

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la
recherche



963THV-1

Université Saad Dahlabe
Blida

Faculté des sciences
Vétérinaires

Projet de fin d'étude

Pour l'Obtention du Diplôme :
Médecin Vétérinaire

Thème

*Les huiles essentielle
« L'huile de citron »*

Jury :

M^r : Besbassi Mohamed

M^r Rahhal Mohamed

Étudiante:

Trabelsi FZ Akila

Promoteur:

M^r : Bèrbère Ali

Promotion

2015

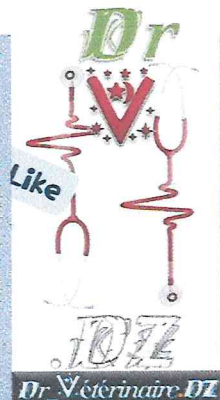
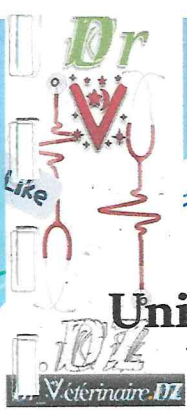


TABLE DES MATIERES

Résumé en français	I
summary	II
ملخص	III

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

ChapitreI: Généralités sur les huiles essentielles

I.1. historique	01
I.1.1Définition	01
I.1.2. Localisation des huiles essentielles.....	02
I.1.3. composition chimique des huiles essentielle	02
I.1.3.1les familles chimiques des HE	02
I.1.3.2. Les composés terpéniques	02
I.1.3.3. Les composés aromatiques	02
I.1.4. Variabilité de la composition des HE	04
I.1.5. Toxicité des HE	04

ChapitreII: Les Citrus

Introduction	06
II.1 le citronnier.....	06
II.1.1Les différentes variétés du citron	06
II.1.2 systématique.....	07
II.1.3usage médicinal du citron	08
II.3- Composition chimique de l'HE de citron:	09
II.4- Production mondiale	10

Chapitre III : Procédés d'extractions des huiles essentielles	
III.1-Extraction à la vapeur d'eau	12
III.1.1-L'hydrodistillation (distillation à l'eau)	12
III.1.2-L'entraînement à la vapeur :.....	14
III.1.3-La distillation mixte	15
III.1.4-L'extraction à l'eau surchauffée	15
III.1.5- La distillation par extraction simultanée (SDE)	15
III.1.6- Extraction assistée par micro-ondes	16
III.2-L'extraction au moyen de solvants	18
III.2.1- Extraction par solvants volatils	18
III.2.2-Extraction par solvants fixes	18
III.2.3- Extraction au CO ₂ liquide ou supercritique	19
III.2.4- Extraction au Forane 113	19
III.3-L'expression à froid	19
Chapitre IV: La Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	
IV.1-Principe	21
IV.2-Appareillage de la CPG	21
IV.2.1-Le four	22
IV.2.2-Le système d'injection.....	22
IV.2.3- La colonne	22
IV.2.4-Le détecteur	22
Chapitre V : Potentiel antimicrobien des huiles essentielles	
V.1-Principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	24
V.1.1-Techniques par contact direct	24
V.1.2-Microatmosphère	25
V.1.3- La CMI et CMB	25
V.1.4-Méthode du puit au cylindre	25



REMERCIEMENTS

Ce travail est le fruit d'énormes sacrifices, de privatisations n'aurai jamais été fait sans aide de Dieu qui m'a donné la force et le morale.

Je tiens a remercié en particulier mon frère « Haniche Yassine » qui m'a beaucoup aidé dans ce travail.

Je remercie aussi tous les enseignants du département vétérinaire, et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la préparation de se mémoire.

Mes remerciements a celui qui me fait l'honneur d'examiner mon travail.

Trabelsi FZ Akila



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail pour :

- Aux deux bougies qui se consume pour me montrer le chemin, mes très chers parents à qui je dois beaucoup, que dieu me les garde.
- A la mémoire de celle qui m'a fait connaître la vie, qui a supporté mon sale caractère durant mon enfance et qui a su me soutenir jusqu'à la dernière minute de sa vie ma très chère sœur « **Saadia rabi yerhamha** » et ma deuxième maman « **Fathia** ».
- A mon mari Nassim qui m'a aidé pour finir mes études et mes deux cœurs « Louai Assil et Aline » et la famille Ami menée par mon beau-père « Abd el Krime » et ma belle-mère « Sabiha » et la petite chouchoutée « Naila ».
- A mes chères sœurs « Rouaida et Fella » et leurs enfants : « Enfale, Alae, Tassnime, Ikhlassa, Ritadje, SaedEl Barae ». et les jumelle « Ibtihale et Widjdane ».
- A mes frères Salah Eddine et Tarik et mes neveux « Med Abd el Ilah, Doriane et Mahdi Abdelkader ».
- A mon oncle Kader et la famille Trabelsi et la famille Kelloud « Nezha et Dalila » a leurs tête ma grand-mère **TOUMA**.
- A la famille Boukhlifeyahia surtout « Rawia et Hada ».
- A mes amis : Sarah, Hadjira et à la mémoire de Romaissa rabi yerhamha

Trabelsi FZ Akila.

Résumé

Au vu de la propagation du phénomène de résistance et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens est devenue plus qu'indispensable.

Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives.

Grace à sa situation géographique et la diversité des conditions pédologiques et climatiques, l'Algérie dispose d'un potentiel floristique et fruitier susceptible d'être exploité dans les sciences pharmaceutiques.

Dés l'antiquité, l'homme s'est intéressé aux agrumes, Très riches en vitamine C, possédant des vertus médicinales ; les agrumes en général et les citrons en particulier sont non seulement savoureux mais également excellents pour la santé.

L'huile essentielle de citron est employée comme désaltérant, possédant des propriétés antimicrobiennes, toniques, stimulantes, carminatives, diurétiques et antispasmodiques (Bardeau, 2009)

L'objectif de cette étude est d'établir une revue bibliographique :

- sur la valorisation des huiles essentielles et en particulier celle du citron.
- sur les procédés d'extraction.
- une synthèse des méthodes mettant en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

Summary

In view of the spread of resistance phenomenon and the limited number of antibiotics in development, the discovery of new antibacterial agents has become more indispensable.

Search tracks are numerous but the exploration of natural resources seems more promising because they constitute, by their biodiversity, the largest reserve of active substances.

Thanks to its geographical location and the diversity of soil and climatic conditions, Algeria has a floral and fruit potential could be exploited in the pharmaceutical sciences.

Since antiquity, man has been interested with citrus, very rich in vitamin C, with medicinal properties; citrus fruits in general and lemons in particular are not only tasty but also very healthy.

Lemon essential oil is used as a refreshing, with antimicrobial properties, tonic, stimulant, carminative, diuretic and antispasmodic (Shingle, 2009)

The objective of this study is to establish a bibliographic review:

- the valuation of essential oils and in particular that of lemon.
- the extraction processes.
- a summary of methods highlighting the antibacterial activity of essential oils.

ملخص

نظرا لانتشار ظاهرة المقاومة وعدد محدود من المضادات الحيوية في التنمية، أصبحت أكثر غنى عنه اكتشاف عوامل مضادة للجراثيم جديد.

مسارات البحث كثيرة ولكن التنقيب عن الموارد الطبيعية يبدو أكثر إشراقا لأنها تشكل، من خلال تنوعها البيولوجي، وهو أكبر احتياطي من المواد الفعالة.

