine résistance.

La résistance de ces germes, Gram-, n'est pas surprenante. En effet, ces bactéries et particulièrement *Pseudomonas aeruginosa* possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de la paroi bactérienne qui forme une barrière imperméable aux composés hydrophiles (**Gilles, Zhao, 2010**).

Concernant l'activité de l'HE du géranium rosat et du romarin en aromatochrome sur les levures et les moisissures utilisées, il semble que cet HE présente une grande activité inhibitrice sur la croissance de toutes les souches testées. *Candida albicans*; *Candida géotrichum* et *Aspergillus niger* ont montré une grande sensibilité vis-à-vis de chaque HE avec un diamètre de 21 et 22 mm (tableau5).

En outre, le screening de l'activité antimicrobienne de l'HE du géranium odorant, a révélé que les bactéries Gram + sont plus sensibles à l'action inhibitrice de cette HE que les Gram -. En fait, ces dernières possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne, [**Nikaido, (1996) ; Tepe et al, (2005) ; Gille, (2010)**]

Selon **Farag et al. (1989)**, **Marino et al. (1999)** et **Inouye et al. (2001)**; les bactéries Gram (+) sont généralement plus sensible aux HE que les bactéries Gram (-).

Pour ce qui est de l'activité antifongique de l'HE de géranium et particulièrement sur les levures, une étude récente publiée par **Zore et al, (2010)**, a rapporté des résultats similaires aux

nôtres. La même étude a confirmé que le géraniol et l'acétate de géranyle sont, les deux composés qui possèdent un pouvoir fongicide le plus marqué.

Selon **Bousbia, (2004)** ; l'huile essentielle du romarin a un effet antifongique très important ex : *Candida albicans* avec un d= 23mm.

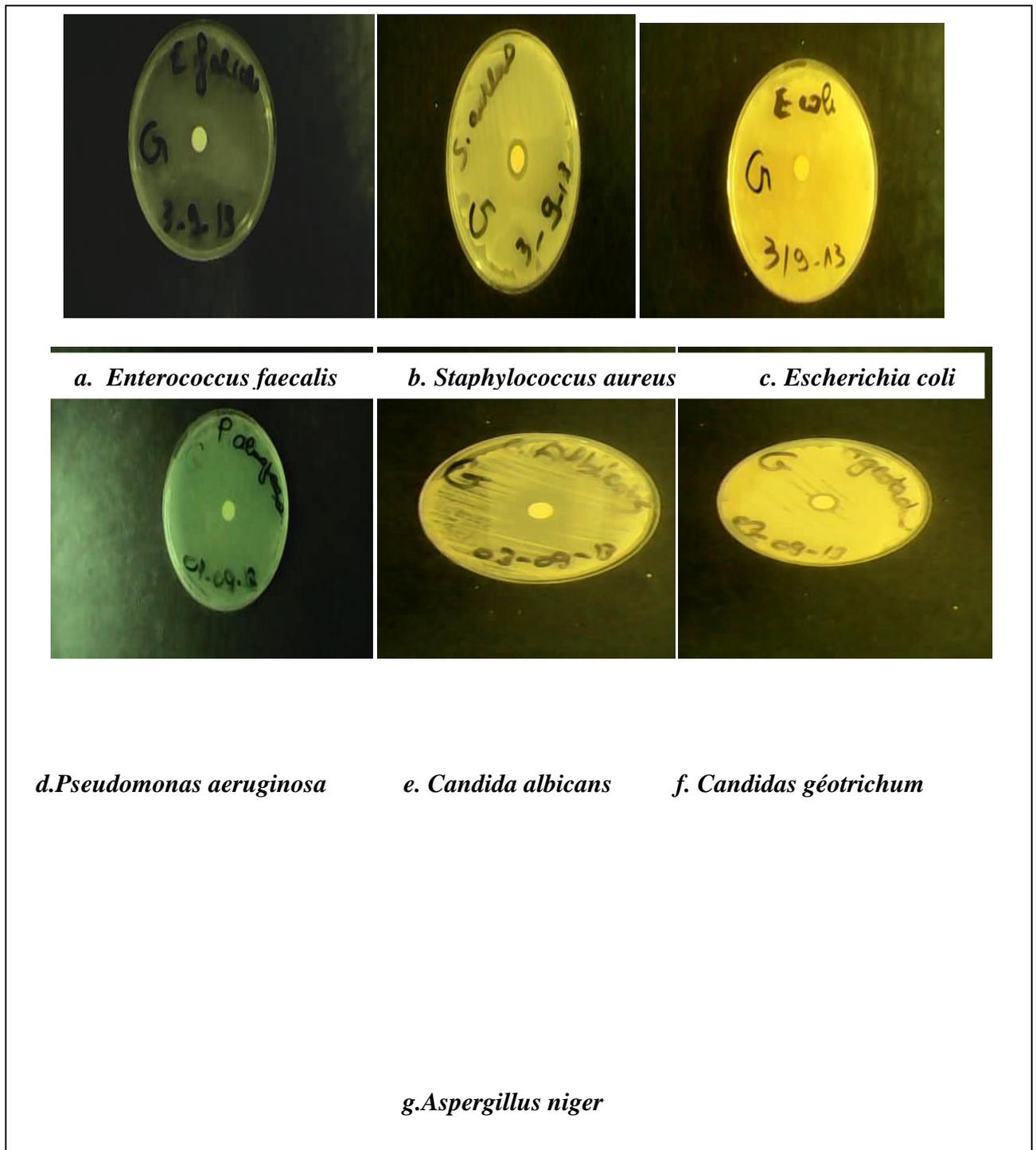
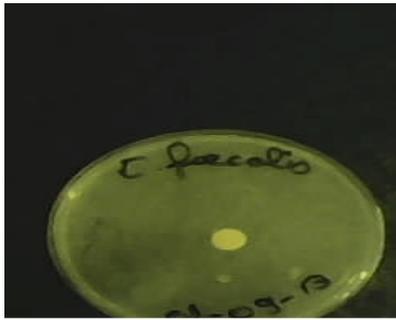


