

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA 1**  
**Faculté de Technologie**  
**Département de Génie Des Procédés**

**THESE DE DOCTORAT**

Spécialité : Chimie industrielle

Valorisation de l'huile essentielle *d'Aloysia triphylla (L'Hérit)*

Par

**Benouaa Fatma Zohra**

Devant le Jury composé de:

HADJ-ZIANE A.	Professeur	Université Blida 1	Présidente
BOUTEMAK K.	MCA	Université Blida 1	Examinatrice
HACHAMA K.	MCA	Université de Khemis Miliana	Examineur
HANINI M.	Professeur	Université de Médéa	Examineur
BRADA M.	Professeur	Université de Khemis Miliana	Co-encadreur
BEZZINA M.	Professeur	Université Blida 1	Directeur de thèse

**Blida, 2021**

## Résumé

Le but principal de cette recherche est l'extraction, l'analyse de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* et sa valorisation biologique. L'extraction par hydrodistillation des feuilles *Aloysia triphylla* récoltées à différentes périodes a fourni une huile essentielle avec un rendement de 0,2 - 0,35%. Après avoir déterminé ses caractéristiques physiques et organoleptiques, l'identification par CG/SM de cette huile essentielle a montré sa richesse en aldéhydes, spécifiquement en néral et en géranial avec des teneurs plus importantes au printemps (20,62%, 27,57%) qu'en automne (15,95%, 19,16%) respectivement. La thionation de ces aldéhydes a été réalisée par action de P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> sur l'huile extraite dans le but d'améliorer ses propriétés biologiques étudiées par la suite. La caractérisation de cette dernière par les différentes méthodes spectroscopiques a montré la conversion des groupements carbonyles en thiocarbonyles, ceci a été observé dans leur spectre IRTF par la disparition du pic caractéristique de la fonction C=O situé à 1672 cm<sup>-1</sup> et l'apparition d'un pic situé à 989 cm<sup>-1</sup> relatif à la fonction C=S, ces résultats sont confirmés par l'analyse CG/MS où la disparition totale du géranial et du néral a été observé avec l'apparition de nouveaux produits thionés (5-Isopropenyl-2-méthyl-cyclohex-2-énethione, 2-Isopropyl-5-méthyl-cyclohexa-2,5-dienethione, 6-Isopropyl-3-méthyl-cyclohexa-2,4-dienethione et le 2-Isopropyl-5-méthyl-benzenethiol) identifiés par leurs spectres de masse. À cause de la grande réactivité des thioaldéhydes, ces derniers ont été cyclisés. L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles native et thionée vis-à-vis de deux souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) et une souche fongique (*Candida albicans*) a montré l'efficacité de l'huile essentielle thionée par rapport à l'huile native avec des diamètres d'inhibition plus importants allant de 26 à 32 mm vis-à-vis d'*Escherichia coli* et de 36 à 40 mm contre *Candida albicans*. Le même phénomène a été observé en étudiant l'activité insecticide de ces huiles essentielles par fumigation contre la souche *Sitophilus oryzae* où la mortalité de tous les insectes exposés à l'huile essentielle thionée après 1 heure d'exposition a été observé, tandis que l'huile native n'a montré son efficacité qu'après 22h. L'huile essentielle thionée pourrait être utilisée comme un bio-pesticide.

**Mots clés :** *Aloysia triphylla*, hydrodistillation, huile essentielle, GC/MS, thionation, activités biologiques.

## ملخص

الهدف الرئيسي من هذا البحث هو التقييم البيولوجي و تحليل التركيب الكيميائي للزيت العطري ل *Lippia citriodora*. أدى التقطير المائي لأوراق نبتة اللوزة التي تم حصادها في مواسم مختلفة (أبريل-مايو وسبتمبر) إلى استخلاص زيتاً أساسياً أصفر بمرود متوسط يقدر ب 0.2 % و 0.35 % على التوالي. بعد تحديد الخصائص الفيزيائية للزيت الأساسي لأوراق نبتة اللوزة أثبت التحليل الكيميائي بواسطة CG / SM ثراءه بالألدهيدات, خاصة neral و geranial بمحتويات أعلى في الربيع ( 20.62 % ، 27.57 %) من الخريف ( 15.95 % ، 19.16 %) على التوالي.

تم تعديل هذه الألدهيدات بتأثير  $P_2S_5$  على الزيت المستخرج بهدف تحسين خواصه البيولوجية ، والتي تمت دراستها لاحقاً ؛ أظهر تحليل الزيت المعدل بالطرق الطيفية المختلفة تحويل وظيفة الكربونيل إلى ثيوكربونيل ، وقد لوحظ هذا في طيف IRTF الخاص بهم من خلال اختفاء الذروة الخاصة لوظيفة الكربونيل  $C = O$  الواقعة عند 1672 سم<sup>-1</sup> وظهور ذروة تقع عند 989 سم<sup>-1</sup> خاصة بوظيفة الثيوكربونيل  $C = S$ . تم تأكيد هذه النتائج من خلال تحليل CG / MS حيث لوحظ الاختفاء الكلي للألدهيدات مع ظهور مشتقات كبريتية جديدة ( Isopropenyl-2-methyl--5-cyclohex-2-enethione ، 2-Isopropyl-5-methyl-cyclohexa-2 ، 5-dienethione ، 6-Isopropyl-3-methyl-cyclohexa-2 ، 5-methyl-cyclohexa-2-dienethione and 4-methyl-benzothiol) ، أدى التفاعل العالي للثيوألدهيدات و عدم استقراره إلى تحويل هذه الأخيرة إلى مركبات حلقية. أظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات للزيوت العطرية الأصلية والثيونية ضد سلالتين من البكتيريا ( *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* ) وسلالة فطرية ( *Candida albicans* ) فعالية الزيت العطري الثيوني مقارنة بالزيت الأصلي مع أقطار تثبيط أكبر تتراوح من 26 إلى 32 ملم ضد *Escherichia coli* ومن 36 إلى 40 ملم ضد *Candida albicans*. لوحظت نفس الظاهرة من خلال دراسة النشاط المبيد للحشرات لهذه الزيوت الأساسية عن طريق التبخير ضد سلالة *Sitophilus oryzae* حيث لوحظ موت جميع الحشرات التي تعرضت للزيت الأساسي الثيوني بعد ساعة من التعرض ، بينما أظهر الزيت الأساسي الأصلي فعاليته بعد 10 ساعات من التعرض.

الكلمات الأساسية: *Lippia citriodora* ، التقطير المائي ، الزيت العطري ، GC / MS ، thionation ، الأنشطة البيولوجية

## Abstract

The main objective of this research is the biological valorization and the chemical composition analysis of the essential oil of *Lippia citriodora*. Extraction of the essential oil of *Lippia citriodora* leaves harvested in different seasons (April-May and September) by hydrodistillation provided a essential oil with an average yield of 0.2% and 0.35% respectively. After the determination of its physical and organoleptic characteristics, the identification of this essential oil by GC / MS showed its richness in aldehydes, specifically in neral and geranial with higher contents in spring (20.62%, 27.57%) that at autumn (15.95%, 19.16%) respectively. The thionation of these aldehydes was carried out by the action of P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> on the extracted oil in order to improving its biological properties; the conversion of the carbonyl group into thiocarbonyl was observed in their FTIR spectrum by the disappearance of the characteristic peak of the carbonyl C=O group located at 1672 cm<sup>-1</sup> with the appearance of new peak at 989 cm<sup>-1</sup> relating to the thiocarbonyl C=S group; these results were confirmed by CG / MS analysis where the total disappearance of geranial and neral was accompanied with the appearance of new thionylated products (5-isopropenyl-2-methyl-cyclohex-2-enethione, 2-isopropyl-5-methyl-cyclohexa-2,5-dienethione, 6-isopropyl-3-methyl-cyclohexa-2,4-dienethione and 2-isopropyl -5 -methyl-benzenethiol) identified by their mass spectra. Because of the high reactivity of thioaldehydes, the latter were cyclized. The evaluation of the antimicrobial activity of native and thionylated essential oils against two bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) and one fungi (*Candida albicans*) showed the effectiveness of the thionylated essential oil compared to the native oil with larger inhibition diameters ranging from 26 to 32 mm against *Escherichia coli* and from 36 to 40 mm against *Candida albicans*. The same phenomenon was observed by studying the insecticidal activity of these essential oils using fumigation method against the *Sitophilus oryzae* strain, where the mortality of all insects exposed to the thionylated essential oil was reported after 1 hour of exhibition, while the native oil showed its effectiveness after 10 hours.

**Key words:** *Lippia citriodora*, hydrodistillation, essential oil, GC / MS, thionation, biological activities.

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A la mémoire de mon père

A ma chère mère

A mon cher mari

A mes frères et sœur

A tous ceux qui me sont chers

## Remerciements

Avant toute chose, je remercie DIEU, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour dépasser toutes les difficultés durant la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Monsieur le Professeur BEZZINA Mohamed, enseignant à l'université de Blida1 qui m'a dirigé tout au long de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes remerciements les plus chaleureux à Monsieur le Professeur BRADA Moussa de l'université de Khemis Miliana pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour son soutien et son aide précieuse tout au long cette thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Madame HADJ ZIANE Amel, Professeur à l'université de Blida 1 pour m'avoir honoré en acceptant de présider ce jury de thèse. J'exprime ma profonde gratitude et tous mes remerciements aux examinateurs: le Professeur HANINI Mohamed, de l'université de Médéa, le docteur HACHAMA Kamel de l'université de Khemis Miliana et Docteur BOUTEMAK Khalida de l'université de Blida 1 d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Je remercie Monsieur BOUTOUMI Hocine ; enseignant à l'université de Blida 1 pour son aide, un grand merci pour ses conseils et ses encouragements relatifs au bon déroulement de cette thèse.

Et enfin je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à réaliser ce travail.

## Table des matières

CHAPITRE 1: LA MATIERE VEGETALE : <i>Lippia citriodora</i> ou <i>Aloysia triphylla</i> .....	4
1.1.Étude de quelques espèces de genre <i>Lippia</i> .....	4
1.2.Propriétés biologiques de quelques espèces du genre <i>Aloysia</i> .....	5
1.3. <i>Aloysia triphylla</i> .....	5
1.3.1 Présentation de l'espèce <i>Aloysia triphylla</i> .....	6
1.3.2 Place dans la systématique botanique.....	7
1.3.3 Histoire.....	7
1.3.4 Noms communs.....	7
1.3.5 Habitat et culture de <i>L. Citriodora</i> .....	8
1.3.6 Variétés et espèces.....	8
1.3.7 Récolte et séchage de <i>L. Citriodora</i> .....	9
1.3.8 Principaux pays producteurs et exportateur de la verveine.....	9
1.3.9 Marché de <i>L. Citriodora</i> .....	9
1.3.10 Composition chimique de <i>L. Citriodora</i> .....	10
1.3.11 Propriétés pharmacologiques.....	11
CHAPITRE 2 : THIONATION DE L'HUILE ESSENTIELLE.....	13
2.1. Modification chimique des huiles essentielles.....	13
2.1.1 Généralités sur la thionation.....	13
2.1.2 Méthodes de synthèse.....	15
2.1.3 Thioaldéhydes en synthèse chimique.....	20
CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES.....	21
3.1. Matériel.....	21
3.1.1 Matériel végétal.....	21
3.1.2 Produits chimiques.....	21
3.1.3 Matériel Biologique.....	22
3.1.4 Matériel spectroscopique.....	24
3.2. Méthodes.....	25
3.2.1 Extraction de l'huile essentielle.....	25