وبفضل الموقع الجغرافي وتنوع التربة والظروف المناخية فالجزائر لديها إمكانية استغلال الموارد كالأزهار والفاكهة في العلوم الصيدلانية.

منذ العصور القديمة، كان الرجل مهتما بأشجار الحمضيات الغنية جدا بفيتامين C، ذات الخصائص الطبية فالحمضيات بشكل عام والليمون على وجه الخصوص ليست لذيذة فحسب، بل أيضا تأمن الصحة الجيدة للإنسان.

يستخدم زيت الليمون باعتباره منعش، مع خصائص مضادة للميكروبات، منشط، منبه، طارد للريح، مدر للبول ومضاد للتشنج (ألواح، 2009).

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد مراجعة الببليوغرافي:

• تقييم الزيوت الأساسية وعلى وجه الخصوص زيت الليمون.

• عمليات الاستخراج.

• ملخص لأساليب تسليط الضوء على النشاط المضاد للبكتيريا من الزيوت الأساسية.

CHAPITRE I :
GENERALITES SUR
LES HUILES
ESSENTIELLES

Historique :

L'utilisation des huiles essentielles remonte à l'antiquité, c'est autour du bassin méditerranéen que la science médicale va quasiment s'établir avec les grandes civilisations (égyptienne, grecque, puis romaine)

Cependant ce sont les textes égyptiens qui apportent les descriptions les plus détaillées, les plantes étaient utilisées dans tous les domaines de la vie, pour fabrication des parfums, des cosmétiques, mais aussi pour l'embaumement des défunts.

Cette dernière utilisation révèle la parfaite maîtrise par les égyptiens des vertus antibactériennes et antiputrides de certaines huiles essentielles.

Les pays arabes vont faire progresser considérablement l'aromathérapie 1000 ans avant J-C ; les perses ont inventé la distillation, mais, il faudra attendre 2000 ans pour que ce procédé soit sensiblement perfectionné, c'est IBN SINA (Avicenne 1, médecin et philosophe 980-1037, qui produit la première huile essentielle pure ; c'est une huile essentielle de roses.^[1]

I.1-Définition :

D'après Naves (1974), les huiles essentielles sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale.

La norme AFNOR NF T 75-006(2000), donne comme définition de l'huile essentielle : « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau , soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Cette définition paraît encore restrictive car elle exclut de nombreux procédés d'extraction très utilisés dans le domaine pharmaceutique de l'industrie cosmétique et agro alimentaire.

Selon la pharmacopée européenne (2002) la matière première végétale peut être fraîche, sèche et entière à l'exception des fruits du genre citrus qui sont toujours traités à l'état frais.

I.2-Localisation des huiles essentielles :

Parmi les espèces végétales (800.000 à 1.500.000 selon les botanistes) 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent d'infimes quantités d'essences aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants des huiles essentielles sont répartis dans un nombre de familles limité.

exemple : myrtarac, laurac, lamiarac.....(Bruneton, 1999).^[2]

D'après Bruneton (1995), la synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont souvent associées à la présence de structures histologiques particulières qui sont généralement localisées sur site ou à proximité de la surface végétale : ^[3]

- cellules isolées à huile essentielle Lauraseae ou de Zingiberaseae.
- Poils secteurs de Lamiaseae.
- Poches sécrétrices des Myrtaseae.
- Canaux secteurs des Asteraseae.

I.3-Composition chimique des huiles essentielles :

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une HE est variable. La plupart sont poly-moléculaires, c'est-à-dire composées d'une grande diversité de molécules (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'HE de Rose). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces.

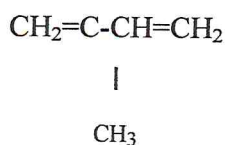
I.3.1-Les familles chimiques des HE :

Les composés d'une HE appartiennent à deux groupes :

- Les composés terpéniques.
- Les composés aromatiques.

a- Les composés terpéniques :

Les terpènes doivent leur nom à Kekulé (ter=térébenthine 'pène=pin). Ce sont des composés formés de l'assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques (2-méthylbuta- 1,3-diène), unité composée de cinq carbones isopréniques selon l'arrangement suivant .



- **Les monoterpènes C₁₀**

Ce sont des hydrocarbures volatils présents dans la quasi-totalité des HE ; ils peuvent être acycliques (Myrcène, Ocimène), monocyclique (p-Cymène, a-Terpinène) ou bicyclique (Camphène, Sabinene, Pinènes, 3-Carène).

- **Les sesquiterpènes C₁₅**

Ils sont constitués de trois éléments isopréniques, disposés de façon à donner des structures monocycliques ou polycycliques.

b- Les composés aromatiques :

Les HE renferment aussi des composés odorants de type phénylpropanoïdes qui empruntent une voie biosynthétique différente de celle des terpènes.

Parmi les composés aromatiques les plus rencontrés dans les HE on peut citer :

- Les aldéhydes cinnamiques, cuminique et anisiques.
- Les phénols et éthers (thymol, carvacrol, eugénol).
- Les alcools (linalol).

c- Les composés d'origines diverses :

Selon le mode de récupération utilisé, les HE peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydro distillation : acides (C3-C10), aldéhydes, esters acycliques et lactones.

I.4 -Variabilité de la composition des HE :

Une HE est très variable dans sa composition chimique sur laquelle intervient un grand nombre de paramètres, selon les principaux facteurs de variabilité de cette composition sont :

•L'origine géographique de la plante :

La composition d'une HE varie avec le terroir et le climat. Il importe donc, à défaut de la composition, de connaître l'origine géographique de la plante.

Une même plante suivant son biotope donne des chémotypes différents. C'est ainsi que l'HE du thym de variété *Thymus vulgaris*, suivant l'aire de cueillette peut être à chémotype thymol ou carvacrol et avoir des propriétés bactéricides, à chémotype géraniol avec des propriétés fongicides, ou encore à chémotypelinalol avec des propriétés spasmolytiques.

• La partie de la plante :

Encore une précision à donner car suivant qu'il s'agit de la plante entière, de la fleur, des racines ou des graines, l'HE n'a pas la même composition.

•La récolte :

Influent également sur la qualité des HE la météorologie au moment de la récolte, l'heure de la récolte et la période de végétation. Il ne faut pas récolter par temps couvert ou humide, sous peine de nuire à la qualité.

Une HE de menthe ne présente pas la même composition selon qu'elle soit préparée

à partir de plantes récoltées le matin, au milieu ou en fin de journée.

- **Le type de culture :**

Il faut noter s'il s'agit de plantes sauvages donnant des produits généralement plus actifs récoltées loin de régions polluées, ou de plantes cultivées, ces dernières devant être de culture naturelle ou biologique, car les produits organiques utilisés comme pesticides ou désherbants passent à la distillation.

- **Le procédé d'extraction :**

Le procédé d'extraction peut modifier la composition de l'HE. Ainsi, lors de l'**hydro distillation** plusieurs perturbations peuvent avoir lieu, en particulier sous l'effet de la température et la durée d'extraction.

1.5-Toxicité des HE :

Une utilisation prolongée des HE à thuyones (Thuya, Absinthe, Sauge officinale) est neurotoxique. Ces huiles 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 moins restrictifs.

En général, chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves (troubles digestifs, hypotension, hypothermie, confusion mentale) le plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'HE (10 à 30 ml) : Girofle (eugénol). Eucalyptus.