Planche1 :L'activité antimicrobienne de l'HE du *Pélargonium graveolens*



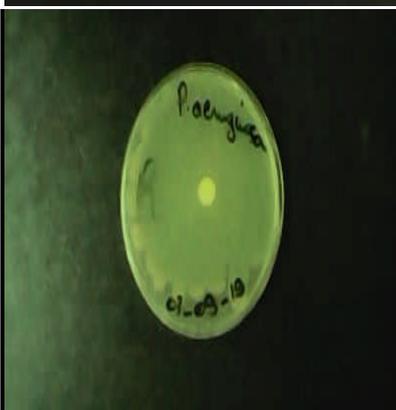
a. Enterococcus faecalis



b. Staphylococcus aureus



c. Escherichia coli



d. Pseudomonas aeruginosa



e. Candida albicans



f. Candida géotrichum



g. Aspergillus niger

Planche 2 : L'activité antimicrobienne de l'HE du *Rosmarinus officinalis*

Tableau 05 : Activité antimicrobienne et antifongique de deux HE du romarin et du géranium rosat (Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés avec une règle simple) sur 6 souches microbiennes.

Souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	Huile essentielle de <i>Pélargonium graveolens</i>		Huile essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i> Gram+	17	++	16	++
<i>Staphylococcus aureus</i> Gram+	14	+	23	+++
<i>Escherichia coli</i> Gram-	11	+	12	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram-	Pas d'inhibition	-	Pas d'inhibition	-
<i>Candida albicans</i>	22	+++	17	++
<i>Candidas géotrichum</i>	13	+	21	+++
<i>Aspergillus niger</i>	17	++	12	+

- : résistante + : sensible ++ : très sensible +++ : extrêmement sensible

III.3.2. Evaluation quantitative : concentration minimal inhibitrice

- Pour l'HE du géranium rosat

Nous remarquons que l'HE du géranium rosat inhibe l'activité des bactéries à Gram + et Gram- à une concentration de 0.437% et 3.5%. Pour les champignons la concentration inhibitrice varie entre 0.218% et 0.875%.

Les résultats obtenus révèlent que les bactéries Gram + sont la plus sensible. En effet, *Staphylococcus aureus*, une bactérie Gram+, a présenté la CMI la plus faible 0.437% suivi de bactérie Gram- *Escherichia coli* 3.5%. Pour les champignons la CMI la plus faible 0.218% pour *Candida albicans* (tableau6.)

Tableau 06 : Détermination de la concentration minimal inhibitrice de l'HE du géranium rosat sur 6 souches microorganismes

Concentration	3.5%	1.75%	0.875%	0.437%	0.218%	0.109%	0.054%	0.027%
bactéries								
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Candidas géotrichum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	+	+	+	+	+

- : Inhibition

+ : Croissance

- Pour l'HE du romarin

Nous remarquons que l'HE du romarin inhibe l'activité des bactéries à Gram + et Gram- à une concentration de 1.75% et 0.875%. Pour les champignons la concentration inhibitrice varie entre 0.875% et 1.75% (tableau7).

Les résultats obtenus révèlent que les bactéries Gram + sont les plus sensibles. En effet, *Staphylococcus aureus*, une bactérie Gram+, a présenté la CMI la plus faible 0.875% suivi de la bactérie Gram- *Escherichia coli*

Tableau 07 : Détermination de la concentration minimal inhibitrice de l'HE du romarin sur 6 souches microorganismes

Concentration bactéries	3.5%	1.75%	0.875%	0.437%	0.218%	0.109%	0.054%	0.027%
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Candidas géotrichum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	+	+	+	+	+

- : Inhibition

+ : Croissance

III.4. L'effet des HE dans le « Roll-on »

- Pour 5 jours de conservation :

D'après les résultats obtenus, après 5 jours de conservation à 25°C nous remarquons une absence total de germes, à savoir les germes aérobies mésophiles, les levures et les moisissures et cela pour toutes les concentrations (tableau 8 et fig 11)

Tableau 8: Résultats de l'effet antimicrobiens des deux HE dans le « Roll-on » après 5 jours de conservation.