3.2.2 Détermination des indices physiques.....	27
3.2.3 Chromatographie sur couche mince.....	28
3.2.4 Thionation de l'huile essentielle.....	29
3.2.5 Activité antibactérienne.....	29
3.2.6 Activité insecticide.....	32
CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	34
4.1 Extraction de l'huile essentielle de <i>L. Citriodora</i> .....	34
4.1.1 Rendement en huile essentielle.....	34
4.1.2 Caractérisation de <i>L. Citriodora</i> .....	34
4.2. Thionation de l'huile essentielle de <i>L. Citriodora</i> .....	42
4.2.1 Caractérisation par CCM.....	42
4.2.2 Caractérisation par UV-vis.....	43
4.2.3 Caractérisation par IR.....	43
4.2.4 Caractérisation par CGMS.....	44
4.3. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle native et modifiée.....	47
4.4. Résultats de l'évaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle native et modifiée.....	49
CONCLUSION.....	51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1:</b> exemples de quelques espèces du genre <i>Aloysia triphylla</i> .....	4
<b>Tableau 1.2 :</b> Activités biologiques de quelques espèces de genre <i>Aloysia</i> .....	5
<b>Tableau 1.3.</b> Systématique de la plante <i>Lippia citriodora</i> .....	7
<b>Tableau 1.4 :</b> Espèce de <i>Lippia</i> .....	9
<b>Tableau 3.1 :</b> Les microorganismes testés .....	22
<b>Tableau 3.2 :</b> Conditions opératoires (automne) d'analyse GC/MS de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> .....	24
<b>Tableau 3.3 :</b> Conditions opératoires (printemps) du GC/MS de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> .....	25
<b>Tableau 4.1 :</b> Rendements d'extraction de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> .....	34
<b>Tableau 4.2:</b> Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de <i>L citriodora</i> .....	35
<b>Tableau 4.3 :</b> Caractéristiques physiques de l'huile essentielle de <i>L. citriodora</i> .....	35
<b>Table 4.4 :</b> Composition chimique de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> (floraison).....	38
<b>Tableau 4.5 :</b> Composition chimique de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> (croissance végétative: Avril-Mai).....	40
<b>Tableau 4.6 :</b> Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> .....	42
<b>Tableau 4.7 :</b> Composition chimique de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> modifiée.....	45
<b>Tableau 4.8:</b> Résultats des tests d'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des huiles essentielles thio-cyclisées (mm) * .....	48

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b> : L'espèce <i>Lippia citriodora</i> .....	8
<b>Figure 1.2</b> : Structure chimique du géranial et du néral.....	10
<b>Figure 2.1</b> : Structure générale des thioaldéhydes.....	13
<b>Figure2.2</b> : Thionation avec le sulfure d'hydrogène.....	15
<b>Figure2.3</b> : P <sub>4</sub> S <sub>10</sub> .....	15
<b>Figure2.4</b> : l'hexamethyldisiloxane.....	16
<b>Figure2.5</b> : Réactif zwitterionique du P <sub>4</sub> S <sub>10</sub> dans la pyridine.....	16
<b>Figure 2.6</b> : Schéma de Thionation des cétones par P <sub>4</sub> S <sub>10</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	17
<b>Figure 2.7</b> : Réactif de Lawesson; 2,4-disulfure de 2,4-bis (4-méthoxyphényl)-1,3-dithia-2,4-diphosphétane.....	17
<b>Figure 2.8</b> : Mécanisme de réaction avec RL.....	18
<b>Figure 2.9</b> : Structure chimique de réactif de Davy.....	19
<b>Figure 2.10</b> : Mécanisme de réaction avec le réactif de Davy.....	19
<b>Figure 2.11</b> : Réactif de Belleau.....	20
<b>Figure 2.12</b> : Synthèse de 1,4,2-Oxathiazoles[108].....	20
<b>Figure 2.13</b> : Réaction de cycloaddition cationique. [4+2][109].....	20
<b>Figure 3.1</b> : <i>Lippia citriodora</i> .....	21
<b>Figure3.2</b> : Bactéries et levure vues sous microscope.....	22
<b>Figure 3.3</b> : Cycle de vie de <i>Sitophilus oryzae</i> [113].....	23
<b>Figure 3.4</b> : Dispositif d'hydrodistillation.....	26
<b>Figure 3.5</b> : Principe de la méthode de diffusion par disque.....	31
<b>Figure 3.6</b> : Boite pour l'application insecticide.....	33
<b>Figure 4.1</b> : Spectre UV-vis de l'HE de <i>L.citriodora</i> .....	36
<b>Figure 4.2</b> : Bande d'absorption IR de l'HE <i>L. citriodora</i> .....	36
<b>Figure 4.3</b> : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> (floraison).....	37
<b>Figure 4.4</b> : Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> (croissance végétative: Avril-Mai).....	39
<b>Figure 4.5</b> : Comparaison de la composition chimique de l'HE a différentes périodes.....	41
<b>Figure 4.6</b> : Spectre UV-Vis de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> thionée (a), et native dans le méthanol (b).....	43

<b>Figure 4.7:</b> Spectre IR de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> modifiée.....	44
<b>Figure 4.8 :</b> Chromatogramme de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> modifiée.....	44
<b>Figure 4.9:</b> Réaction de thionation du néral et géraniol.....	46
<b>Figure 4.10:</b> Réaction de thionation du carvone.....	46
<b>Figure 4.11:</b> Réaction de tautomérisation thione–enethiol.....	46
<b>Figure 4.12 :</b> Activité antibactérienne de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée.....	49
<b>Figure 4.13 :</b> Variation du taux de mortalité des insectes traités par l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée en fonction du temps.....	50

## INTRODUCTION GENERALE

L'histoire des plantes médicinales et aromatiques est associée à l'évolution de la civilisation. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des nations montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante dans la médecine, la composition des parfums et les préparations culinaires[1]. La valorisation de ces ressources végétales naturelles se fait essentiellement par l'extraction de leurs huiles essentielles (HE). Les huiles essentielles et leurs composants sont lancés et continuent d'avoir beaucoup d'intérêt en tant que source potentielle de molécules bioactives naturelles; Elles sont à l'étude pour leur utilisation éventuelle comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses et la protection des aliments contre l'oxydation[2, 3]. Actuellement, les huiles essentielles sont utilisées en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie et en cosmétique[4] en raison de leur richesse en composants actifs chargés par une énergie vitale de source naturelle. En Algérie, il existe une diversité végétale importante en raison de la grande variété de biotopes liés aux différences climatiques qui donnent des chances de trouver de nouveaux actifs naturels alternatifs pour les antibiotiques de synthèse ou la conservation des aliments. Elles sont connues pour leurs activités biologiques[5-7] et en particulier leurs activités microbiologiques[8, 9] mais ces activités sont limitées à certaines souches microbiennes à cause de la variabilité qualitative et quantitative de la composition chimique des huiles essentielles[10, 11]. La présence d'un ou plusieurs atomes de soufre au sein d'une molécule est souvent synonyme d'activité biologique voire de toxicité. Son action est reliée à sa réactivité propre ou bien se limite à un rôle purement structural [12]. Le soufre est l'un des éléments les plus importants nécessaires à la vie biologique[13]. Récemment, des dérivés thiocarbonylés isolés des algues marines ont été identifiés pour leurs pouvoirs antibactériens[14] et aussi la thionation des huiles essentielles de l'*Artemisia herba alba* et *Rutamontana* constituées essentiellement de cétones ont révélé des grands pouvoirs antimicrobiens[15]. L'Algérie, de par sa situation géographique, constitue un cadre naturel tout à fait original offrant une gamme complète de bioclimats méditerranéens et sahariens favorisant une flore riche variée avec un endémisme très marqué, induisant une biodiversité des plantes utilisées comme condiments, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques[16]. Parmi les plantes médicinales qui constituent

le couvert végétal, se trouve *Aloysia triphylla*. Cette dernière est utilisée en herboristerie et en industrie de la parfumerie à cause de l'odeur de citron que dégagent les feuilles broyées; son huile essentielle est riche en aldéhydes, particulièrement en citral et en néral. *Aloysia triphylla* est communément connue sous le nom de verveine citronnée, thé arabe et citronnelle. Cette plante pousse spontanément en Amérique du Sud, au Maroc, elle est cultivée depuis plus d'un siècle et a été utilisée en médecine traditionnelle comme préparations de tisane pour ses propriétés antispasmodiques, digestives, gastriques, sédatives et antipyrétiques. L'huile essentielle extraite des feuilles séchées de *Aloysia triphylla* est indiquée pour l'anxiété, le stress, l'insomnie, certaines dépressions, la fatigue nerveuse, la sclérose en plaques, le psoriasis, la tachycardie, les rhumatismes, l'entérocolite, la maladie de Crohn, l'anorexie, la dyspepsie, les parasites intestinaux et comme prévention des crises d'asthme [17-19]. L'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* est connue pour ses activités biologiques et en particulier, ses activités microbiologiques et insecticides, mais malheureusement ces activités sont limitées en raison de la variabilité qualitative et quantitative de la composition chimique de cette huile.

Dans ce contexte et dans le but d'une éventuelle valorisation d'*Aloysia triphylla*, nous nous sommes intéressés à l'huile essentielle de cette plante. Dans un premier temps l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation, une caractérisation physico-chimiques par UV-visible, IRTF et par CGMS. Par la suite une thionation des aldéhydes constituants par  $P_2S_5$ , et enfin l'évaluation des activités biologiques de l'huile native et modifiée.

Ainsi ce manuscrit s'articule autour de deux parties :

- Une étude théorique composée de deux chapitres :
  - Dans la première partie, une étude bibliographique est menée sur la matière végétale, sa composition chimique et les différents travaux réalisés sur cette plante.
  - La deuxième partie est consacrée à la thionation des huiles essentielles.
- Une étude expérimentale composée de trois parties :
  - La première partie est consacrée à l'extraction de l'huile essentielle de la verveine odorante par hydrodistillation récoltée à différentes périodes de l'année, ainsi que de la détermination de leurs propriétés physico-chimiques et organoleptiques et l'identification de sa composition chimique.
  - La thionation des composés carbonylés de l'huile essentielle extraite par action de pentasulfure de phosphore a fait l'objet de la deuxième partie.

-L'étude du pouvoir antimicrobien et insecticide des huiles essentielles natives et thionées est traité dans la troisième partie.

A la fin du manuscrit, une conclusion ainsi que des recommandations et perspectives des travaux de recherche à entreprendre achève notre étude.

## CHAPITRE 1

### LA MATIERE VEGETALE : *Aloysia triphylla* ou *Lippia citriodora*

#### 1.1. Étude botanique de quelques espèces du genre *Aloysia*

*Aloysia* est un genre végétal qui regroupe près de 200 espèces d'herbes, d'arbustes et de petits arbres à fleurs de la famille des *Verbenaceae* originaires d'Amérique appartient à la famille des *Verbenaceae* [20, 21].

Ces tiges peuvent être à quatre angles et lisses lorsqu'elles sont fraîches, devenant plus anguleuses ou arrondies et souvent sillonnées ou striées avec l'âge. Les feuilles sont persistantes ou caduques pendant la saison sèche. Elles sont souvent disposées de manière opposée ou verticillée, mais peuvent être alternées ou groupées. Les lames sont de formes variables, dentées ou à bords lisses et glabres à rugueuses sur les surfaces supérieures. Le fruit est un schizocarpe[22].

Tableau 1.1: Exemples de quelques espèces du genre *Aloysia*

Espèce	Règne	Genre	Nom commun	Origine
<i>Aloysia sonorensis</i> <i>Moldenk</i>	Plantae	<i>Aloysia</i> Juss	-	Amérique de nord
<i>Aloysia polystachya</i>	Plantae	<i>Aloysia</i>	verveine menthe d'Argentine	Amérique de sud
<i>Aloysia virgata</i>	Plantae	<i>Aloysia</i>	buisson d'amande douce	Amérique de sud
<i>Aloysia gratissima</i>	Plantae	<i>Aloysia</i>	-	Mexique, aussi au Texas, Arizona aux Usa,
<i>Aloysia sellowii</i>	Plantae	<i>Aloysia</i>	-	Amérique de sud
<i>Aloysia citrodora</i>	Plantae	<i>Aloysia</i>	Verveine odorante	d'Amérique du Sud (Pérou, Bolivie, Chil i, Uruguay, Équateur et Argentine)

### 1.2. Propriétés biologiques de quelques espèces du genre *Aloysia*

La plupart des plantes de cette famille sont traditionnellement utilisées comme remèdes pour les problèmes gastro-intestinaux et respiratoires.