CHAPITRE II :
LES CITRUS

Introduction :

Les « Citrus », plus communément appelés agrumes occupent aujourd'hui la seconde place dans les échanges mondiaux des produits végétaux, avec environ 105 millions de tonnes, sur la période 2000-2004. Les oranges constituent plus de la moitié (58%) de la production d'agrumes.

Le bassin méditerranéen est en tête pour la production d'oranges douces et amères ; il partage la première place avec l'Asie pour les mandarines et avec l'Amérique du Nord pour les pamplemousses (FAO, 2004).^[4]

II.1- Le citronnier :

Le citron est un agrume, fruit du citronnier (*Citrus limon*) de la famille des rutacées.

L'arbuste a 5 à 10 mètres de haut, à feuilles persistantes. Le fruit a une écorce lisse jaune, sa chair est juteuse et très acide. De l'écorce on extrait une huile essentielle qui contient diverses substances entre autres le limonène et le citral. Sa pulpe sert à préparer l'acide citrique (Dung N.X et al, 1996).^[5]

Il existe plusieurs espèces d'agrumes largement consommées et utilisées industriellement de par le monde. Les plus importants sont :

- L'oranger doux *Citrus Sinensis*, natif du Sud-Est asiatique, qui s'est répandu dans la plupart des régions tropicales et subtropicales et dont les très nombreux cultivars occupent une place prépondérante dans le commerce et l'industrie des fruits frais, jus de fruits, essences et parfums,
- Le mandarinier *Citrus nobilis*, introduit plus tardivement en Europe et en Amérique les clémentiniers, obtenus en 1902 en Algérie, qui sont des hybrides mandarine x orange et dont les fruits n'ont plus de pépins.
- Le bigaradier *Citrus aurantium*, ou oranger amer dont on tire différentes essences (néroli, petit-grain, fleur d'oranger) et dont le fruit est utilisé en confiserie.
- Le bergamotier *Citrus Bergamia*, dont on extrait de l'acide citrique et une essence qui entre dans la fabrication de l'eau de Cologne. Parmi les autres *Citrus* importants, il faut signaler le cédratier *Citrus medica* et le citronnier *Citrus Limonum*, qui contiennent de fortes quantités d'acide citrique.
- Le pamplemoussier *Citrus Maxima*, originaire de Polynésie et de Malaisie.
- La lime *Citrus Aurantifolia* aux fruits très acides (7 à 8% d'acide citrique), riche en vitamine C.

- Le pomelo *Citrus Paradisi*, issu d'une mutation du pamplemoussier ou de son hybridation avec un oranger (Fleisher Z ; Fleisher A ;1991 in Ferhat AM et all ;2010) ^[6]

II.1.1-Les différentes variétés du citron :

Les variétés de citronnier les plus exploitées sont sélectionnées selon un ou plusieurs de ces trois critères :

- le rendement en fruits,
- la qualité du jus de citron,
- et la résistance de l'arbre aux principales maladies parasitaires.

Les cinq principales variétés de *Citrus limon* (L.) Burman sont : Euréka ou des 4 saisons, Lisbon, Femminello, Monachello et Verna

La variété Euréka est la variété la plus cultivée en Californie et celle qui parait la plus intéressante en Algérie comme fruit d'été, avec un beau fruit oblong, à base arrondie, chair dense, fine, peu ou pas de pépins, la maturation tardive à lieu de juin à octobre (Ferhat MA et all, 2010) ^[7]

Il existe quelques variétés de moindre importance comme les citrons Villafranca, Royal Messine, Napoléon ou Olivia. D'autre part, des variétés horticoles sont sélectionnées par greffage ; leur multiplication réalisée par voie asexuée, a le grand intérêt de maintenir l'intégrité des caractères génétiques de la variété sur plusieurs générations. ^[8]

II.2- Systématique :

La systématique du citron selon Fournet J(2002) est rapporté dans le tableau 1

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Série	Disciflores
Sous série	Diplostémones
Ordre	Télébenthines
Sous ordre	Zygophyllacées
Famille	Rutaceae
Sous famille	Auranthioideae
Genre	Citrus
Espèce	Limonum L.

Tableau 1 :La systématique du citron (Fournet J.,2002)

II.3 -Usage médicinal du citron :

Principaux effets : désinfecte, assainit, antirhumatismal, lutte contre la fièvre.

- Il élimine 30% de glucose dans le sang (bon pour les diabétiques).
- Le jus de citron combat le rhume, la grippe, les infections, et traite les maux de gorge.
- Le citron soignait le Scorbut (carence en vitamine C) bien avant la découverte de la vitamine C.
- C'est un tonique du foie et du pancréas.
- Il combat les ulcères et améliore l'appétit.
- En cosmétologie il est utilisé dans les masques faciaux pour régénérer la peau, l'application de son jus est une forme populaire de traitement de l'acné, il sert à éclaircir et unifier le teint.
- Il favorise la désintoxication de l'organisme de différentes toxines.
- Il contient de puissants flavonoïdes (antioxydants) qui pourraient jouer un rôle contre les maladies dégénératives de cerveau comme l'Alzheimer

- Son action sur les parois des vaisseaux sanguins aide à prévenir les troubles circulatoires.

II.3- Composition chimique de l'HE de citron:

L'huile essentielle du citron est extraite à partir de l'écorce du fruit par différentes méthodes, le rendement et la qualité de l'huile varient selon la condition climatique et la nature du sol, le moment de la récolte et le procédé d'extraction (Lahlou M, 2004).^[9]

La composition de l'huile essentielle de citron, telle que retrouvée dans la littérature est représentée dans les tableaux 2 et 3 : (seuls les composés les plus abondants sont cités)

Famille de composés	Composé	Pourcentage (%)
Mono terpènes	Limonène	58.30
	P-pinène	16.10
	γ-terpinène	11.87
	Sabinène	3.24
	α-pinène	2.71
	Myrcène	1.64
	Terpinolène	0.54
Monoterpénols	Linalol	0.15
Aldéhydes terpéniques	Géranial	0.73
	Néral	0.54

Tableau 2 : Composition de l'HE de citron obtenue par hydrodistillation (Pralogan J.C, 1971)

Famille de composés	Composé	Pourcentage (%)
Mono terpènes	Limonène	59.93
	P-pinène	13.97
	γ-terpinène	11.96
	Sabinène	2.60
	α-pinène	2.47
	Myrcène	1.89
	Terpinolène	0.46
Mono terpénols	Linalol	0.11
Aldéhydes terpéniques	Géranial	1.56
	Néral	0.93

Tableau 3 : Composition de l'HE de citron obtenue par expression à froid

II.4- Production mondiale :

Les agrumes sont les fruits les plus produits dans le monde. Les premières estimations réalisées par la FAO font état d'une production mondiale qui fixe 90 millions de tonnes pour la campagne 1997 à 1998.

Les agrumicoles du bassin méditerranéen sont l'Espagne, l'Italie, L'Egypte, le Maroc. La Grèce, l'Algérie et la Tunisie. L'Espagne étant le premier pays producteur avec 5578000 tonnes en 1999. Parmi les producteurs d'agrumes, l'Algérie occupe la 7 ième place (Medjdoub, 1996).^[10]

CHAPITRE III :
PROCEDES
D'EXTRACTION DES
HUILES
ESSENTIELLES

Différentes méthodes d'extraction sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité de certains de leurs constituants pendant les processus de préparation .

De ce fait le choix du procédé d'extraction varie selon plusieurs paramètres à savoir :

- ✓ La nature de la matière première.
- ✓ Le rendement en HE.
- ✓ La fragilité de certains constituants aux T° élevées.
- ✓ L'action de l'eau et sa solubilité dans les solvants organiques .