Germes	« Roll-on » Avec HE de géranium rosat				« Roll-on » Avec HE de romarin			
	0.4%	0.9%	1.5%	2%	0.4%	0.9%	1.5%	2%
Germes aérobies mésophiles	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs
Levures et moisissures	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs	abs

abs: absence

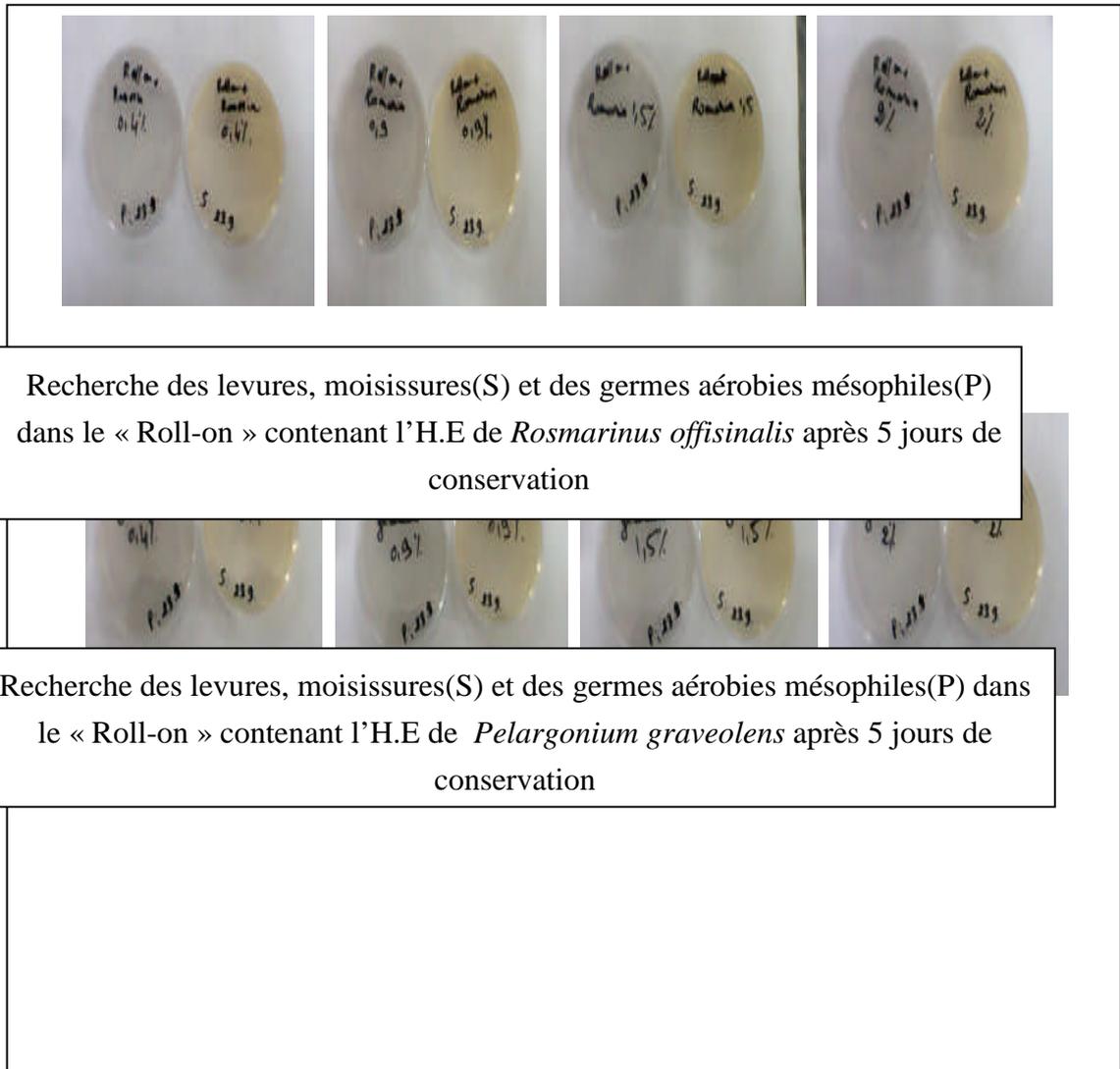


Figure 11: Recherche des levures, moisissures(S) et des germes aérobies mésophiles(P) dans le « Roll-on » après 5 jours de conservation.

- Pour 38 jours de conservation :

D'après les résultats obtenus nous remarquons une absence total de germes à savoir les levures, les moisissures et les germes aérobies mésophiles et cela pour toutes les concentrations des deux HE utilisées (tableau 9 et figure 10).



a: Recherche des levures, moisissures(S) et des germes aérobies mésophiles(P) dans le « Roll-on » contenant l'H.E de *Rosmarinus officinalis*



b: Recherche des levures, moisissures(S) et des germes aérobies mésophiles(P) dans le « Roll-on » contenant l'H.E de *Pelargonium*

Figure 12: Recherche des levures, moisissures(S) et des germes aérobies mésophiles(P) dans le « Roll-on » après 38 jours de conservation.