Plusieurs espèces du genre *Lippia* possèdent des propriétés biologiques telles que l'activité antioxydante, antibactérienne, antifongique, antivirale et anti-inflammatoire [20-33] Notre synthèse sur les travaux de la littérature concernant les activités biologiques a touché six espèces de ce genre; les données récoltées sont présentées dans le tableau 1.2

**Tableau 1.2 :** Activités biologiques de quelques espèces de genre *Aloysia*

N°	Noms scientifiques (organes utilisés)	Types d'activités biologiques	Références
1	<i>Aloysia sonorensis</i>	Activité antiproliférative	[23]
2	<i>Aloysia polystachya</i>	Activité ovicide, insecticide, troubles gastro-intestinaux, douleur, nausée, vomissements, dyspepsie et gastrite, activité antimicrobienne.	[24-27]
3	<i>Aloysia virgata</i>	Activité antimicrobienne, carminative, diaphorétique, stimulant, stomachic, tonic, anticatarrhal and antirheumatic, Activités du système nerveux central	[28-30]
4	<i>Aloysia gratissima</i>	Activité anesthésique, activité anti-inflammatoire, activité antimicrobienne, activité antioxydante, activité neuroprotectrice.	[31-35]
5	<i>Aloysia sellowii</i>	Activité antimicrobienne	[36]
6	<i>Aloysia citrodora</i>	effets antioxydants, anxiolytiques, neuroprotecteurs, anticancéreux, anesthésiques, antimicrobiens et sédatifs	[37]

### 1.3. *Aloysia triphylla*

*Aloysia triphylla* (une verveine citronnée) est la plus connue de ce genre, elle est principalement distribuée en Amérique du Sud, en Afrique du Nord, en Europe du Sud et dans la région nord de l'Iran [21, 38] et a une longue histoire en tant que remède populaire



contre le rhume, l'asthme, les coliques, la fièvre, la diarrhée, l'indigestion, l'insomnie, l'anxiété[21, 39, 40]. Elle est généralement cultivée pour l'arôme citronné émis par ses feuilles, qui sont utilisées pour préparer des tisanes, le plus souvent sous forme de décoction ou d'infusion administrée par voie orale [41]. On pense que l'huile essentielle et les composés phénoliques de *L.citriodora* sont responsables des propriétés pharmacologiques, y compris l'activité anti-inflammatoire, antimicrobienne et antitumorale. L'extrait de *L.citriodora* contient également plusieurs composés phénoliques, tels que les phénylpropanoïdes et les flavones glycosylés [42, 43]. Les phénylpropanoïdes sont les composés les plus répandus dans l'extrait de verveine citronnée. Les Verbascosides, et les glycosides phénylpropanoïdes sont les plus abondants dans la verveine, ces derniers possèdent de nombreuses caractéristiques biologiques, y compris les actions antioxydantes, anti- bactérienne, anti-tumorale et antifongique[44, 45].

### 1.3.1. Présentation de l'espèce *Aloysia triphylla*

La verveine odorante (*Aloysia triphylla* ou *Lippia citriodora*) est un sous-arbrisseau de la famille des Verbénacées, originaire d'Amérique du Sud, introduit et cultivé sur le pourtour méditerranéen (midi de la France et Afrique du Nord). Originaire d'Amérique du sud, la verveine odorante est cultivée sous les climats tempérés comme plante aromatique et ornementale ainsi que pour les feuilles, utilisées en phytothérapie, récoltées à la fin de l'été ; elle possède des propriétés similaires à celle de la mélisse. Le genre *Lippia* montre une grande diversité génétique, ce qui lui permet de synthétiser une variété de constituants de l'huile essentielle dans des plantes cultivées dans les différentes parties du monde[46]. Il s'agit d'un arbrisseau vivace ramifié pouvant atteindre 1 à 5 m de hauteur[47], dont les tiges anguleuses et cannelées portent des feuilles rudes, courtement pétiolées, verticillées par 3. Les fleurs disposées en épis possèdent 4 pétales soudés à la base en un tube et étalés en 4 lobes bicolores : blancs sur la face externe et bleu violacé sur la face interne[48]. Les rameaux sont récoltés peu avant la floraison, rassemblés en bouquets puis séchés. Les feuilles sont mondées une fois séchées puis consommées en infusion[49]. La verveine odorante est utilisée en herboristerie et en industrie de la parfumerie à cause de l'odeur de citron que dégagent les feuilles broyées [50].

### 1.3.2. Place dans la systématique botanique

*Lippia citriodora* est répertoriée comme suit :

**Tableau 1.3.**Systématique de la plante *Lippia citriodora*.

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Sous règne</b>	Trachéobionta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Sous classe</b>	Asteridae
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Verbénacées
<b>Genre</b>	<i>Lippia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Lippia citriodora</i>

#### Noms Vernaculaires :

- **Nom scientifique :** *Lippia citriodora*.
- **Nom français :** verveine vraie, verveine citronnée ou verveine du Pérou.
- **Nom en arabe :** Louizalaymunia, « لويضة ليمونية »
- **Nom en Allemand:** Citronenkraut, Zitronenkraut, Zitronenverbene.
- **Nom en Grande Bretagne :** Lemonverbena, Herb Louisa, LemonBeebrush, Lemon- scentedVerbena.
- **Nom en Italie:** Cedrina, Cedronella, Erba-Luigia, Verbenaodorosa

### 1.3.3. Histoire

La littérature botanique montre une variété de noms, y compris *Lippia citriodora*, *L.triphylla*, *Verbena triphylla* et *Aloysia triphylla*. Un botaniste français a publié une description en 1784, et un botaniste espagnol en 1785, en le nommant *Aloysia* en l'honneur de Maria Luisa princesse de Parme et épouse de Charles IV d'Espagne. En Amérique du Sud, les botanistes lui donnèrent le nom du genre Lippi, en mémoire d'un naturaliste italien d'origine française, Augustin Lippi, assassiné en Abyssinie en 1709[51].

### 1.3.4. Noms communs

*Lippia* vient du nom de Lippi, un botaniste du XVIIème siècle; le terme *citriodora* signifie : « à odeur de citron». Cette plante possède aussi les noms suivants: Verveine citronnelle, verveine à trois feuilles, thé arabe, herbe Louise. La verveine odorante possède plusieurs nominations suivant les langues courantes de chaque pays.

- Allemagne: Citronenkraut, Zitronenkraut, Zitronenverbene.
- France : Herbe-Louise, Verveine citronnelle, Verveine citronnée, Verveine du Pérou.
- Grande Bretagne : Lemonverbena, Herb Louisa, LemonBeebrush, LemonVerbena,
- Lemon-scentedVerbena.
- Italie: Cedrina, Cedronella, Erba-Luigia, Verbenaodorosa



**Figure 1.1** : L'espèce *Aloysia triphylla*

#### 1.3.5. Habitat et culture de *L'Aloysia triphylla*



La verveine odorante est cultivée sous les climats tempérés comme plante aromatique et ornementale, ainsi que pour ses feuilles, utilisées en phytothérapie. Celles-ci sont récoltées à la fin de l'été. Elle s'accommode sur tous les types des sols et exige une quantité d'eau importante[38]. La verveine odorante s'acclimate d'un sol perméable, bien drainé et des endroits ensoleillés ou semi- ombragés, abrités des vents froids. Elle exige un sol frais en été, sans excès d'humidité qui entraîne la pourriture de ses racines. Elle doit être paillée en hiver pour la protéger du gel, car elle ne supporte pas les températures inférieures à 4 °C[46].

#### 1.3.6. Variétés et espèces

Il existe deux espèces de verveines utilisées en herboristerie qui font aujourd'hui partie de deux genres différents :

- La verveine commune (*Verbena officinalis*), plante inodore à feuilles opposées par deux.
- La verveine odorante (*Verbena triphylla* ou *Lippia citriodora*) encore appelée verveine citronnelle[52].

**Tableau 1.4 : Espèces de Verveine.**

Nom Français	Nom latin	Principes actifs	Activités Pharmacologiques	Partie concernée	Photos
Verveine	<i>Verbena officinalis</i>	Verbenalol	Eupeptique Antalgique Antispasmodique	Tiges+ Feuilles	
	<i>Verbena triphylla</i>	Citral Z	Anti-inflammatoire Antinévralgique Antidépresseive Sédative	Feuilles	

### 1.3.7 Récolte et séchage de *L'Aloysia triphylla*

La récolte est effectuée à la faucille et consiste à couper à 10-15 cm à partir du début des pousses de l'année. Il y a deux périodes de coupe :

- Mai-Juin : lorsque 50% des plantes ont fleuri ;
- Fin Juillet-Aout. Une troisième récolte peut avoir lieu 1 à 2 mois après la 2<sup>ème</sup> récolte. Le rendement varie de 1,5 à 3 t/ha en verveine sèche pour les deux coupes. Une fois la récolte est effectuée, on procède au séchage des feuilles et à leur séparation des tiges.

### 1.3.8. Principaux pays producteurs et exportateurs de la verveine

- Les pays producteurs sont le Mexique, le Chili, le Brésil, le pourtour méditerranéen (Maroc, Algérie, Turquie, France et Israël), l'Afrique du sud et l'Inde.
- Les pays exportateurs sont le Chili, Israël et le Maroc[46].

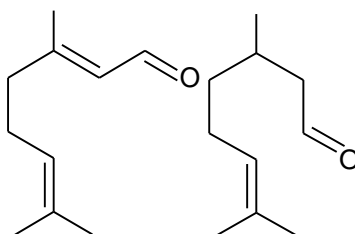
### 1.3.9. Marché de *L'Aloysia triphylla*

Le marché est réservé principalement pour la consommation en herboristerie mais aussi pour la production de l'huile essentielle. Le kilogramme de plante sèche varie de 5 à 10 euros. Celui de l'essence était d'environ 15 000 euros/kg. Actuellement il se situe entre 7 000 et 10 000 euros/kg en fret et de 12 000 euro/kg en Bio[46].

### 1.3.10. Composition chimique de l'huile essentielle de *L'Aloysia triphylla*

L'huile essentielle de *Lippia citriodora* est particulièrement riche en citral. Elle a un aspect liquide, limpide, épais, une couleur jaune pâle à foncée et une odeur agréable citronnée.

Elle est obtenue par hydodistillation de ses feuilles. L'étude menée par [53] sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* de la région de Settat (Maroc) est majoritairement composée de limonène (25,86 %) suivi par gèranial (15,63 %) et néral (15,29 %), accompagné de faibles quantités de D-germacrène (4,0 %),  $\beta$  caryophyllène (3,0 %),  $\beta$ -ocimène (3,0 %) et sabinène (3,0 %). [54] ont étudié l'huile essentielle de la région de Gizeh (Égypte), la composition chimique de cette HE est constituée principalement de citral (14,21 %),  $\beta$ -caryophyllène (10,71 %), 1,8-cinéole (9,1 %), citronellol (8,87 %), iso menthone (6,43 %),  $\alpha$ -bergamotène (5,33 %), menthonol (5,10 %) et p-cymène (4,23 %). En Jordanie, [55] ont mis en évidence les principaux composés : limonène (17,7 %), 1,8-cinéole (11,7 %), gèranial (10,1 %), néral (9,8 %),  $\alpha$ -curcumène (6,3 %) et spathulenol (4,6 %). L'huile essentielle de *Lippia citriodora* Syrienne [56] est également composée de gèranial (25,6 %) et de néral (19,4 %) comme produits majoritaires ; les autres composés sont : le  $\beta$ -caryophyllène (8,74 %), le D-Germacrene (5,91%), le  $\gamma$ -Elemene (5,84%) et le Ar-curcumene (4,95%). Par ailleurs, les principaux constituants de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* cultivée en Turquie [57] ont été déterminés comme étant, le limonène (30,33%), le trans-citral (gèranial) (17 %), le  $\beta$ -caryophyllène (13,6%), et le cis-citral (néral) (12,77 %). L'analyse chimique de l'huile essentielle récoltée dans la région de Kabylie (Algérie) [58] a montré que celle-ci contient comme composés majoritaires le spathulenol (59,45 %), caryophyllène (50,81 %), cis-citral (36,59 %), gèranol (43,23 %), trans-citral (25,37 %), limonène (15,19 %),  $\gamma$ -terpinène (12,34 %), sabinène (7,14 %), et  $\beta$ -pinène (6,62 %). D'autre part, l'huile essentielle de *Lippia citriodora* Algérienne [59] est également composée de limonène (17,72%), gèranial (14,79 %), la carvone (14,22 %) et l'oxyde de caryophyllène (12,38%).



Gèranial

Néral

Figure 1.2 : Structure chimique du gèranial et du néral.