III.1-Extraction à la vapeur d'eau :

Cette technique repose sur le fait que les huiles essentielles contenues dans la matière végétale sont susceptibles d'être entraînées par la vapeur d'eau. De plus ; leur caractère hydrophobe (non miscibles avec l'eau) permet une séparation relativement aisée après condensation et décantation .^[12]

III.1.1-L'hydrodistillation (distillation à l'eau) :

L'hydro distillation demeure la technique la plus utilisée pour la production d'huile essentielle et elle reste sans doute la plus rentable, compte tenu de l'investissement matériel relativement peu important par rapport à celui des autres techniques et de l'utilisation du bois comme combustible parfois gratuit pour les agriculteurs.

Le procédé correspond à une distillation hétérogène, et consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement du lieu de sécrétion et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales.

La vapeur entraîne les huiles essentielles et cette vapeur sera condensée à l'aide d'un réfrigérant. La décantation se fait dans une ampoule à décanter dans laquelle le mélange (eau+HE) se sépare en deux phases non miscibles.

Les usines de faible production utilisent cette méthode pour retirer les huiles essentielles des fleurs, des feuilles ainsi que des petits rameaux de diverses variétés de L'hydrodistillation peut se faire dans un montage classique, ou à l'aide d'un appareillage tout prêt de type Clevenger (figure 1).^[13]

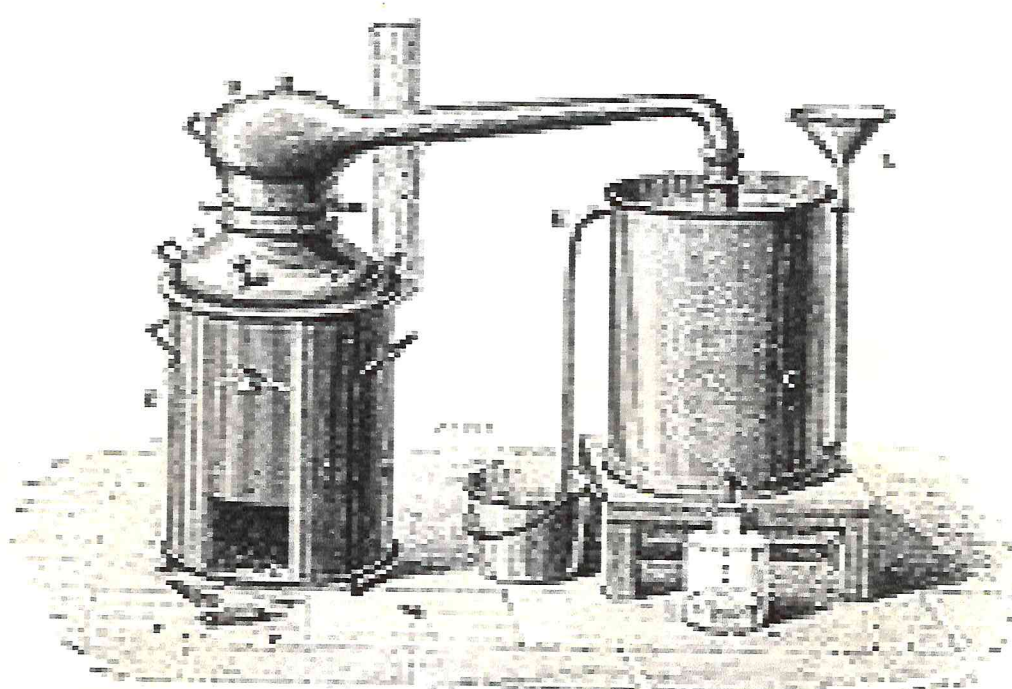


FIG. 1. — Alambic. — A, chauffe-bain; B, chauffe-bain; C, serpentin; D, chauffe-bain; E, chauffe-bain; F, chauffe-bain.

Figure 1 : Montage de l'hydro distillation traditionnelle type Clevenger

III.1.2-L'entraînement à la vapeur :

La distillation par entraînement à la vapeur est une technique utilisable pour certains agrumes et est réalisée dans certains pays uniquement. Pour la commercialisation des huiles essentielles d'agrumes distillées, le procédé d'extraction doit donc figurer sur le flacon, étant donné que la composition chimique est différente de celle exprimée à froid. Les parties de plantes utilisées (écorce, fruit entier) sont déposées sur des grilles dans un récipient appelé alambic, sans que le matériel végétal ne soit en contact avec l'eau

La vapeur d'eau produite par une chaudière traverse les fruits. Ainsi les huiles parfumées contenues dans ces fruits se mélangent à la vapeur d'eau. Celle-ci s'élève alors et entraîne avec elle les parfums. Elle quitte la chaudière en passant dans un col de cygne puis dans un serpentin glacé. Au contact du froid, la vapeur parfumée se condense et devient liquide. Ce liquide, qui est donc formé d'un mélange d'eau et d'huile parfumée, tombe dans un vase florentin. L'huile essentielle est ensuite isolée et récupérée par décantation. ^[14]

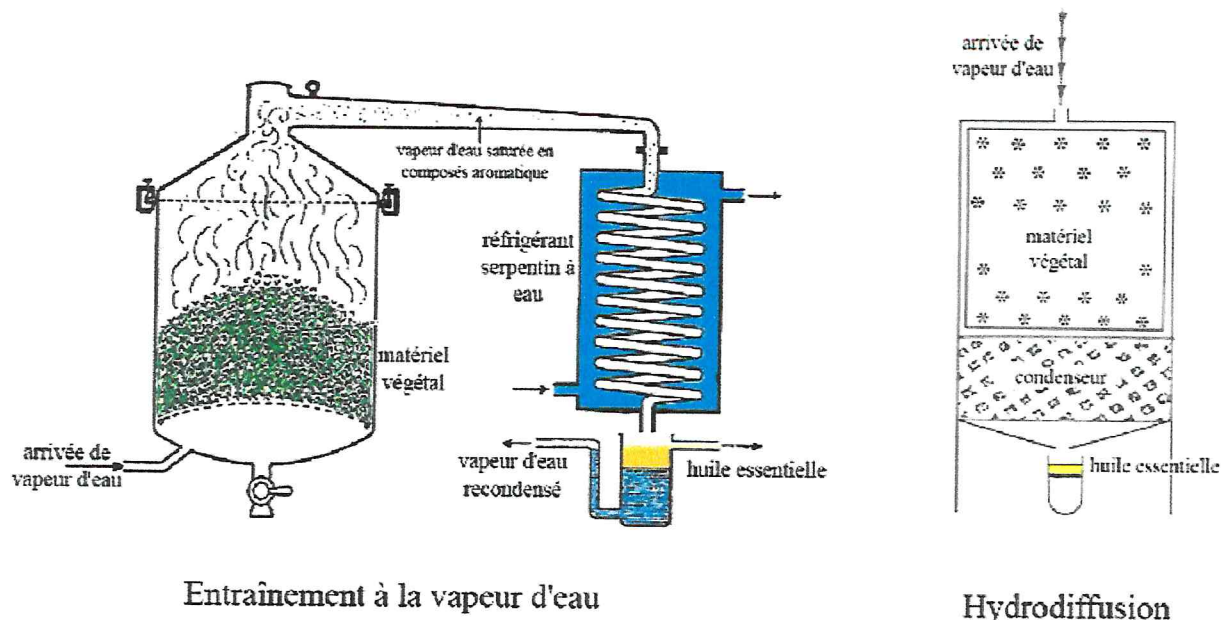


Figure 2 : Montage du dispositif d'entraînement à la vapeur

Il est important aussi de faire la distinction entre le terme « huile essentielle », issue de l'entraînement à la vapeur et le terme « essence » issu de l'extraction par expression à froid.