III.5. Contrôle physicochimique et organoleptique des « Roll-on »

Tableau 10 : Résultats du contrôle physicochimiques du « Roll-on » après 38 jours de conservation.

	« Roll-on »	Normes laboratoire VENUS
Densité à 20°C	1.067	1.060-1.10
pH	3.85	3.50-4.50

D'après les résultats obtenus (tableau 10), la densité et le pH semblent être en accord avec les normes du laboratoire de VENUS.

L'examen de l'aspect, l'odeur et la couleur des « Roll-on » pour toutes les concentrations des HE, montre que le Roll-on est un liquide laiteux, blanc et homogène. Donc les « Roll-on » après 38 jours de conservation à température ambiante (25°C) sont d'une bonne qualité physicochimique et organoleptique.

Lors de l'analyse microbiologique des « Roll-on » contenant différentes concentrations d'huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et de *Pelargonium graveolens* : 0.4% ; 0.9% ; 1.5 % ; et 2%, nous remarquons que les « Roll-on » analysés sont de bonne qualité microbiologiques et que les deux HE et à faible dose (0.4%) ont révélé une bonne activité antimicrobienne, selon le certificat du laboratoire VENUS.

D'après **Martini et Seiller (2006)**, les huiles essentielles dont les composés majoritaires sont le citral, le linalool, le géraniol, l'acétate de linalyle et le thymol, et utilisées comme conservateurs dans une émulsion cosmétique (émulsion huile/eau), montrent une bonne activité antimicrobienne, et le produit fini présente une bonne qualité microbiologique. Mais, certaines huiles essentielles peuvent présenter un risque de toxicité comme, le pouvoir allergisant de l' α pinène et du limonène, en plus de leur coût élevé.

Selon **Lacharme (2011)**, Il n'existe pas de réelle législation concernant les huiles essentielles et leur utilisation dans les produits cosmétiques. Cependant, l'AFSSAPS émet des recommandations et des rappels aux fabricants et aux responsables de la mise sur le marché des produits cosmétiques, incluant des huiles essentielles. D'après le même auteur et selon la Directive cosmétique **Européenne 76/768/CEE**, les fabricants doivent être très prudents, quant à

l'utilisation des huiles essentielles dans leurs produits cosmétiques. D'une manière générale la proportion de l'huile essentielle ne devra pas dépasser 5% du produit fini.

CONCLUSION

Conclusion

Les huiles essentielles sont des substances aromatiques d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes très intéressantes à mettre à profit dans la préservation des produits cosmétiques.

L'objectif de ce travail est d'apporter un supplément de connaissance sur les caractéristiques antimicrobiennes des huiles essentielles du romarin et du geranium rosat, et leurs effets conservateurs, ce qui peut contribuer à mettre en relief leur possible valorisation, dans cette optique un essai d'incorporation des HE du romarin et du geranium rosat dans un produit cosmétique « roll-on » a été réalisé.

Les HE extraites de partie aérienne (feuilles) de deux plantes par l'entraînement à la vapeur d'eau a présentés un rendement de 0.14% pour *Pelargonium graveolens* et 0.39% pour *Rosmarinus officinalis*.

Les indices de réfraction, nous ont permis de vérifier que les HE de deux plantes sont riches en composés chimiques, ceci peut favoriser leurs utilisations dans les produits cosmétiques.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE de *Rosmarinus officinalis*, ont montré qu'elle est fortement inhibitrice pour *Staphylococcus aureus* (ZI=23mm, CMI=0.875%). Et modérément inhibitrice pour *Enterococcus faecalis* (ZI=16mm, CMI=1.75%). Par contre, elle est légèrement inhibitrice pour et *Escherichia coli* (ZI= 12mm, CMI=1.75%).

Concernant l'H.E du *Pelargonium graveolens*, nous avons constaté qu'elle est non inhibitrice pour *Pseudomonas aeruginosa*, traduit par l'absence de zone d'inhibition. Elle semble légèrement inhibitrice pour *Escherichia coli* (ZI=11mm, CMI=3.5%). et modérément inhibitrice pour *Staphylococcus aureus* (ZI==14mm, CMI=0.437%) et *Enterococcus faecalis* (ZI=17mm, CMI=1.75%).

En ce qui concerne l'activité antifongique, l'H.E de geranium rosat s'est montré légèrement inhibitrice pour *Candidas géotrichum* (ZI=13mm) et modérément inhibitrice pour *Aspergillus niger* (ZI=17mm, CMI=0.875%) et fortement inhibitrice *Candida albicans* (ZI=22mm, CMI=0.218%).

Celle du romarin s'est montré modérément inhibitrice pour *Candida albicans* (ZI=17mm, CMI=1.75%) et légèrement inhibitrice pour *Aspergillus niger* (ZI=17mm, CMI=0.875%) et fortement inhibitrice pour *Candidas géotrichum* (ZI=21mm, CMI=0.218%).

L'étude de l'effet antimicrobien de ces deux HE utilisées comme conservateurs a révélé, qu'elles sont inhibitrices à faibles concentrations (0.4%), pour tous les germes pathogènes testés. Les « Roll-on » ont présenté une bonne qualité microbiologique, organoleptique et physicochimique, après 38 jours de conservation à température ambiante.