### 1.3.11. Propriétés pharmacologiques

En Amérique du Sud, la verveine odorante a de nombreuses applications, notamment dans le traitement de l'asthme, de la fièvre, de la flatulence, de la colique, de la diarrhée et de troubles digestifs, de l'insomnie et de l'anxiété[60-63]. L'infusion de la verveine odorante est antispasmodique[60], antipyrétique, sédative, digestive, cardiovasculaire et diurétique[64]. Elle est Traditionnellement utilisée dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels que ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence; des états neurotoniques des adultes et des enfants, notamment en cas de troubles mineurs du sommeil[37]. La verveine odorante est également utilisée contre les états nerveux, les palpitations, les migraines, les bourdonnements d'oreille et les vertiges[64]. Au Maroc, elle est utilisée traditionnellement en infusion surtout pour ses propriétés sédatives et myorelaxantes, essentiellement chez le nouveau-né[37]. Une enquête d'ethno pharmacologique au Brésil a montré que l'infusion de *Lippia triphylla* était un remède les plus communs à l'insomnie et l'anxiété. Elle est également recommandé comme analgésique, anti-inflammatoire et anti-oxydante[65, 66]. L'huile essentielle de verveine odorante qui agit comme un sédatif sur le système nerveux, combat les états dépressifs, l'insomnie, les troubles du sommeil, l'anxiété, l'angoisse, la nervosité, les palpitations cardiaques et le stress[60]. Elle abaisse la tension artérielle et chasse les maux de tête et les migraines[64]. Elle soulage les douleurs arthritiques, articulaires, musculaires et rhumatismales. En inhalation, l'huile essentielle de verveine augmente la défense du système immunitaire et combat les affections grippales et la congestion des sinus. En gargarisme, elle soulage la névralgie dentaire et faciale. Vu sa propriété antitoxique, elle est utilisée en applications locales sur les boutons pour inactiver le venin des insectes, inoculé par pique[67].

#### 1.3.11.1. Activité antimicrobienne

L'huile essentielle de *L.citriodora* a montré une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries telles que *Escherichia coli*, *Shigellasonneiet Pseudomonas aeruginosa*[68]. L'activité antibactérienne de L'huile essentielle de *L.citriodora* recueillie à différentes régions d'argentine, a été étudiée. L'HE de La Paz a montré la relation citral / limonène la plus élevée et la meilleure activité antimicrobienne. Les levures ont été les micro-organismes les plus sensibles, suivis des bactéries Gram positives. L'analyse statistique a montré des différences significatives dans l'activité antimicrobienne. Les différences dans l'activité biologique de chaque huile essentielle pourrait être attribuée à la quantité et à la

qualité de la composition terpénique[69]. Les composants  $\alpha$ -citral, limonène et linalol étaient les principaux composants de l'HE d'*Aloysia citriodora*, ont influencé à l'activité antimicrobienne contre des souches bactériennes et fongiques. En résumé, l'efficacité des antibiotiques traditionnels peuvent encore être améliorés. L'utilisation des deux HEs testées comme alternative à l'utilisation d'antibiotiques sont très prometteuses[70].

#### 1.3.11.2. Activité insecticide

L'activité ovicide de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* été testée par application topique à différents concentrations allant de 1,2 à 12,5  $\mu\text{g}$  / œuf; toutes les concentrations ont un effet toxique. L'analyse des données a montré que la valeur de la  $CL_{50}$  était de 1,9  $\mu\text{g}$  / œuf. L'activité insecticide par fumigation a été évaluée dans une chambre, la toxicité augmentait avec la concentration de 11 à 176  $\mu\text{g}$  / mL d'air et avec les temps d'exposition de 1 à 48 h[24]. La toxicité aiguë de cette HE sur les larves de *C. quinquefasciatus* a été évalué et a montré un effet très fort[71].

## CHAPITRE 2

### THIONATION DES HUILES ESSENTIELLES

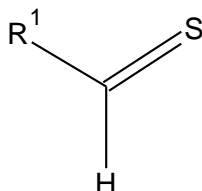
#### 2.1. Modification chimique des huiles essentielles

A l'heure actuelle, le contexte social, économique et réglementaire pousse l'industrie chimique à concentrer ses efforts dans l'optique d'un développement durable. De nouveaux défis s'imposent aux chimistes, comme l'utilisation de ressources renouvelables ou le choix de procédés plus respectueux de l'environnement. Dans cette équation complexe, notre étude vise à proposer des modifications chimiques des huiles essentielles.

##### 2.1.1. Généralités sur la thionation

###### 2.1.1.1. Définition

La thionation est la conversion d'un groupement carbonyle en un thiocarbonyle. Les thio-analogues des composés carbonylés tels que les thioaldéhydes, les thiocétones, les thioesters, les thioamides et les thiolactames sont des intermédiaires importants pour la synthèse de différents composés organosulfurés d'activité biologique intéressante[72, 73].



**Figure 2.1:** Structure générale des thioaldéhydes.

###### 2.1.1.2. Nomenclature

Le nom se déduit de celui de l'hydrocarbure correspondant en ajoutant la terminaison thione, précédé du numéro du carbone fonctionnel (le plus petit possible). Si le groupe thione n'est pas prioritaire, il est désigné par le préfixe thioxo[74].

###### 2.1.1.3. Intérêt

La thionation est l'une des possibilités de modification chimique qui peut influencer sur les activités des composés. Deux différences principales différencient les thiocétones des autres carbonyles : la double liaison (C=S) entre le carbone et le soufre utilise des orbitales de tailles très différentes (2p sur le carbone et 3p sur le soufre), qui ne se chevauchent pas bien à cause des plus hautes énergies des orbitales p du soufre, Les doubles liaisons entre



le carbone et le soufre sont relativement inhabituelles, le groupe thiocarbonyle est plus réactif et a tendance à s'oligomériser et/ou à se polymériser [75].

- S :  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4 3d^0$
- O :  $1s^2 2s^2 2p^4$
- C :  $1s^2 2s^2 2p^2$

De plus, la double liaison entre le carbone et le soufre est moins polarisée du fait d'une différence d'électronégativité plus petite entre ces 2 atomes Ceci réduit la sélectivité en cas d'addition nucléophile[75].

$$\Delta \text{C-O} = 0,89$$

$$\Delta \text{C-S} = 0,03$$

La fonction thiocarbonyle est isoélectronique de la fonction cétone. La double liaison C=S est formée par le recouvrement de l'orbitale 2p du carbone avec l'orbitale 3p du soufre. Elle présente un degré de recouvrement plus faible que la liaison C=O du fait de la différence de symétrie spatiale et de densité entre les orbitales. En conséquence, les dérivés thiocarbonylés présentent une réactivité supérieure et sont moins stables que les groupements carbonyles. De plus, le caractère moins électronégatif du soufre par rapport à l'oxygène, la forte polarisabilité de la liaison C=S et la participation éventuelle des orbitales 3d vacantes sont autant de facteurs qui par leurs effets propres ou cumulés, apportent à la fonction thiocarbonyle une réactivité chimique bien distincte de la fonction cétone [76]. La plus grande instabilité et réactivité des dérivés thiocarbonylés peut expliquer que d'une façon générale ils aient été beaucoup moins étudiés que leurs homologues carbonyles. C'est bien sûr plus particulièrement vrai de la fonction thioaldéhyde. Il convient d'ajouter à ces effets, purement structuraux des effets secondaires liés à l'environnement immédiat : les dérivés thiocarbonylés possèdent une odeur forte et désagréable qui a pu dissuader, directement ou indirectement, des équipes de chercheurs à travailler dans ce domaine[76]. Seuls, les dérivés possédant des substituants à effets électroniques stabilisants sont bien connus. Si des voies de synthèse de dérivés non stabilisés sont connues, elles ne semblent toutefois pas suffisamment générales et efficaces pour que la fonction thiocarbonyle puisse être considérée à l'image de la fonction

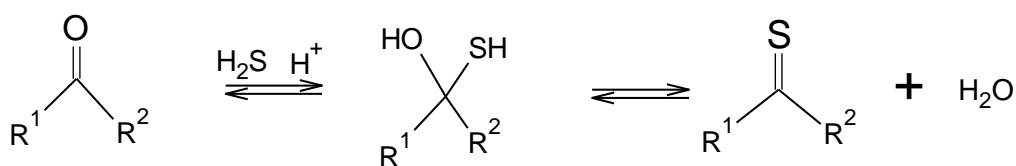
carbonyle, comme une pierre angulaire en synthèse organique. Sa potentialité existe pourtant et l'on constate dans la littérature récente un intérêt renouvelé pour cette chimie[76].

### 2.1.2. Méthode de synthèse

Plusieurs méthodes sont annoncées dans la littérature pour la thionation des composés organiques.

#### 2.1.2.1. Réaction avec le sulfure d'hydrogène

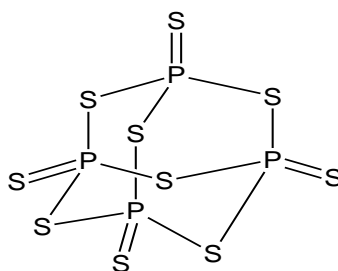
L'utilisation de sulfure d'hydrogène en présence d'un catalyseur acide, en général de l'acide chlorhydrique, est une méthode classique. La réaction consiste en une activation du groupe carbonyle via une protonation qui permet la formation d'un hémiacétalmercapto hydroxyle suivie d'une élimination[77].



**Figure2.2:** Thionation avec le sulfure d'hydrogène.

#### 2.1.2.2. Réaction avec le pentasulfure de phosphore

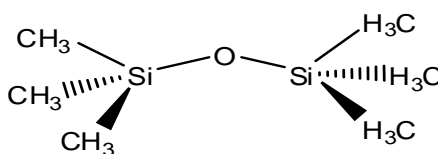
En 1869 le pentasulfure de phosphore était le premier réactif de thionation annoncé par Henry[78] et Wislicenus[79]. Il est connu également sous sa forme  $\text{P}_4\text{S}_{10}$ . Il permet la thionation à des températures plus élevées que le sulfure d'hydrogène. L'inconvénient de ce réactif est sa faible solubilité dans les solvants organiques. Les solvants les plus utilisés dans cette voie de synthèse sont le benzène, la pyridine et le 1,2-dichlorobenzène. La stabilité thermique de ce réactif peut être une de ses plus importantes caractéristiques. Ceci permet de le manipuler à des hautes températures dans la gamme 165-175°C[80].



**Figure2.3 :**  $\text{P}_4\text{S}_{10}$

### 2.1.2.2.1. Combinaison de pentasulfure de phosphore et de l'hexaméthylidisiloxane

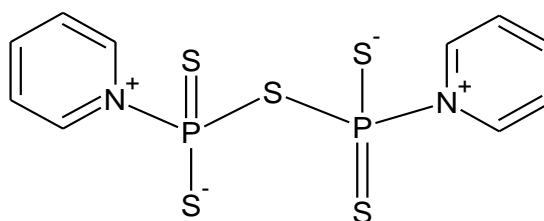
Récemment Curphey[81, 82] a montré que la combinaison de  $P_4S_{10}$  et de l'hexaméthylidisiloxane convertit efficacement les esters, les lactones, les amides, les lactames et les cétones à leurs dérivés thiono correspondant avec des rendements comparables ou supérieurs à ceux obtenus avec le réactif de Lawesson[83].



**Figure 2.4:** l'hexaméthylidisiloxane

### 2.1.2.2.2. Thionation avec le complexe $P_4S_{10}$ – pyridine dans des solvants

Bien que le  $P_4S_{10}$  dans la pyridine a été utilisé pour thioner les composés carbonylés pendant des années, sa structure n'a été déterminée que récemment. Il réagit facilement avec de la pyridine à chaud pour former un zwitterion[84, 85]. Dans d'autres travaux, il a été évoqué que le  $P_4S_{10}$  peut être solubilisé dans l'acétonitrile et même dans le DMSO.



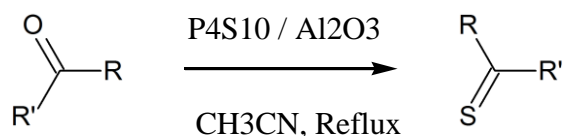
**Figure 2.5 :** Réactif zwitterionique du  $P_4S_{10}$  dans la pyridine.

### 2.1.2.2.3. Thionation avec le pentasulfure de phosphore dans l'alumine

Une méthode simple, efficace et nouvelle a été développée pour la synthèse de thioaldéhydes par thionation des aldéhydes en utilisant  $P_4S_{10} / Al_2O_3$  dans l'acétonitrile. Il a été trouvé que la combinaison d' $Al_2O_3$ /

$P_4S_{10}$  concerne un procédé simple et commode pour la synthèse des thioaldéhydes. Ces dernières années L'utilisation des réactifs et des catalyseurs supportés sur des supports solides a reçu beaucoup d'attention. De tels réactifs non seulement simplifient les processus de purification et aident à prévenir la libération de résidus de réaction dans l'environnement. Cela a conduit à une croissance dans le domaine des réactifs solides supportés sur de l'alumine[86]. Kauslik et al. ont développé une nouvelle thionation par encapsulation de pentasulfure de phosphore dans l'aluminium basique. La thionation des

aldéhydes selon le procédé utilisant  $P_4S_{10} / Al_2O_3$  a permis d'obtenir des produits avec de très bons rendements mais l'interprétation sur le déroulement de la réaction de thionation avec  $P_4S_{10}$  n'est pas assez claire. La réaction ( $P_4S_{10} / Al_2O_3$ ) a été effectuée dans l'acétonitrile et a donnée des très bons rendements mais cette méthode nécessite plus d'études[87].