Cette dernière est chimiquement identique à l'essence naturelle contenue dans les poches oléifères de l'écorce du fruit, tandis que l'huile essentielle est l'essence transformée par la chaleur du procédé de distillation et est basée sur le principe que la plupart des composés volatils odorants sont susceptibles d'être entraînés par des aérosols de vapeur d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. ^[15]

III.1.3-La distillation mixte :

C'est un processus couplant l'entraînement à la vapeur et l'hydro distillation. Au cours de l'extraction, la matière végétale baignant dans l'eau bouillante est traversée par un courant de vapeur d'eau.

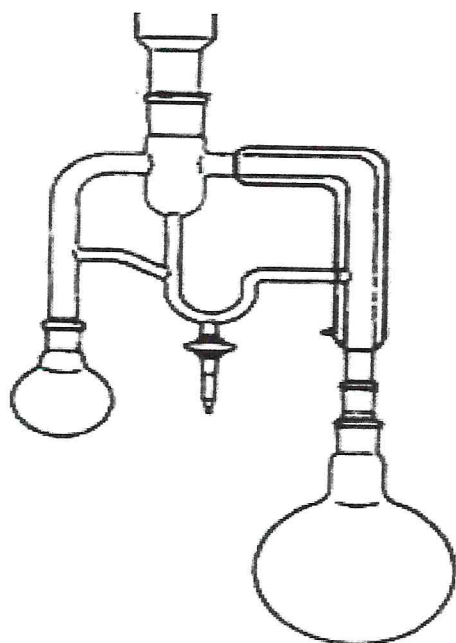
Ce procédé a pour objet de réduire les réactions secondaires subies par l'HE sous l'action de l'eau acide.

III.1.4-L'extraction à l'eau surchauffée :

Ce mode d'extraction utilise l'eau surchauffée sous pression entre 125 et 175°C. Il utilise l'eau désoxygénée qui traverse une cellule où se trouve la matière végétale. Cette cellule est maintenue à une pression d'environ 20 bars et à T° constante dans une étuve. Ce procédé utilisé avec du Romarin donne un rendement plus élève en composés oxygénés que l'entraînement à la vapeur .^[16]

III.1.5-La distillation par extraction simultanée (SDE) :

L'extraction par distillation simultanée ou SDE (Simultaneous Distillation Extraction) est une extraction liquide — liquide qui est mené dans un appareil de Likens et Nikerson modifié. Son principe est le suivant : les composés volatils entraînés à la vapeur d'eau sont extraits par des vapeurs de solvant que l'on condense ensuite dans un réfrigérant puis on recycle en continu Le solvant est un appareillage initialement conçu pour l'étude de la bière, par la suite il à été étendu à un grand nombre d'aromes .^[17]



Lickens-Nickerson

Figure 3 : Montage de distillation-extraction simultanée .

III.1.6-Extraction assistée par micro-ondes :

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid. Le passage des procédés manuels aux machines a entraîné une dégradation de la qualité des essences obtenues, du fait de l'utilisation de grandes quantités d'eau. En effet, l'essence se trouve alors sous forme de gouttelettes dispersées dans une phase aqueuse .

Les inconvénients des méthodes d'extraction conventionnelles ont incité les chercheurs à découvrir de nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles plus performantes, plus rentables et surtout écologiques. L'extraction par micro-ondes répond à ces exigences, en offrant une nouvelle vision de l'extraction et en utilisant des phénomènes nouveaux.

Ce procédé Très rapide et peu consommateur d'énergie, fournit un produit de qualité et de quantité supérieure à celui obtenu par l'hydro distillation. [18]

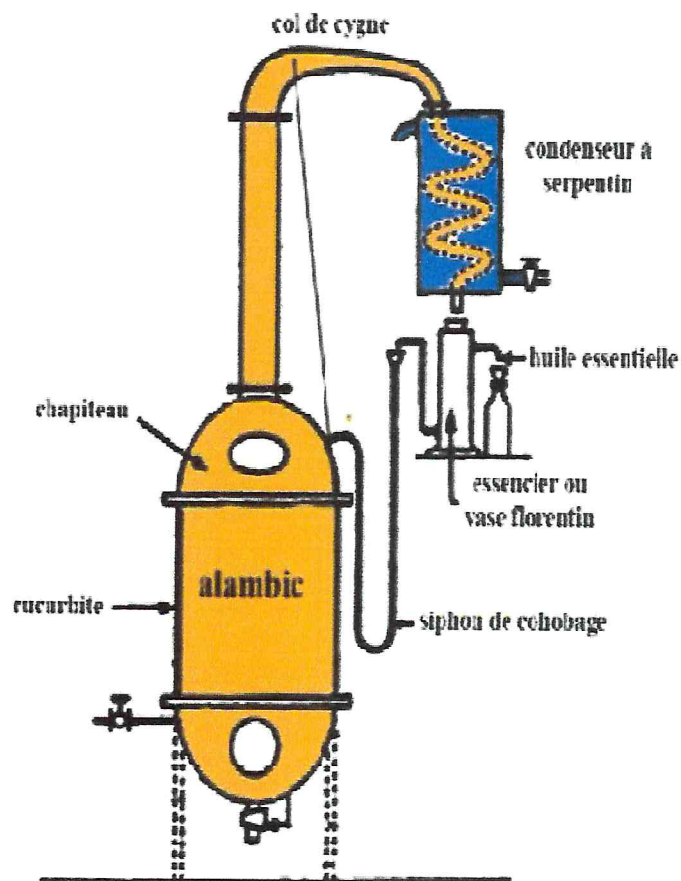
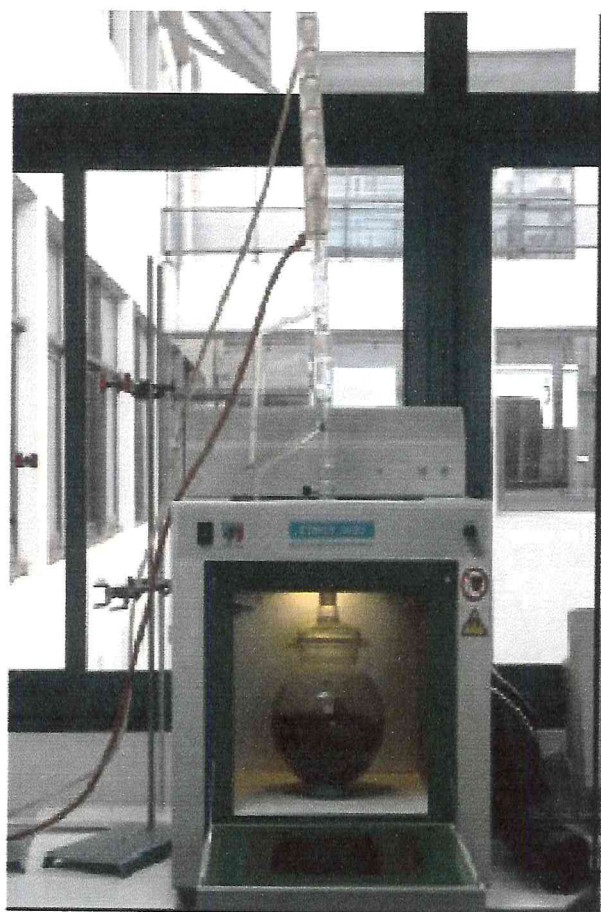


Figure 3 : Dispositif du système de l'hydro distillation sous micro-ondes

III.2-L'extraction au moyen de solvants :

Certaines parties des végétaux, en particulier les fleurs sont fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur et hydro distillation . C'est le cas des fleurs de jasmin, d'œillet ...etc. Il faut donc recourir à d'autres méthodes d'extraction des composés volatils, telles que l'extraction par les solvants fixes (enfleurage et macération) et volatils. ^[19]

III.2.1- Extraction par solvants volatils :

Selon Banthorpe et Charwood (1972), elle consiste à la mise en contact de la matière végétale avec un solvant qui dissout et extrait les constituants odorants solubles de la plante, le solvant ainsi chargé est ensuite évaporé et récupéré.