Comme perspectives et en vue de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait nécessaire également de :

- ✚ Faire des tests de cytotoxicité sur ces deux huiles essentielles.
- ✚ Prolonger la durée de la conservation pendant une année ou plus, pour déterminer l'efficacité des huiles essentielles, comme étant des conservateurs, ainsi déterminer la consistance et la qualité organoleptique et physicochimiques du produit fini.
- ✚ Faire des tests dermatologiques du produit fini après un mois de conservation ainsi après une durée un peut plus prolonger de conservation.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- 1) **Adam K, Sivropoulou A., Kokkni S., Lanaras T. and Arsenakis M., 1998.** Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. agric. Food chem.*, vol 46, n°6: pp1739-1745.
- 2) **AFNOR., 2000.** Association Française de Normalisation, Recueil de normes Française « les huiles essentielles », AFNOR. Paris AFNOR NF T 75-006.2000.
- 3) **AFNOR ,1999.** les huiles essentielles de romarin, recueil des normes françaises.
- 4) **Andriamanailna F, 2003.** L'extraction d'huile essentielle d'Ylang-ylang. *AgriDoc* pp1-7.
- 5) **ALLOU, FZ 2005 :** étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles d'une plante médicinale *Centaurea pullata*. Mémoire d'ingénieur. Département de biologie U.S.D.B. pp 20,21.
- 6) **Anonyme, 2002.** Ministère des affaires étrangères .
- 7) **Aquino R., 2002.** « Arômes méditerranéens pour la réalisation des lignes cosmétiques méditerranéennes ». *Journal of Cosmetic Sciences* 53 (Nov-Déc.), 2002, pp 321-335.
- 8) **Araya H.T., Soundy P., Steyn J.M., 2006.** Response of Herbage Yield, Essential Oil Yield and Composition of South African Rose-Scented Geranium (*Pelargonium sp*) to Conventional and Organic Nitrogen. *J. Essent. Oil Res.*, 18 : pp 111-115 (Special Edition).
- 9) **Ari R. et Sezonov G., 2008.** Biologie et génétique d'*Escherichia coli*. Ed. Belin, pp 362-361.
- 10) **Arnie C., Françoise P. 2001.** Le préparateur en pharmacie. Paris : Techniques et documentations.
- 11) **Aubry, J.M. et Sebag, H., (2005).** « Formation cosmétique, Matières premières, concepts et procédés innovants ». Les cahiers de formulation, vol 12, édition EDP Sciences France, p6.
- 12) **Baba Aissa F., 2011.** Encyclopédie des plantes utiles .Ed. Avenue Abderrahmane Mira.BEO Alger, 471p.
- 13) **Back, E.A. & Pemberton, C.E., 1970.** The Mediterranean fruit fly in IHawaii. *United States Department of Agriculture Bulletin n°536*, pp 1-118.
- 14) **Bardeau F., 2009.** Les huiles essentielles. Ed. Lanore. Paris.333p.
- 15) **Battandier JA. ,Trabut L., 1988.** Flore de l'Algérie. Les dicotylédones. Ed. adelphe & Jourdan Alge, pp 1-208.

- 16) Belaiche P ; 1979.** L'aromatogramme : Traité de phyto-aromathérapie. M.S.A. Ed. Paris, p 204.
- 17) Belaiche P ; 1997.** Traité de phyto-aromathérapie. Ed Masson. p:120.
- 18) Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle Médecine arabe et savoir populaire. Ed. Al Biruniya Rabat p 558.
- 19) Beloued A., 2001.** Les plantes médicinales d'Algérie. Ed. offices des Publications Universitaires. Alger. 227 p.
- 20) Bennet R-J. et Johnson A-D., 2005.** Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. Annu. Rev. Microbiol., 59 : pp 233-255.
- 21) Benini C., 2007.** Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux comores. Mémoire Ing. Biol. Univ. Sci. Agr. Gembloux. Belgique, p 79.
- 22) Benjilali B., Tantaoui-Elarki A., Ismaili-Alaoui M., 1986.** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plant. Méd. Phytothér.*, 20: pp 155-167.
- 23) Boelens M.H., 1985.** The essential oil from *Rosmarinus officinalis L.* *Perfumes flavours*, vol.5, N°. 10, PP.21-37.
- 24) Boudjada.S., 1996.** Forêt algérienne. Numero 1 .INRF, Bainem. Alger 30 p. (Revu d'information et de vulgarisation).
- 25) Bousbia N, 2004.** Extraction et identification de quelques huiles essentielles. (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin) étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option *Sciences Alimentaires*, INA. Algérie. 130p.
- 26) Brunton J., 1993.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 623p.
- 27) Brunton, B; 1997.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ,2ème édition .Éd. Tec et Doc, P635.
- 28) Brunton J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. P1136.
- 29) Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 1120p.
- 30) Caillet S., Lacroix M., 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobienne et leur application potentielles en alimentaire, vol.3, pp : 1-8.
- 31) Canillac N. et Mourey A., 1996.** Comportement de *Listeria* en présence d'huiles essentielles de sapin et de pin. *Sci. Aliments*, vol.16, pp :403-411.