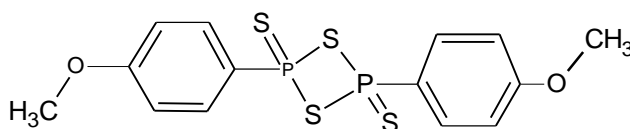
R et R' =alkyl, aryl.

**Figure 2.6 :** Schéma de Thionation des cétones par  $P_4S_{10}/Al_2O_3$ .

### 2.1.2.3. Réaction avec le réactif de Lawesson

#### 2.1.2.3.1. Introduction

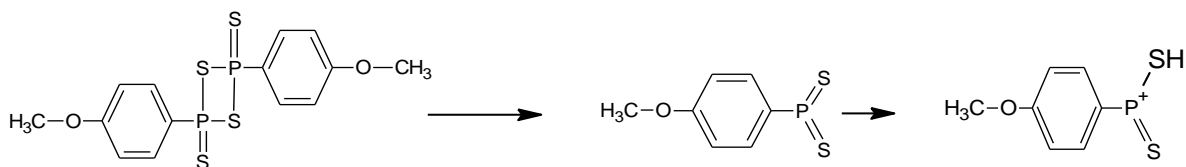
Le Réactif de Lawesson; 2,4-disulfure de 2,4-bis (4-méthoxyphényl)-1,3-dithia-2,4-diphosphétane est un composé chimique organique utilisé comme agent de thionation. Il a été introduit par Sven-Olov Lawesson. Il est synthétisé pour la première fois en 1956 [88, 89]. Ce réactif versatile et efficace de thionation est utilisé pour des nombreux composés carbonyles aromatiques, aliphatiques, insaturés et carboxamides hétérocycliques. Il a été signalé qu'il se décompose à des températures supérieures à 110°C[8, 90].



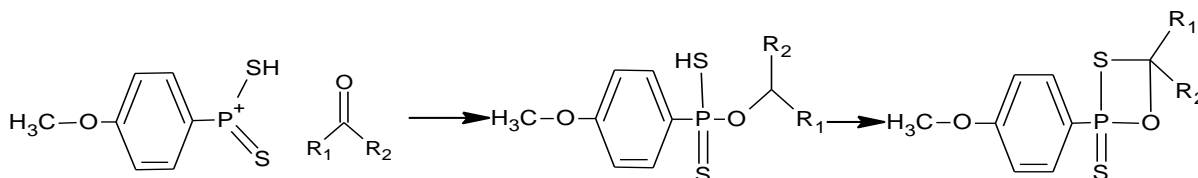
**Figure 2.7 :** Réactif de Lawesson; 2,4-disulfure de 2,4-bis (4-méthoxyphényl)-1,3-dithia-2,4-diphosphétane.

#### 2.1.2.3.2. Mécanisme

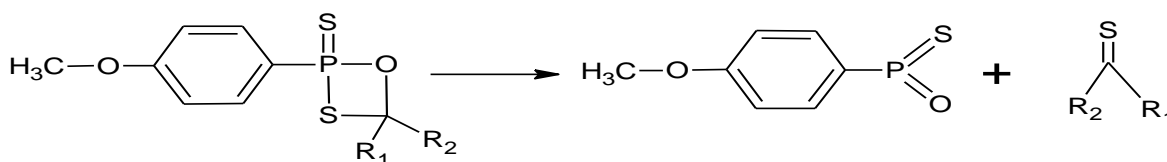
Les sites actifs de la molécule sont activés par l'ouverture du cycle central formé par les phosphores et les soufres[91]. Cette ouverture se fait principalement par voie thermique :



Les ylures de dithiophosphines mis à jour peuvent réagir avec le groupe carboxyle pour former un intermédiaire thioxaphosphétane:



La formation d'une double liaison stable P=O déplace la réaction vers la droite et conduit à la séparation de l'intermédiaire:



R=H. R=OMe. R=NH<sub>2</sub>. (Legnanie)

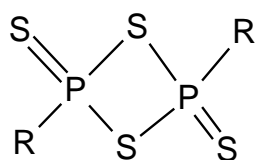
**Figure 2.8:** Mécanisme de réaction avec RL.

Cette réaction ressemble à la réaction de Wittig et est valable pour les cétones, les amides et les lactames. Les esters réagissant dans des conditions réactionnelles plus agressives, il est possible d'effectuer des thionations sélectives [77]. Pour ce qui est du réactif de Lawesson, malgré son coût élevé, il a pu ces dernières années remplacer le P<sub>4</sub>S<sub>10</sub>. Il est considéré comme un réactif de choix pour de nombreuses thionations. Les propriétés de cette dernière ont été d'abord étudiées par Schumacher à la fin des années 1960 [92]. Mais, le champ d'application et les limites du réactif ont été largement inconnus pendant assez longtemps alors que des travaux d'un groupe danois ont attiré l'attention généralisée à l'utilité de ce réactif. La littérature montre que le réactif de Lawesson est le meilleur agent de thionation pour la fonction carbonyle, ainsi que pour les amides, aussi il est plus sélectif que le P<sub>4</sub>S<sub>10</sub> en cas d'amides primaires [93].

#### 2.1.2.4. Réactifs de Davy

##### 2.1.2.4.1. Introduction

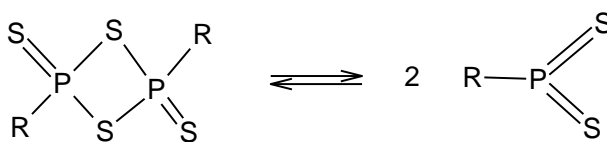
C'est une famille de composés chimiques organiques utilisés comme agents de thionation. Ils sont composés d'un centre 2,4-disulfure de 1,3-dithia-2,4-diphosphétane et de deux extrémités qui sont des groupes thioalkyles où les alkyles sont un méthyle, éthyle, isopropyle ou butyle. Ils sont beaucoup plus réactifs que les réactifs de Lawesson et Belleau[13].



**Figure 2.9:** Structure chimique de réactif de Davy.

##### 2.1.2.4.2. Mécanisme

Les sites actifs de la molécule sont activés par l'ouverture du cycle central formé par les phosphores et les sulfures. Cette ouverture se fait principalement par voie thermique[13, 93].



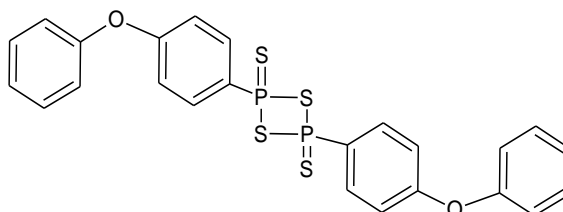
**Figure 2.10:** Mécanisme de réaction avec le réactif de Davy.

Ces différents réactifs agissent selon le même mécanisme, mais en fonction des différents substituants qui les composent, ils réagissent de manière plus ou moins rapide. Par un judicieux choix du réactif, une thionation sélective de certains groupes est possible. Le réactif de Lawesson est le plus utilisé actuellement pour la thionation des groupes carbonyles. Il occupe la position intermédiaire dans l'échelle de réactivité derrière les

réactifs de Davy qui sont considérés comme les moins sélectifs, mais devant le réactif de Belleau [15,94, 95].

### 2.1.2.5. Réactif de Belleau

Il est moins réactif comme agent de thionation. Sa structure est identique à celle du réactif de Lawesson dans laquelle les substituants méthoxyles sont remplacés par des groupes phénoxyles[13].



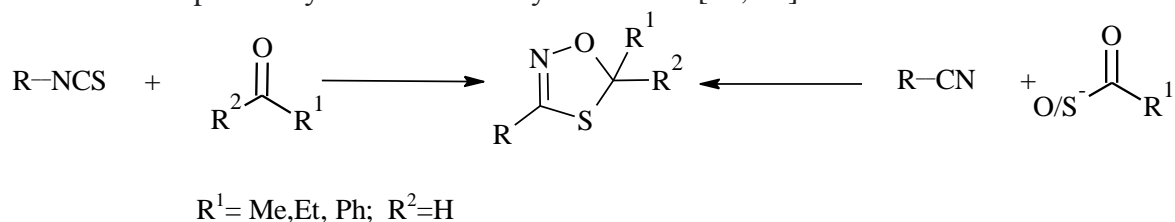
**Figure 2.11:** Réactif de Belleau.

Le réactif de Belleau réagit selon le même mécanisme que le réactif de Davy.

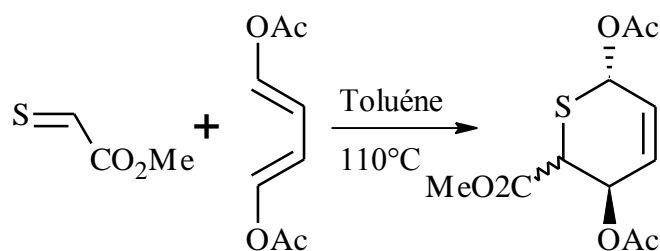
### 2.1.3 Thioaldéhydes en synthèse chimique

Les thioaldéhydes sont une classe importante de composés soufrés impliqués dans l'atmosphère, les composés organiques synthétiques et chimie biologique.

Les thioaldéhydes sont très instables, pour cela ils sont généralement utilisés comme des intermédiaires pour la synthèse d'hétérocycles soufrés[96, 97].



**Figure 2.12 :** Synthèse de 1,4,2-Oxathiazoles[96].



**Figure 2.13 :** Synthèse de dérivés de thiapyrane [97].

## CHAPITRE 3

### MATERIELS ET METHODES

#### 3.1. Matériels

##### 3.1.1. Matériel végétal

Les feuilles d'*Aloysia triphylla* ont été récoltées en juin 2016 de la région de Miliana (latitude: 36°17'24"N, Longitude: 2°12'36"E), Ain Defla (Algérie). La plante a été identifiée par le botaniste Monsieur M. Benissad du jardin botanique d'EL Hamma à Alger (Algérie) et au niveau du laboratoire de botanique du département d'Agronomie de l'Université de Blida 1 (Algérie). La verveine odorante (*Lippia citriodora* ou d'*Aloysia triphylla*) est une plante herbacée appartenant à la famille des Verbénacées. Elle est caractérisée par ses feuilles très parfumées, au goût de citron. Elle est connue pour ces propriétés antipyrétique, antiasthmatique, et est également utilisé en cas de troubles digestifs, rougeole, maux de tête[98, 99].



**Figure 3.1 :** *Aloysia triphylla*.

##### 3.1.2. Produits chimiques

P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> (99%), NaHCO<sub>3</sub> (99%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (99%), DMSO (99%) de marque SIGMA-ALDRICH, Biochem et Panreac respectivement.



### 3.1.3. Matériel biologique

#### 3.1.3.1. Souches bactériennes et fongiques étudiées

Pour la détermination de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla*, deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) et une levure (*Candida albicans*) ont été choisies. Ces bactéries sont pathogènes et sont connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir invasif et toxique chez l'homme. Les souches pathogènes utilisées sont présentées dans le **Tableau 3.1**.

**Tableau 3.1** : Les microorganismes testés

	Références	Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	+
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	/



*Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Candida albicans*

**Figure3.2** : Bactéries et levure vues sous microscope.

#### 3.1.3.2. Milieux de culture

Suivant les méthodes employées et selon les souches, nous avons utilisé les milieux de culture suivants:

- **Gélose nutritive** : En biologie, la gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (*GNO*) ou encore gélose ordinaire est un milieu d'isolement non-sélectif. L'isolement est réalisé dans le but de contrôler la pureté d'une souche bactérienne (pur s'il y a un type de colonie sur la gélose) ou de purifier la souche bactérienne si elle est contaminée. L'isolement permet de séparer des micro-organismes différents dans un mélange qui pourront être ainsi étudiés individuellement. Sur cette gélose nutritive on observe le nombre de colonies différentes (nombre de type de colonies) et on fait une description des colonies isolées.
- **Mueller Hinton (MH)** :

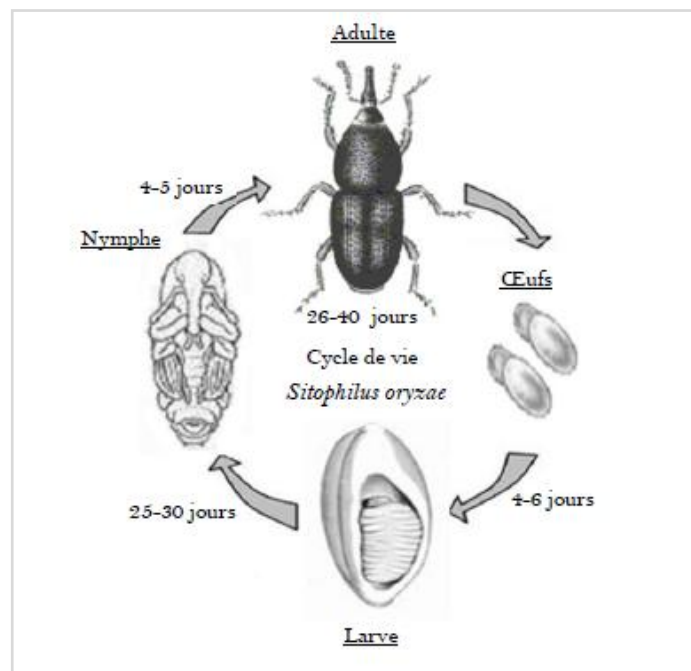
La gélose Mueller Hinton est un milieu riche, standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens (la réalisation de l'antibiogramme).