Les solvants les plus utilisés sont le benzène, l'hexane, les alcools, les cétones, les solvants .

III.2.2-Extraction par solvants fixes :

Les solvants fixes utilisés sont principalement des matières grasses, l'extraction peut être réalisée à froid « procédé d'enfleurage » ou à chaud « macération ou digestion ».

a-Enfleurage :

Ce procédé met à profit le caractère liposoluble des composants odorants des végétaux.

Il consiste à mettre en contact la fleur avec un corps gras qui se sature d'essence puis ce dernier sera épuisé par un solvant évaporé sous vide par la suite.

Cette méthode qui nécessite une importante main d'œuvre n'est utilisée que pour certaines fleurs très fragiles telle que : le jasmin et la tubéreuse. ^[20]

b-Macération :

Ce procédé exige que les graisses utilisées soient chaudes (40-60°C), ce qui a pour effet d'augmenter leur pouvoir adsorbant. Cette technique est rapide et s'applique aux fleurs dont l'activité physiologique cesse à la cueillette. L'extraction est réalisée par immersion des fleurs fraîchement cueillies et constamment renouvelées dans un bac de graisses chaudes jusqu'à atteindre la saturation. Un épuisement à l'alcool absolu est généralement appliqué sur cette graisse. ^[21]

III.2.3- Extraction au CO₂ liquide ou supercritique :

Cette méthode fournit un composé dont les qualités naturelles sont reproduites très fidèlement, et complètement dépourvu de résidus de solvants même à l'état de traces infimes. Elle est donc utilisée dans l'industrie alimentaire notamment pour l'extraction des produits antioxydants des condiments comme la Sauge et le Romarin .^[22]

III.2.4- Extraction au Forane 113 :

D'après Bernard et al. (1998), ce procédé d'extraction permet une exploitation optimale de la matière végétale, la diminution des différents rejets ainsi que la réduction de la consommation énergétique.^[23]

III.3-L'expression à froid :

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid, qui est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères ; cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation. Diverses techniques manuelles ou mécaniques, traitant le fruit entier ou seulement les écorces, sont utilisées.

Il existe deux procédés manuels pour la récupération des huiles essentielles de citrus : le procédé à l'éponge et le procédé à l'écuelle. Le plus connu et celui qui a été le plus utilisé est le « Procédé à l'éponge », appelé encore « Spuggnia » ou « Sfumatura ».

Pratiquée en Sicile et en Calabre, cette méthode est la plus ancienne et donne la meilleure qualité d'essence, loin devant les machines modernes et perfectionnées. Tout d'abord, le fruit est coupé en deux et la pulpe est enlevée à l'aide d'un couteau approprié .

Les écorces sont alors lavées vigoureusement dans une eau additionnée très légèrement de chaux, mises à égoutter et laissées dans des paniers pendant 24 heures. Par ce procédé, les tissus des fruits, en se durcissant, permettent une libération plus facile de l'essence lors de l'extraction manuelle. Un ouvrier frotte régulièrement et vigoureusement une éponge contre toute la surface de l'écorce. L'essence qui jaillit par lacération des glandes à essence, est absorbée par l'éponge qui, lorsqu'on la presse, libère un mélange d'essence et d'eau se séparant facilement par simple décantation.

Dans les meilleures conditions, on ne parvient à retirer que 60% de l'essence totale contenue dans le fruit (Huet R ., Haro-Guzman L.,1979).

Après avoir placé le fruit entre ces deux coupes, une rotation de la partie supérieure va

permettre aux pointes de déchiqueter la partie externe du fruit, les essences sont ainsi libérées des poches sécrétrices. A cause de sa forme, le citron ne peut s'adapter à la machine calabraise classique. En effet, celle-ci entaillerait trop profondément certaines parties de l'écorce alors que d'autres seraient à peine touchées.

C'est pourquoi la structure de la machine a été modifiée de façon à ce que les fruits, en changeant constamment leur position par rapport à la surface abrasive, puissent être travaillés sur toute leur surface .

La Figure 4 : présente la partie fonctionnelle de la machine calabraise.

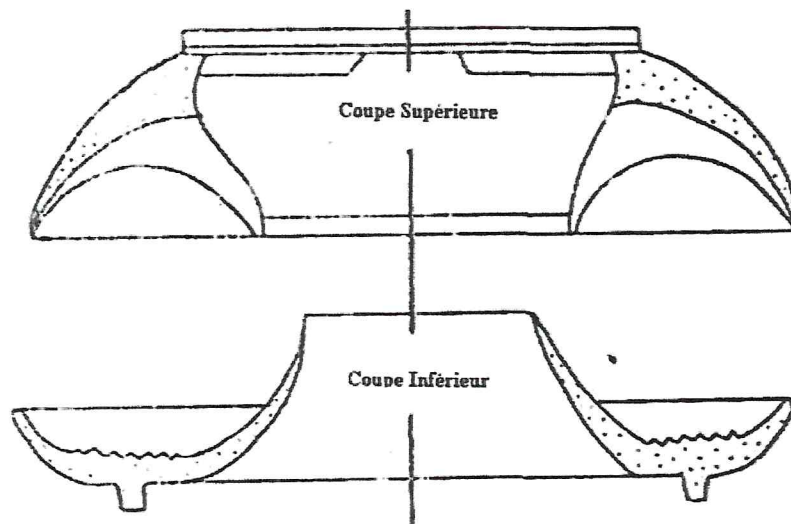


Figure 5 : Machine Calabraise : détails de la partie fonctionnelle

CHAPITRE IV :
LA
CHROMATOGRAPHIE
EN PHASE GAZEUSE
(CPG)

IV.1-Principe :

La CPG est une technique chromatographique qui permet de séparer des mélanges de composés volatiles ou susceptibles d'être volatilisés par chauffage sans décomposition.

Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz vecteur. Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps appelé temps de rétention, qui varie en fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

IV.2-Appareillage de la CPG :

Un chromatographe en phase gazeuse se compose de plusieurs parties:(figure 3) ^[24]

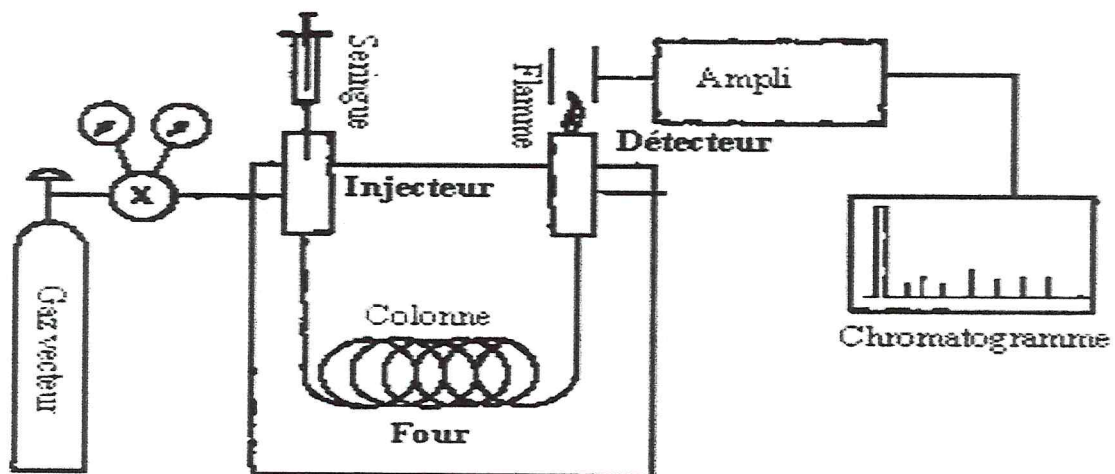


Figure 6 : Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse (Skoog et al.,2003)

IV.2.1-Le four :

Le four (type chaleur tournante) qui permet une programmation de température ajustable de 20 °C à 450 °C et qui est également équipé d'un système de refroidissement rapide.

IV.2.2-Le système d'injection:

L'échantillon est introduit avec une micro-seringue, il a une double fonction : il porte l'échantillon à l'état de vapeur puis il l'amène dans le flux gazeux en tête de colonne.

IV.2.3- La colonne :

Elle est placée dans une enceinte à température régulée, elle se présente sous forme d'un tube de silice, enroulée sur lui-même et de longueur allant de 1 à plus de 60 m. Entraînées par un gaz vecteur inerte, les substances étudiées sont séparées en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire.

IV.2.4-Le détecteur :

il s'agit du module qui va permettre de détecter les composés en sortie de colonne. Pour l'enregistrement du signal émis par le détecteur, des logiciels sur PC remplacent aujourd'hui les enregistreurs analogiques sur papier.

Les temps de rétention de chaque composé dépendent fortement des conditions opératoires (nature de la phase stationnaire, programmation de la température, vieillissement de la colonne, etc.) et ne constituent pas une base suffisante pour une identification certaine.

L'identification des constituants d'un mélange à partir du seul chromatogramme n'est réalisable que dans le cas où ces derniers seraient parfaitement connus et où en fait, le profil chromatographique est comparé à un profil standard.

Néanmoins, il est fréquent d'observer des écarts entre les données obtenues au laboratoire et celles de la littérature. Ainsi divers couplages de la CPG avec des techniques spectroscopiques ont été développées dans le but de rendre plus fiables l'identification des composés(Tranchant et al., 1995). [25]

CHAPITRE V :
LE POTENTIEL
ANTIMICROBIEN DES
HUILES ESSENTIELLES

V.1-Principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles :

La technique de détermination de l'activité antimicrobienne des HE a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants de ces huiles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

- Selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'HE, soit liquide, solide ou gazeux ;
- Selon la nature du contact de THE avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant

V.1.1-Techniques par contact direct :

Elles consistent à mettre en présence de l'HE les microorganismes, puis d'observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide.

L'aromatogramme ou encore méthode des disques consiste à utiliser des disques imprégnés d'HE sur une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les bactéries se développent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'HE suffisante pour inhiber leur croissance.

On observe ainsi autour des disques une zone circulaire sans colonies appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

V.1.2-Micro atmosphère :

Cette méthode dérive de la précédente, la différence réside principalement dans la position du disque imprégné. Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience (Figure).

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum.

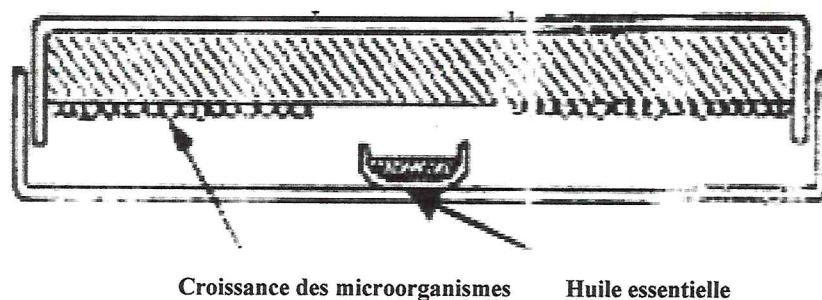


Figure : Illustration de la méthode des micro atmosphère

L'inconvénient de cette méthode c'est qu'elle ne montre que l'activité des constituants volatils à température d'incubation, et non de l'HE elle-même.

V.1.3- La CMI et CMB :

La plus faible concentration qui inhibe la croissance est appelée concentration minimale inhibitrice « CMI » (Perry et al., 2004). Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricide, de ce fait, une partie de l'inoculum sera capable de se développer après disparition du composé inhibiteur.

Ceci a amené à définir un autre paramètre, la « CMB » (concentration minimale bactéricide) qui est déterminée en milieu liquide par l'évaluation des colonies survivants après élimination du composé inhibiteur.

V.1.4-Méthode du puit au cylindre :

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puit en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable.

La méthode consistait à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution d'HE de concentration connue. L'HE diffusant radialement créait une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose.

V.1.5-Méthodes de dilution et micro méthode :

Pour la méthode de contact en milieu liquide, il faut disperser les HE dans une solution de détergent (Tween 80) ou solubiliser les HE dans l'éthanol avant de les introduire dans le bouillon de culture ensemencé en micro-organismes. ^[25]

Avec des solvants (éthanol) ou des détergents (Tween 20 ou 80), la dispersion des HE dans les milieux liquides est homogène et la diffusion dans les milieux gélosés est meilleure ; toutefois :

- Il est délicat de déterminer le meilleur détergent ou le meilleur solvant ;
- Il est difficile de choisir les bonnes concentrations pour obtenir des CMI et CMB reproductibles et répétables ;
- Les CMI et les CMB obtenues dans ces conditions sont-elles dues aux HE seules, ou au mélange des HE avec les détergents ni solvants
- Selon les détergents et les solvants et selon les concentrations auxquelles ils sont employés, les CMI et les CMB varient.

Pour résoudre ces problèmes, Remmal et al.,(1993) ont mis au point une méthode de dispersion des HE sans détergents ni solvants. Son principe est de rendre le milieu légèrement visqueux ou colloïdal par une solution d'agar – agar à 2% afin d'empêcher les molécules d'HE dispersées de se rassembler à nouveau. Ce dispositif est repris par Mann et Markham (1998), dans une micro méthode.

Il est ainsi possible d'obtenir des émulsions d'HE parfaitement stables et homogènes, sans avoir recours à d'autres molécules dont l'effet secondaire serait à craindre. Néanmoins, le problème de volatilisation des constituants des HE en cours d'étude existe toujours et doit être pris en compte par la réalisation de témoins adaptés. ^[26]

V.2-Facteurs influençant l'action antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs qui la favorisent ou l'inhibent :

V.2.1-Nature et état du microorganisme :

Toutes les espèces ne sont pas également sensibles vis-à-vis d'une substance, et dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Un agent microbien est caractérisé par son spectre d'activité, c'est-à-dire le nombre d'espèces vis-à-vis desquelles son pouvoir bactériostatique ou bactéricide s'exerce.