- 32) Carnesecchi S., Schneider Y., Ceraline J., Durantou B., Gosse F., Seiler N., Raul F., 2001.** Geraniol, a Component of plant essential oils, inhibit growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 2001(1) : pp 197-200.
- 33) Charabot E., 1913.** La Culture du géranium rosat. *Journal d'Agriculture Tropicale*.vol 13, p289.
- 34) Crespo M.E, Jiménez J & Navarro C., 1991.** Special Methods for Essential oils of the genus *Thymus*. *Modern Methods for plant analysis*. pp 6-41.
- 35) Cuvelier M E., Richard H et Berset C., 1996.** *J. Am. of Chem. Soc.* 1996, Vol. 73, pp 645-665.
- 36) Deans S.G et Ritchie G. 1987.** Antimicrobial properties of plant essential oils. *Int.J. of Food Microbiol.*, 5: pp 165_180.
- 37) Deba F., Dang Xuan T., Yasuda M., Shinkichi T., 2008.** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Fod control*, V.19, Issue 4, pp 346-352.
- 38) Demange E., et Serrano S., 2007.** consultante en cosmétique naturelle. Réalisé par les éditions Plume de carotte pour les magasins Nature & Découvertes.
- 39) Demarne FE. 1985.** Le géranium rosat. *Parfums. Cosmétiques et Arômes*. n°62, pp 7-48.
- 40) Demarne FE. 1989.** l'amélioration variétale de géranium rosat : contribution systématique, caryologique et biochimique, ORSAY (France) ; université de Paris-sud.250;.180p.
- 41) Demarne FE. 1992.** influences du mode de récolte sur la distillation du géranium rosat. *Agronomie tropicale (France)*; vol.46; n° 2; p161-165.
- 42) El-Guedour, 2003.** Extraction des huiles essentielles du romarin et du thym et comportement insecticide de ces deux huiles sur *Rhyzoperta dominica*, Thème de mémoire Ingénieur, ANP. 120p.
- 43) Fauchère J.L., Avril J.L. 2002.** Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses. Paris. 365p.
- 44) Farag R. S., Daw Z.W., Hewedi F.M., Elbararoty G. S. A., 1989.** Antimicrobial activity of some Egyptian species Essential Oils. *J. Foodprotects*, 52: pp675-679.
- 45) Flurette J., Freney J et Reverdy M.E., 1995.** Antisepsie et désinfection. Paris: ESKA. 639p.
- 46) Franchomme P, Pénoel D, 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges.445p.

- 47) **Fuinel G., 2002.** Arbre et plantes médicinales du jardin. Ed. Fernand Lanor. Paris.72p.
- 48) **Garnéro J., 1991.** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et normalisation. Phytothérapie, aromathérapie, C-2. Ed.Techniques-Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, 368p.
- 49) **Gilles M., Zhao J., Samson Agboola M.A. 2010.** Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. Food Chemistry, 119: pp 731–737.
- 50) **Goetz P, 2007.** La phytocosmétologie thérapeutique. Ed. Springer- verlag, Paris.257p.
- 51) **Gomes P.B., Vera G., Mata Al'iro E. Rodrigues A.F., 2007.** Production of rose géranium oil using suspercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 41 : pp50-60.
- 52) **Grosjean N., 2007.** L'aromathérapie tout simplement. Ed. Eyrolles. Belgique. 139p.
- 53) **Gubb A S., 1913.** La flor Algérienne naturelle et aqoise. Ed. Alger, 288p
- 54) **Guenther E., 1975.** The essential oils, Vol. II, Ed. Van Nostrand. New-York USA. 866p
- 55) **Gustave H. 1800.** Les plantes industrielles. Haruard university, paris, pp: 382-384.
- 56) **Guy G, 2005.** Les plantes aromatiques et huiles essentieles. L'Harmattan. Paris. 414p.
- 57) **Halpern G.m., Weverka P., 2006.** The healing trail: Essentiel oils of Madagascar. Basic Health Publications. Antanari.vol 3. pp 59-64.
- 58) **Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: pp 985-990.
- 59) **Inouye S., Takiswa T. and Yamaguchi H., 2001.** Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. J. of. Antimi. Chemo. 47: pp 565-573.
- 60) **Inouye S, 2003.** Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). International Journal of Aromatherapy, pp 95-107.
- 61) **Jeau-Luc Sallé, 1991.** les huiles essentielles, synthèse d'Aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. 167p.
- 62) **Judd WS., Bouharmont J., Campbell CS., évrard CM., Kellogg EA., Stevens P., 2002.** Botanique systématique : Une perspective phylogénétique. Edition De Boeck Université, Bruxelles, 488p.
- 63) **Kanko C., Sawaliho B.E., Kone S., Koukoua G., N'Guessan YT., 2004 :**Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippiamultiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». Comptes rendus Chimie7, pp 1039–1042.