➤ **Sabouraud :**

Le milieu de Sabouraud (ou gélose de Sabouraud) est un milieu de culture acide favorisant la culture et l'isolement des champignons et des moisissures.

3.1.3.3. Souche de *Sitophilus oryzae*

Les insectes proviennent d'une souche isolée à partir des grains de blé infestés par *S. oryzae*. Cette souche est mise en élevage au laboratoire, dans une salle aérée où la température varie entre 24 et 28°C et une humidité de 70%, sur le blé dur, dans un flacon en verre[100].



**Figure 3.3 :** Cycle de vie de *Sitophilus oryzae*[101].

### 3.1.4. Matériels spectroscopiques

#### 3.1.4.1. Spectrophotométrie UV-Vis

Les spectres UV-Vis sont enregistrés sur un spectrophotomètre SHIMADZU UV-1800 à double faisceaux, piloté par un micro-ordinateur avec une cellule de 10 mm.

#### 3.1.4.2. Spectrophotométrie infrarouge

Les spectres infrarouges sont enregistrés sur un appareil de marque JASCO. Les nombres d'onde sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.1.4.3. Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse (CG/SM)

- Chromatographe : HP 6890
- Spectromètre de masse : Quadripôle.
- Conditions opératoires

L'huile essentielle a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, dans les conditions opératoire suivantes :

**Tableau 3.2 :** Conditions opératoires (automne) d'analyse GC/MS de l'HE d'*Aloysia triphylla*.

<b>Injecteur</b>	<b>Colonne</b>	<b>Détecteur de masse</b>
Température : 250°C Mode d'injection : Split 1/50 Volume injecté : 0.2 $\mu\text{l}$	Type : HP-5 Dimensions : long 30 m * D int 0,25 mm * épaisseur film 0.25 $\mu\text{m}$ Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane. <b>Température du four :</b> 60°C pendant 8 min, 2°C/min jusqu'à 240°C. , isotherme pendant 10 min. Durée d'analyse : 108 min Gaz vecteur : Azote N <sub>2</sub> Débit GV : 0,5 ml/min	Mode d'analyse : Scan (de 35 à 550)

**Tableau 3.3** : Conditions opératoires (printemps) du GC/MS de l'HE de *Lippia citriodora*

<b>Injecteur</b>	<b>Colonne</b>	<b>Détecteur de masse</b>
Température : 250°C Mode d'injection : Splitless Volume injecté : 01µl	Type : HP-5Ms Dimensions : long 30 m, D int 0,25 mm, épaisseur film 0,25 µm Température du four : 60°C pendant 8min, pallier 02 °C/min jusqu'à 250°C, isotherme pendant 10 min. Temps d'analyse : 113min Gaz vecteur : Hélium pure Débit GV : 0,5ml/min	Mode d'analyse : Scan (de 35 à 550) Solvant utilisé : méthanol Température de l'interface : 280 °C Type d'ionisation : Impact électronique Intensité du filament : 70 év Température de la source : 230 °C

### 3.2. Méthodes

#### 3.2.1 Extraction de l'huile essentielle:

##### 3.2.1.1 Procédé d'extraction

Nous avons utilisé l'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, pour l'extraction de l'huile essentielle. L'extraction est effectuée durant trois heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première en huile essentielle.

Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Le mélange est ensuite refroidi et condensé dans un essencier. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une huile.

Nous avons introduit 100 g de feuilles séchées d'*Aloysia triphylla*, coupées en petits morceaux dans un ballon d'une capacité nominale de 2 litres contenant de l'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 3 h. Quelques grains de pierre ponce ont été

rajoutés dans le ballon dans le but de homogénéiser la température du système. Le chauffage est assuré par une chauffe ballon électrique. L'opération est conduite à pression atmosphérique. Le système de cohobage permet de maintenir constant le volume d'eau présent initialement, durant tout le processus de distillation. Les vapeurs chargées en huiles essentielles se condensent à leur arrivée au niveau de réfrigérant, elles retombent sous forme de gouttelettes et forment avec l'eau un mélange hétérogène. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin elle est conservée dans des flacons hermétique .Elle est ensuite pesée et conservée à une température de 4 °C jusqu'à l'analyse. Le montage de l'hydrodistillation est représenté ci-dessous :



**Figure 3.4:** Dispositif d'hydrodistillation.

### 3.2.1.2 Détermination du rendement

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport de la masse d'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale sèche.

Après un temps estimé à 3 heures d'extraction, l'huile essentielle est prélevée et récupérée par simple décantation. Elle est par la suite pesée avec une balance de précision. Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$R_{He}(\%) = \frac{m}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

Où :

$R_{He}$ : rendement en huile essentielle (%).

$m$ : masse de l'huile essentielle en gramme.

$m_0$ : masse de la matière végétale sèche en gramme.

### 3.2.2. Détermination des indices physiques

#### 3.2.2.1. La densité

##### ➤ Principe

Elle constitue un point de repère important. Sa valeur permet d'avoir une idée sur la l'HE [85]. La densité relative à 20°C d'une HE est définie comme étant le rapport de la masse d'un volume d'HE à 20 °c, à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20° C[45, 47].

##### ➤ Mode opératoire

Pour déterminer la densité, nous avons évalué la masse  $m_0$  du pycnomètre vide de 5 ml, la masse  $m_1$  du pycnomètre rempli d'eau distillée. Puis la masse  $m_2$  du pycnomètre contenant l'HE. La densité relative est donnée par l'expression :

$$D^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (2)$$

$m_0$  : Masse en gramme du pycnomètre vide.

$m_1$  : Masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée.

$m_2$  : Masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

#### 3.2.2.2. Indice de réfraction

##### ➤ Principe

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante. La température de référence est de 20°C[48].

##### ➤ Mode opératoire

L'indice de réfraction a été déterminé par la lecture directe de l'angle de réfraction à l'aide du réfractomètre, en employant la lumière diffuse. L'indice de réfraction à la température de référence  $T=20^\circ\text{C}$  ( $\eta_D^{20}$ ), est déterminée par la formule suivante :

Avec

$$\eta_D^{20} = \eta_D^{T'} + 0.00045 (T' - T) \quad (3)$$

T = 20°C

$\eta_D^{T'}$  : est la valeur obtenue à la température T'

### 3.2.2.3. Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20}$

#### ➤ Principe

Le pouvoir rotatoire est la propriété que présente certaines substances de dévier la lumière polarisée. L'angle de rotation optique d'un liquide et l'angle de rotation ( $\alpha$ ) exprimé en degré (°C) du plan de polarisation à la longueur d'onde de la raie D du sodium (avec  $\lambda = 589,3$  nm) mesurée à 20°C, sous une épaisseur de 1 décimètre [50].

#### ➤ Mode opératoire

Amener l'échantillon à une température spécifique et introduire dans le tube en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée. Placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation dextrogyre (+) ou lévogyre (-) de l'échantillon sur l'échelle de l'appareil. Le pouvoir rotatoire est calculé selon la formule suivante :

$$[\alpha]_D^{20} = 100 \times \frac{A}{L} \quad (4)$$

Avec :

A : rotation en degré (°).

L : longueur de la cellule, en décimètre (L=0,1).

### 3.2.3. Chromatographie sur couche mince CCM

La chromatographie sur couche mince est une méthode de séparation des composés qui permet d'analyser la complexité d'un mélange. Cette technique a été utilisée pour visualiser la séparation des molécules de l'huile essentielle

#### 3.2.3.1 Principe

La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interaction et de polarité. Un mélange de composés est placé sur un support solide (Phase stationnaire) qui est plongé dans un solvant (phase mobile) qui, par capillarité, se déplace le long de la phase stationnaire. La phase mobile va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile.

### 3.2.3.2. Protocole expérimental

Les échantillons sont analysés en utilisant des plaques CCM commerciales prêtes à être utilisées, de gel de silice de dimension (20/20 cm). La cuve de migration est partiellement remplie du mélange de solvant (phase mobile) et recouverte, afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant, ce qui facilite et améliore la migration. Une ligne de dépôt est tracée à 1,5 cm du bord, l'huile essentielle est solubilisée dans le solvant approprié et déposée, puis la plaque est mise en contact avec la phase mobile dans la cuve jusqu'à migration de celle-ci à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque.

### 3.2.3.3. Calcul du rapport frontal $Rf$

Le calcul du rapport frontal ( $Rf$ ) est donné par la relation suivante :

$$Rf = \frac{Dc}{Ds} \quad (5)$$

Où :

$Dc$  : La distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache).

$Ds$  : La distance parcourue par le front du solvant.

### 3.2.4. Thionation de l'huile essentielle

L'huile essentielle d'une masse de 1,43g est préalablement séchée par le sulfate de sodium et dissoute dans 30ml de  $CH_2Cl_2$ . Ensuite 0,7 g de  $P_2S_5$  et 0,146g de bicarbonate de sodium sont additionnés. La réaction est portée à reflux dans un bain marie à 45 - 50°C. Après filtration, on évapore le solvant avec un évaporateur rotatif[15].

### 3.2.5. Activité antibactérienne

#### 3.2.5.1. Introduction

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections des microorganismes résistants aux antibiotiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des microorganismes ou des plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. En particulier, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de plantes ont formés la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médicales et agroalimentaires. L'activité des huiles essentielles et des extraits aromatiques



est souvent réduite à l'activité de leurs composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous la forme des composés synthétiques, ils confirment l'activité des huiles essentielles de compositions semblables. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à l'intégrité de ses composés majoritaires. Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés au sein de laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

#### 3.2.5.2. Préparation des solutions tests

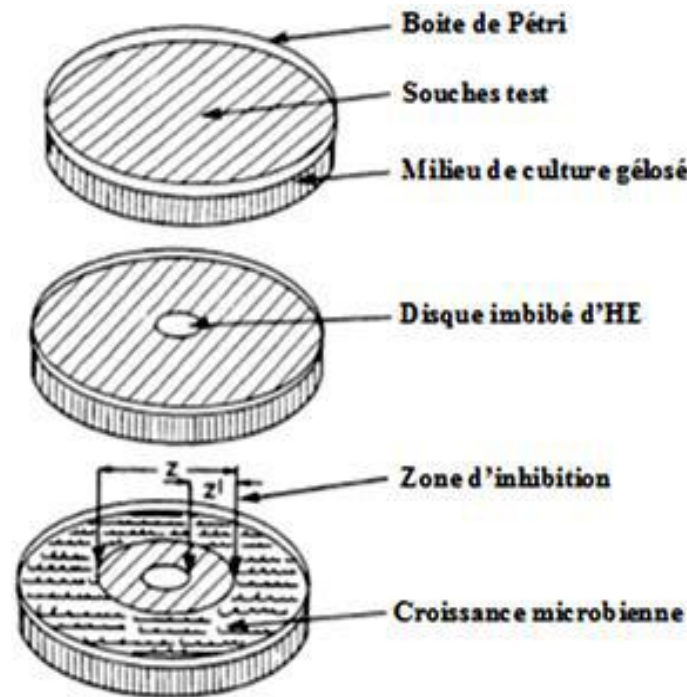
Les solutions testées sont préparées par dissolution de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* native et modifiée dans le DMSO. Les doses choisies pour effectuer le test de toxicité sont : 5/100, 10/100 et 30/100.

#### 3.2.5.3. Techniques d'étude du pouvoir antibactérien

Lors de cette étude, nous avons testé l'action de l'huile essentielle native et modifiée des différentes espèces vis-à-vis des souches bactériennes par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)[38]. L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée «antibiogramme» ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques ».