L'état physiologique de la bactérie joue aussi un grand rôle : les microorganismes sont plus sensibles en phase exponentielle qu'en phase stationnaire envers les antimicrobiens chimiques. Les formes sporulées sont beaucoup plus résistantes aux agents physiques ou

chimiques que les formes végétatives.

V.2.2-Nature de l'agent antimicrobien :

Les différents agents ont une efficacité et un spectre d'activité variables. Pour les agents physiques, l'activité microbicide augmente souvent avec le traitement alors que pour les agents chimiques, les effets seront d'abord bactériostatiques puis bactéricides.

V.2.3-Rôle de l'environnement :

L'environnement conditionne l'activité de l'agent antimicrobien, qu'il s'agisse du milieu de culture dans lequel se développe l'expérience, de l'objet ou du matériel l'on veut désinfecter. Parmi ces facteurs, on peut citer : la T°, le pH, la turbidité, la viscosité et la dureté de l'eau .

V.3-Activité antimicrobienne des HE :

. L'activité antimicrobienne des HE se trouve à la base des médecines dites alternatives et de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits .

D'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés « généralement reconnus comme sains » ou approuvés comme additifs alimentaires par la *Food and Drug Administration*.

L'activité des HE est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant, des études ont montré que certains constituants chimiques des HE ont des propriétés bactéricides et fongicides.

CONCLUSION

GENERALE

Conclusion Générale

L'usage excessif d'agents antimicrobiens chimiques dans la médecine humaine, dans les élevages d'animaux ainsi qu'en industrie alimentaire conduit à la sélection de nouvelles souches plus résistantes. Ainsi, les HE commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives.

L'activité biologique d'une HE est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants.

L'activité des HE est souvent réduite à l'activité de ses composés 'majoritaires ou ceux susceptibles d'être actifs. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique.

Dans la perspective de poursuivre et d'approfondir ce travail, il serait intéressant de :

- **Procéder à l'extraction de l'huile essentielle de citron à travers différents procédés d'extraction et d'en apprécier le rendement.**
- **D'évaluer les principaux composés chimiques par CG-MS**
- **D'étudier l'activité antibactérienne**
- **De déterminer les CMI et les CMB**

Liste des figures :

Nbr figure	Le nom de la figure	Num de page
Figure1	Montage de l'hydro distillation traditionnelle type Clevenger	13
Figure2	Montage du dispositif d'entrainement à la vapeur	14
Figure3	Montage de distillation-extraction simultanée	16
Figure4	Dispositif du système de l'hydodistillation sous micro-ondes	16
Figure5	Machine Calabraise : détails de la partie fonctionnelle	19
Figure6	Schéma d'un chromatographe en phase gazeuse	21
Figure7	Illustration de la méthode des microatmosphère	25

Liste des tableaux :

Num figure	Le nom de la figure	Num de page
Tableau 1	La systématique du citron	8
Tableau 2	Composition de l'HE de citron obtenue par hydrodistillation	9
Tableau 3	Composition de l'HE de citron obtenue par expression à froid	10

Références bibliographiques

- [1]. **Pharmacopée européenne, 2002** huiles essentielles .CDROM.
- [2]. **Bruneton J**, 1999.pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales.Ed Lavoisier ,3 Ed, Paris .585P.(technique et documentation).
- [3]. **Bruneton 1995**.pharmacognosie, phytochemistry, medicinal plants. Ed lavoisier. PARIS.P915 (Technique et Documentation).
- [4]. **FAO** : Food Agriculture Organisation , 2004.
- [5]. **Dung nx, Pha NM., Thien NH., Leclercq PA**. Chemical investigation of the fruit peel oil of *Citrus medica* L var. *sarcodactylis*, *J.essent.oilRes* ; 1996,8,15-18.
- [6]. **Fleisher Z ; Fleisher A** .The essential oil of Ethrog (*Citrus edica*L.var.ethrogEngl). *Aromatic Plants of the Holy Land and Sinai*, part VI, *J.Essent.Oil Res.*,1991,3,377-379.
- [7]. **Ferhat ma, Meklati by et Chemat f,-** *Citrus* d'Algerie, les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction –OPU- 2010
- Source :<http://www.kasraoui.com/Secteur-Agricole/Agrumes-Citronnier.html>
- [8]. **Fournet, J. 2002**. Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique. Nouvelle édition revue et augmentée. CIRAD, Montpellier - Gondwana Editions, La Trinité. 2538 pp.
- [9]. **Lahloum**, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils, *phytothérapie research*, vol 18, p435-448,2004.
- [10]. **Praloganj.c.** les agrumes.maison neuve g.p et **Larose**, édit Paris, 1971.
- [11]. **Medjdoub F.1996**. Biologie de l'aleurode floconneux, *Aleurothrixus floccosus* Maskell(Homoptera, Aleurodidae) dans un verger d'agrumes de la région de DrâaBenKhedda (Tizi-Ouzou).Magistère en Biologie et écologie des populations .Université Mouloud Mammeri ,73.
- [12]. **Guenther R**, *The essential oils*. Ed Robert Krieger publishing, New York. 182p
- [13] **La Ruelle R**, *Un vent de fleurs dans l'art du parfum*. Paris, Le temps apprivoisé.1993.105-125.
- [14] **Lucchesi ME, Chemat F., Smadja J 2004**. Solvent –free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs :comparaison with conventional hydrodistillation .*J.ChromatogrA* 1043, 323-327
- [15] **Cocorin N.,Guerin C** .Valorisation Chimique du végétal ;les agrumes, 2003
- [16] **Vermin G., 1982**.Arômes alimentaires :Développement récents. Ed.Apria,Paris.308P
- [17] **Bruneton J., 1999** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed lavoisier 3 ième Ed .Paris . 585P (Technique et Documentation)
- [18] **Banthrope DV et Charwood BV., 1972**.Chemistry of terpinene and terpenoids. Ed.A.A new academic press, London and new York, 374p.
-

Références bibliographiques

- [19] **Bruneton J., 1995.** Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Ed lavoisier .Paris . 915P (Technique et Documentation)
- [20] **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Ed lavoisier .Paris . 2^{ème} Ed.623P (Technique et Documentation)
- [21] **Blakeway J et Salerno M. 1987.** Pour la science Ed . Institut des renseignements techniques et scientifiques, Paris.
- [22] **Basil A .,Jimenez-Carmona M et Clifford A.A., 1998.** Extraction of Rosmary by superheated water. Journalof Food chemistry, Vol 46, n.12,p.5205-5209.
- [23] **Skoog D.A.,Holler F.G et NiemanT.A.** Principes d'analyses instrumentales. Ed De Boeck Université. Paris.956p.2003
- [24] **Tranchant J.,Arpinaud P.,Prevot A.,Serpinet J., Vergnol A et Witier P.,** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4 ième Ed. Ed Masson , Paris, 700p,1995.
- [25] **Fournier G.,Habib J.,Reguigla A.,Safta F Guetari S.,Chemli R .** Plantemedicinal et phytotherapie. Pp180-185, 1983..
- [26] **Remmal A., Bouchiki T., RhayourK .,EttayebiM.** Improved methode for the determination of antimicrobial activity of essentiel oils in Agar medium. J.Essent.Oil Res 1993.
- Mann CM., Markham JL., New method for determining inhibitory concentration of essential oils.J .Appl. Microbial.,Vol 30.pp:294-297.1998.
-