- 64) Kato T., Lijima H., Ishihara K., Kanek T., Hirai K., Naito Y., Okuda K., 1990.** Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. Bull. Tokyo. Dent. Coll. 31(4): pp 301-307.
- 65) Katayama T et Nagai I., 1960.** Chemical significance of the volatile components of spices in the food preservative viewpoint- IV: structure and antibacterial activity of terpenes. Bull. Jap. Soc. Sci. fish., 26: pp29-32.
- 66) Kawaharajo K., Homma J.Y., Aoyama Y., Okada K. et Morihara K., 1975-** Effects of protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* on skim. Jpn. J. Exp. Med.45: pp79-88.
- 67) Knobloch K., Pauli A., Iber L., Weigand H and Weis N., 1989.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J. Essent, oil. Res. 1 : pp119_128
- 68) Lacharme F., 2011.** Thèse pharmacie, Université de Grenoble, « Les produits cosmétiques biologiques : Labels, composition et analyse critique de quelques formules » 156p.
- 69) Le Lourant P., 1994.** Guide pratique de l'aromathérapie : Mieux être, mieux vivre par l'aromathérapie. Ed. De Vecchis S.A.Paris.130p.
- 70) Luttage V., Rluge M., Bauer G., 2002.** Botanique : Traité fondamental. Ed. Lavoisier. Paris. 1120p.
- 71) Marino M., Bersani C., Comi G., 1999.** Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. J. Food Protect, 62 :pp 1017-1023.
- 72) Martini M.C., 2008.** Cosmétologie et dermatologie, esthétique, conservateurs, Ed. Masson. Paris.168p
- 73) Martini M.C. et Seiller M., 2006.** Actifs et additifs en cosmétologie. 3^{ème} Ed. Lavoisier. Paris. 558p.
- 74) Mailhebiau P, 1994.** La nouvelle aromathérapie : biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne, 635p.
- 75) Martini M.C., 2006.** Cosmétologie BTS esthétique-cosmétique, 2^{ème} Ed Masson, 408p.
- 76) Martini M.C., 2008 :** Cosmétologie BTS esthétique-cosmétique, 2^{ème} Ed Masson, 206p.
- 77) Martini M.C. et Seiller M., 2006 :** Actifs et additifs en cosmétologie. 3^{ème} Ed. Lavoisier. Paris, 608p.
- 78) Méssegue .M., 1983.** Mon herbier de santé .Ed. Robert Laffon. Paris.333p.

- 79) Morris J.A., Khettry A et Seitz E.W., 1997.** Antimicrobial activity of aroma chemical sand essential oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: pp 595-603.
- 80) Nikaido H. 1996.** Outer membrane. In: F. C. Neidhardt, (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and molecular biology*, 1: pp 9–47.
- 81) Norbet u.1983.** Epices et plantes aromatique. Ed. Matier., Paris, 90p.
- 82) Nyabyenda P. 2006.** Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique. Presses Agronomiques de Gembloux. Bruxelles. 238p.
- 83) Odile C et Danielle R., 2007.** Botanique pharmacognosie phytothérapie. 3^{ème} édition. Edition Walters Kluwer. France. ISBN 978p.
- 84) Padrini F., Lucheroni de vecchi M.T., 1997.** Les huiles essentielles pour retrouver la vitalité, le bien être, la beauté. Ed .De vecchi.95p.
- 85) Pharmacopée Européenne, 2008.** CD. Rom
- 86) Péron, Jean-Yves. 2006.** Références productions légumières. 2. s.l. Ed.Lavoisier, 2006. 563p.
- 87) Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, école polytechnique fédérale, Lausanne. 268p.
- 88) 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 : pp 679-684.
- 89) Prates H., 1998.** Insecticidal activity of monoterpenes against Rhyzoperta Dominica .J.Stored product.Res .Vol.34, pp243-249.
- 90) Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales.Paris, CNRS, tome 1 et 2, 1170p.
- 91) Ram M ., Ram D.,Roy S.K.,2002.** Influence of an organic mulching on fertiliizer nitrogen use efficiency and herb and essential oil yields in geranium (*Pelargonium graveolens*). *Bioresource Technology*, 87, pp273-278.
- 92) Rao R.B., Singh M., Ganesh R.S., 1986.** Effect of nitrogen fertilizer on geranium (*Pelargonium graveolens* l'Hérit ex. Ait), cowpea and blackgram grow in sole cropping and intercropping systems. *Intern. J. Trop. Agric.*, s 4 : pp341-345.