##### ➤ Principe

La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbants stériles (de 9 mm de diamètre) imprégnés d'une quantité d'huile essentielle (pure ou diluée) et déposés à la surface d'une gélose inoculée et uniformémentensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'HE à partir du disque au sein de la gélose détermine un gradient de concentration. Les micro-organismes poussent sur toute la surface de la gélose sauf là où ils rencontrent une concentration d'huile essentielle suffisante pour inhiber leur croissance dont on observe après incubation tout autour des disques une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée «zone d'inhibition». Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante[51].



**Figure 3.5:** Principe de la méthode de diffusion par disque.

#### 3.2.5.4. Protocole expérimental

##### ➤ Préparation de l'inoculum

Les suspensions bactériennes ont été réalisées par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et 48h pour les levures, les mettre ensuite dans 9 ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

##### ➤ Préparation des milieux de culture

Verser les milieux gélosés déjà liquéfiés dans un bain marie (Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures) sur des boîtes de pétri à raison de 15 Ml par boîte.

Ensemencer les milieux de culture avec 200  $\mu$ L de chaque suspension,

##### ➤ Dépôt des disques

Les disques de 9mm en cellulose stériles, imbibés d'une quantité d'huile essentielle, sont déposés sur la surface de la gélose, puis laisser diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. L'incubation s'effectue à 37 °C dans une étuve pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

##### ➤ Lecture

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à

l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle.

D'après Ponce et *al.* (2003)[55, 102] la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

- Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm ;
- Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ;
- Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm ;
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm.

La sensibilité des souches microbiennes a été testée vis-à-vis d'un antibiotique [Ciprofloxacine (ATB) ; 0,1 mg / disque] et antifongique [Métronidazol (ATF 1) ; 0,25 mg/disque] selon la méthode de diffusion en milieu solide. La Ciprofloxacine est une fluoroquinolone, qui possède un vaste spectre d'activités contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

### 3.2.6. Activité insecticide

Les méthodes d'application d'insecticides sont variées et elles dépendent surtout de la nature de l'insecte et de la nature du produit à protéger. Dans notre cas les solutions des huiles essentielles sont testées par fumigation pour favoriser leur diffusion dans le milieu traité.

#### 3.2.6.1. Application des huiles essentielles par fumigation sur les adultes de *Sitophilus oryzae*

La fumigation avec l'huile essentielle a été effectuée dans des boîtes en verre, hermétiques et transparentes, de capacité de 0,25L comme chambre d'exposition pour tester la toxicité de l'huile essentielle contre les adultes du *S. oryzae*. La charge d'huile essentielle est déposée sur une rondelle de papier filtre puis placée dans le couvercle qui est ensuite vissé sur le flacon. Chaque flacon contient 15 insectes, un témoin est réalisé dans les mêmes conditions avec une rondelle du papier filtre non chargée. Le contrôle de mortalité s'est fait par dénombrement d'insectes morts chaque heure du premier jour de traitement jusqu'à la mort de tous les individus sans ouvrir les flacons[103].



**Figure 3.6 :** Boite pour l'application insecticide.

### 3.2.6.2. Correction de la mortalité

L'efficacité d'un produit est évaluée par la mortalité. Le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tués par ce toxique. Les pourcentages de mortalité des individus tués par l'huile essentielle de la plante sont corrigés par la formule de *Schneider Orelli* qui tient compte de la mortalité naturelle (témoin)[104].

$$Mc \% = \frac{M - Mt}{100 - Mt} \quad (6)$$

Mc : le pourcentage de mortalité corrigé.

M : le pourcentage de morts dans la population traitée.

Mt : le pourcentage de morts dans la population témoin

## CHAPITRE 4

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 4.1. Extraction de l'huile essentielle de *L'Aloysia triphylla*

##### 4.1.1. Rendement en huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle, qui est calculé en fonction de la masse du matériel végétal sèche, pour l'espèce *Aloysia triphylla* est représenté dans le tableau suivant :

**Tableau 4.1** : Rendements d'extraction de l'HE de *L'Aloysia triphylla*

Période	Septembre(2016)	Avril-Mai(2016)
Rendement (%)	0,35	0,2

L'extraction de l'HE d' *Aloysia triphylla* effectué par l'hydrodistillation de type Clevenger a fourni un rendement moyen de 0,28%.Ce résultat est comparable à celui obtenu de *L.citriodora* provenant de la région de Kabylie (Algérie) 0,29% [62], et de nord de l'Algérie (Blida) 0,36 % [59], mais faible comparativement à celui de *L.citriodora* provenant de l'Argentine 3,8 % [105]. Les feuilles de *L.citriodora* ont montré un rendement moyen de 0,28 % valeur bien inférieure à celle trouvée par (Agah et Najafian, 2012) [106], à partir des feuilles de *L.citriodora* distillées à Shiraz en Iran et qui est de 1,03%. D'autres travaux ont été réalisés par Adilson et al. (2004) [107], et Gomes et al. (2006) [108] sur *Aloysia triphylla* ont obtenu des rendements 0,22 % et 1,2 % respectivement.

#### 4.1.2. Caractérisation de l'huile essentielle de *L'Aloysia triphylla*

##### 4.1.2.1. Détermination des caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *L.citriodora* obtenues par hydrodistillation sont représentées dans le **tableau 4.2**, l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* présente un aspect liquide, limpide, jaune foncé et elle est caractérisée par une forte odeur citronnée.

**Tableau 4.2:** Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla*.

Origine	Aspect	Couleur
HE de <i>Lippia citriodora</i>	Liquide, limpide	Jaune foncé

#### 4.1.2.2. Détermination des Indices physiques

Les résultats des analyses physiques sont regroupés dans le tableau 4.3.

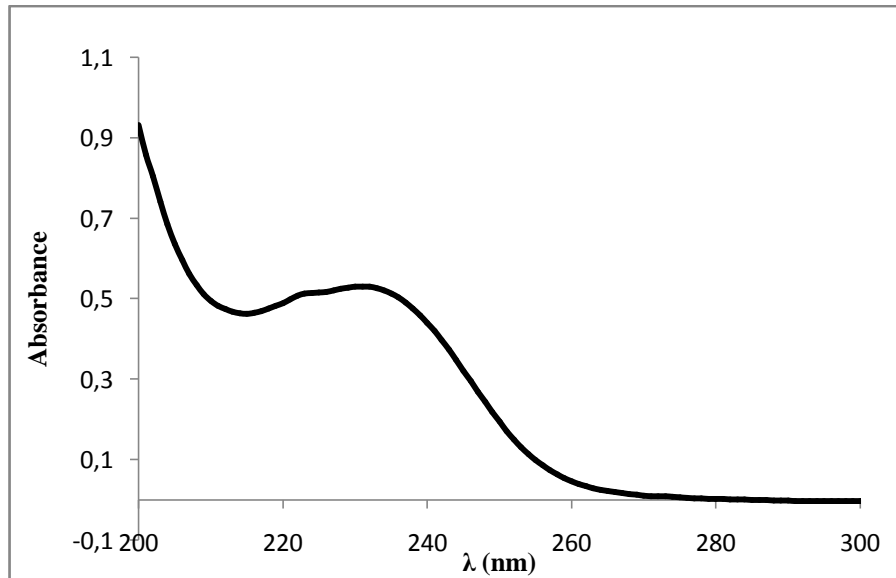
**Tableau 4.3 :** Caractéristiques physiques de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla*.

Caractéristiques physiques	$D^{20}$	$\eta_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$	R <sub>f</sub> Hexane/Acétate d'éthyle (v/v; 9,5/0,5)
Valeurs	0,902	1,491	-21,6	0,31 0,25
Normes AFNOR	0,890-0,920	1,475-1,495	-22 à 12	-

Les résultats des analyses physiques révèlent que les indices de l'HE d'*Aloysia triphylla* sont conformes à la norme AFNOR.

#### 4.1.2.3. Caractérisation de L'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* par UV-vis

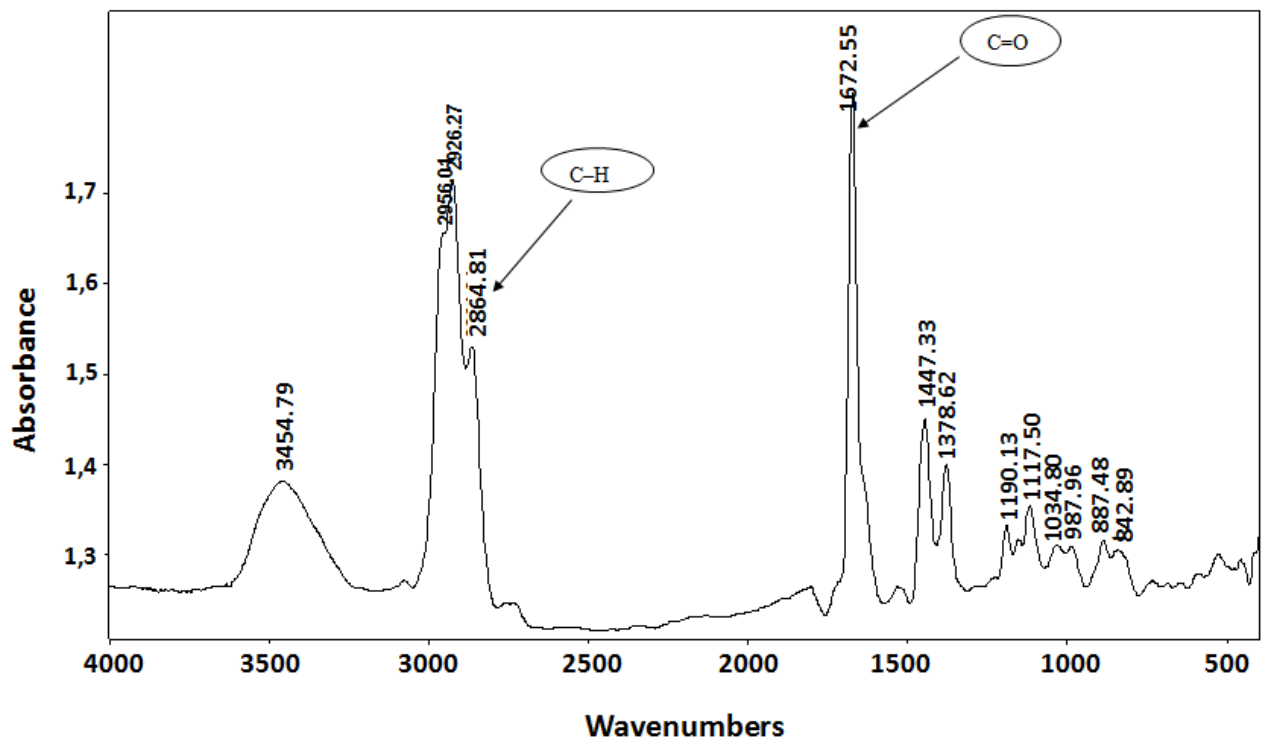
L'analyse UV-Vis de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* (Figure 4.1) solubilisé dans le méthanol a permis d'identifier deux pics dans la région ultraviolet situés respectivement à 223 - 232 nm caractéristique des transitions électroniques  $\pi \rightarrow \pi^*$  d'une double liaison d'un alcène et  $n \rightarrow \pi^*$  de la fonction carbonyle d'un aldéhyde.



**Figure 4.1 :** Spectre UV-vis de l'HE d'*Aloysia triphylla*.

#### 4.1.2.4. Caractérisation de L'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* par IR

La figure 4.2 représente les bandes d'absorption IR de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla*.