- 93) Rao R.B., Paul R.N., Singh K., 2005.** Influence of co-distillation with weed biomass on yield and chemical composition of rose-scented geranium(*Pelargonium species*)oil. *J. Essent. Oil Res.* 17 : pp 41-43.
- 94) Roulier G., 1992.** Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de la plantes. Ed. Dangles. France. 689p.
- 95) Sallé J.L., 1991.** Les huiles essentielles. Ed. Frison-Roche. Paris. 167p.
- 96) Salton MRJ, 1968.** Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability *Gen physiol.*, 52: pp 227-252.
- 97) Samson R.A., Houbraken J., Summerbell R-C-, Flannigan B. et Miller J-D., 2001.** Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments.* New York, 292p.
- 98) Satrani B., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D., Talbi M., 2007.** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthusmixtus*. *Bull. Soc. Pharm.Bordeaux*, 146: pp85-96.
- 99) Saxenaa G., Rahmanb L., Chandra Vermac P.,Banerjeed S., Kumare S., 2008.** Field performance of somaclones of rose scented géranium (*Pelargonium graveolens* L'Her Ex Ait) for evaluation of their essential oil yield and composition. *Industrial Crop and Products*, 27 : pp 86-90.
- 100) Schwartz R., Davis R., Hilton T.J., 1992.** Effect of temporary cements on the bond strength of resin cement. *Am. J.Dent.*19925(3) :pp 147-150.
- 101) Seidemann J. 2005.** World spice plants: economic, usage, botany, taxonomy. Springer. London. pp: 275-277.
- 102) Shawl A.S., Kumar T., Chishti N., Shabir S., 2006.** Cultivation of rose scented geranium (*Pelargonium sp*) as a cash crop in Kashmir valley. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5(4): pp 673-675.
- 103) Siani A.C., Ramos M.F.S., Menezes-deLima Jr., Ribeiro-dos-Santos R., Fernadez-Ferreira E., Soares R.O.A., Rssas E.C.,Guimaraes A.c., Zoghbi M.G.B.& Henreques M.G.M.O.1999.** Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *protium*. *Journal of Ethnopharmacology*. 66(1): pp 57-69.

- 104) Sivropoulou A, Papanikolaou E, 1996.** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Food Chemistry* 44- pp1202-1205.
- 105) Solim Igor A.E., 2002.** Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'acacia Nilotica Var Adansonii. Thèse de Doctorat. Pharmacie, université Chikh Anta Diop, dakar, 37p.
- 106) Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. 2005.** Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller. (Lamiaceae). *Food Chem.*, 90: pp 333–340.
- 107) Teuscher E., Robert A., Annelise L., 2005.** 1000 plantes a aromatiques, Ed.Lavoisier. Tech & Doc. Paris. 522p.
- 108) Thiers S, 1986.** Les cosmétiques. Ed. Masson. 432p.
- 109) Touafek, O. 2010.** Etude phytochimique de plantes medicinales du Nord et du sud algeriens. [Thèse Doctorat Universite Mentouri-Constantine]. 2010. 248p.
- 110) Valnet, J., 1984.** Aromatherapie Traitement des maladies par les essences des plantes. 10e Ed., MALOINE S.A., Paris. 544 p.
- 111) Wilson R., 2002.** « Aromatherapy: Essential oils for vibrant health and beauty ». Avery. Éd. NewYork . 576p.
- 112) Worwood VA., 2001.** «Aromatherapy for the Beauty Therapist ».Cengage Learning EMEA, NewYork. 335p.
- 113) Zore G.B., Archana D., Thakre V., Rathod S., Karuppayil M., 2010.** Evaluation of anti-Candida potential of geranium oil constituents against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition of growth, dimorphism and sensitization mycoses, Blackwell Verlag. GmbH., 1-111p.

ANNEXES

Annexe 1 : Appareillage et petit matériel.



Agitateur magnétique



Annexe 2: Matériel non biologique, et les produits chimiques utilisés durant toute l'expérimentation.

Appareillage et Dispositifs	Verrerie	Réactifs et Milieux de culture
<ul style="list-style-type: none"> *Balance de précision *Etuve, 37° et 25°C *Réfrigérateur (4°C) *Bain marie *Hotte *Réfractomètre *Bec benzène *Agitateur magnétique *densitomètre *écouvillons stériles *pince de laboratoire *portoir *seringue 5ml et 10ml *Ciseaux 	<ul style="list-style-type: none"> *Becher *Ballon (100 ml et 500 ml et 1L) *Eprouvette (100 ml et 500 ml) *Flacons en verre *Boîtes de Pétri de $\phi=90$ mm *tube à essai stériles *Pipette Pasteur 	<ul style="list-style-type: none"> 1-Réactifs : *KOH *HCL *Phénophtaline *eau physiologique *eau distillé 2-Milieu de culture : *Gélose nutritive *Muller Hinton *Sabouraud * Agar-Plate-Count

Annexe 3 : Composition des milieux de culture.

Milieu de culture	Gélose nutritive	Gélose Mueller Hinton	Gélose Sabouraud	Agar--Plate-Count(PCA)
Composition	-1g d'extrait de viande. -2g d'extrait de levure. -5g de chlorure de sodium. -10g agar. -Eau distillée (1litre pour 28g du mélange). -pH 7,4. (Solim Igor, 2002)	-300ml d'infusé de bœuf. -17,5g peptone de caséine. -17g agar. -Eau distillée (1litre pour 38g du mélange). -pH 7,4. (Solim Igor, 2002)	-10g peptone. -10g glucose. 15g agar. -10,5g Chloramphénicol. -Eau distillée qsp 1Litre. -pH 6,2. (Solim Igor, 2002)	-2.5g d'extrait de levure. -1g de glucose. -5g peptone de caséine. -14g Agar-agar. (Solim Igor, 2002)