**Figure 4.2 :** Bande d'absorption IR de l'HE d'*Aloysia triphylla*.

Le spectre IRTF de l'HE d'*Aloysia triphylla* est caractérisé par deux pics situés à  $2956\text{ cm}^{-1}$  et  $2926\text{ cm}^{-1}$  responsables de la vibration de la liaison C–H relatifs aux groupements

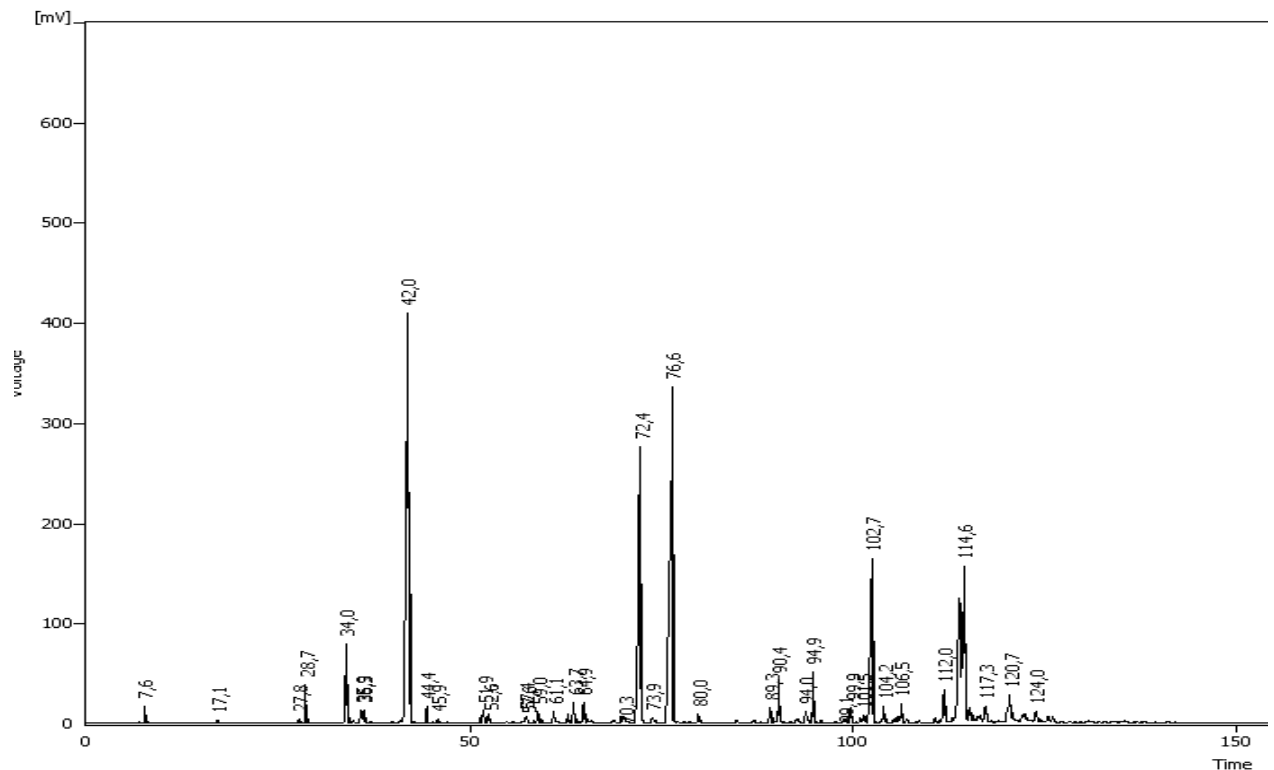
-CH<sub>3</sub> et -CH<sub>2</sub>, suivi d'une bande moins prononcée vers 2864 cm<sup>-1</sup> du groupement (-CH) des aldéhydes, un pic de forte intensité, très pointue correspondant à l'absorption du groupement carbonyle (C=O) présent dans les aldéhydes est situé à 1672 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2.5. Caractérisation de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* par CG/MS

Dans cette étude, des parties aériennes d'*Aloysia triphylla* ont été récoltées à deux stades phénologiques c.-à-d. végétatif (Avril-Mai) et pleine floraison (Septembre). Une étude comparative entre la composition chimique de l'HE d'*Aloysia triphylla* récoltée à différentes périodes a été réalisée et représentée dans la partie suivante.

##### 4.1.2.5.1. Composition chimique de l'HE d'*Aloysia triphylla* en (Septembre)

Le chromatogramme représenté par la figure 4.3 représente la composition chimique de l'HE d'*Aloysia triphylla* récoltée au moment de floraison.



**Figure 4.3 :** Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* (floraison).

L'identification chimique de la composition chimique de l'huile essentielle représentée par le tableau 4.4, a montré l'existence de 13 composants appartenant à différentes familles chimiques. L'huile essentielle étudiée est composée de monoterpènes et de sesquiterpènes dont le D-limonène (23,6) a été détecté comme composé majoritaire; le néral (15,97) et le



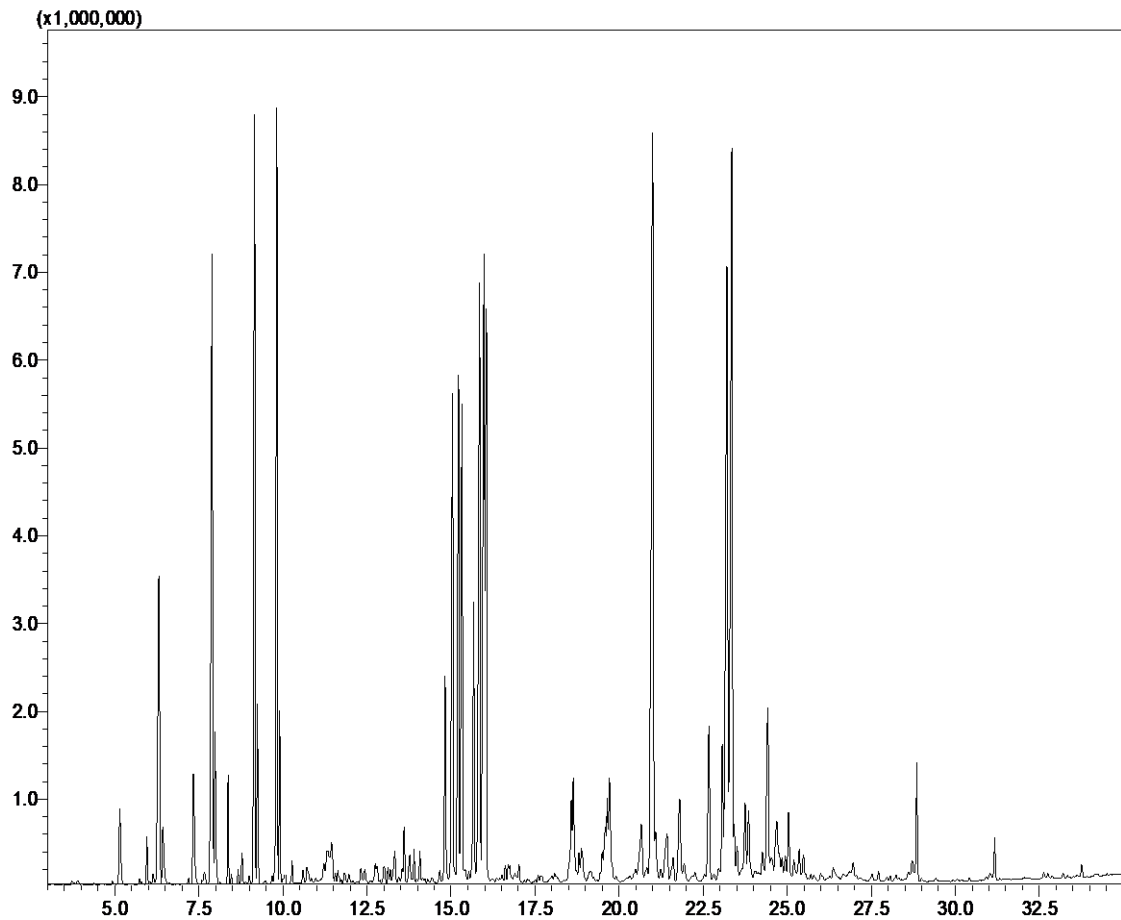
géranial (19,16) aussi ont été détecté avec des teneurs importantes; il a été aussi remarqué la présence de Spathulenol (9,58) et de Caryophylleneoxide(14,37).

**Tableau:4.4** : Composition chimique de l'HE d'*Aloysia triphylla* (floraison)

Composés	Tr	Teneur (%)
$\alpha$ -pinène	28,7	2,23
Sabinène	34	4,79
D-Limonène	42	23,64
1,8-Cineol	44,4	0,95
Terpinen-4-ol	63,7	1,27
$\alpha$ -Terpineol	64,9	1,11
Neral	72,4	15,97
Geranial	76,6	19,16
$\delta$ -Cadinene	90,4	3,19
Curcumene	94,9	2,71
Spathulenol	102,7	9,58
Caryophylleneoxide	114,6	14,37
Nerolidol	120,7	0,95

#### 4.1.2.5.2. Composition chimique de l'HE d'*Aloysia triphylla* récoltée en (Avril-Mai)

Le chromatogramme ci-après (figure 4.4) illustre la richesse quantitative de l'huile essentielle de verveine odorante récolté dans la période de croissance végétative.



**Figure 4.4 :** Chromatogramme GC-MS de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla*  
(croissance végétative: Avril-Mai)

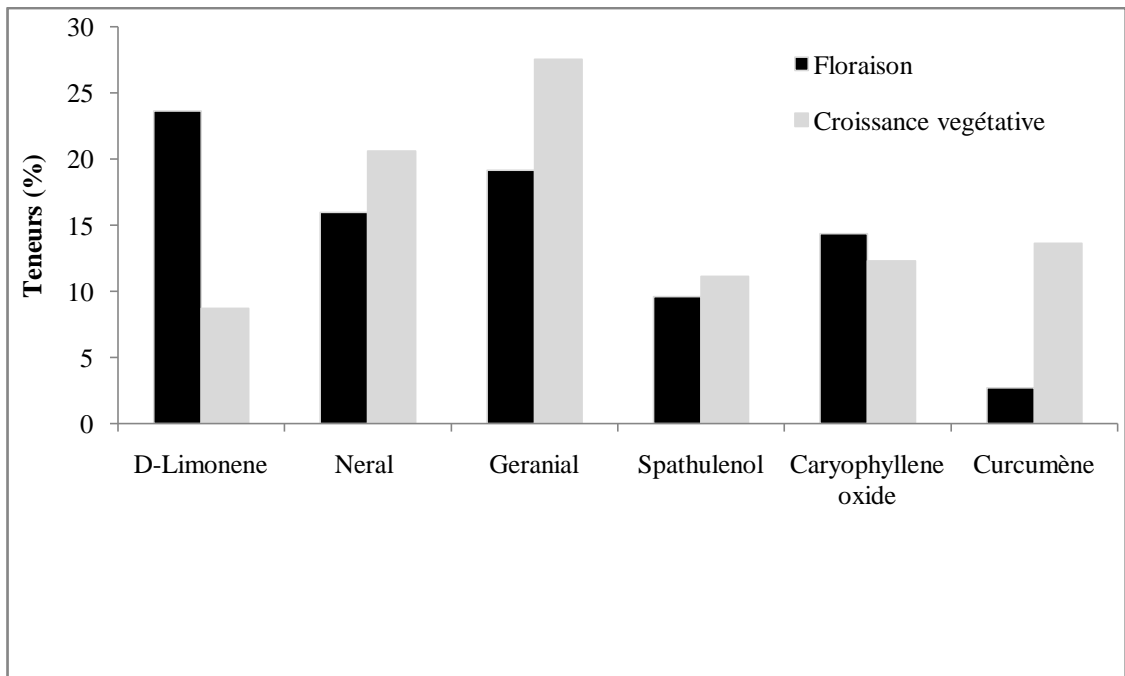
La composition chimique de l'HE de la verveine odorante récoltée en Avril-Mai et présentée dans le tableau 4.5 montre la richesse de cette dernière en aldéhydes (48,17%), représentée par le néral (20,62%) et le géraniol (27,55%), suivi par les sesquiterpènes, qui représentent environ 38,08% de l'huile totale. D'autres composés ont été détectés: le Curcumène (13,62 %); le Spathulenol (11,14%) et le Caryophyllène oxide (12,31%); d'autres monoterpènes ont été détectés en faibles teneurs comme le limonène (8,70%), le 1,8-Cinéol (1,69%), le Terpinène-4-ol (0,28%) et l' $\alpha$ -Terpinéol (0,35%).

**Tableau 4.5 :** Composition chimique de l'HE d'*Aloysia triphylla* (croissance végétative: Avril-Mai).

Composés	Tr	Teneurs %
D-Limonène	7,89	8,70
1,8-Cinéol	8,00	1,69
Terpinène-4-ol	13,01	0,28
$\alpha$ -Terpinéol	14,07	0,35
Néral	15,04	20,62
Carvone	15,12	0,01
Géranial	16,04	27,55
$\delta$ -Cadinene	18,63	2,62
Curcumène	21,00	13,62
Spathulenol	23,20	11,14
Caryophyllèneoxide	23,34	12,31
Nerolidol	25,05	1,01

#### 4.1.2.5.3. Étude comparative entre la composition chimique des HE récoltées à différentes périodes

On constate que l'huile essentielle de la verveine odorante se caractérise par une présence importante de citrals: le néral et le géranial qui représentent sur les 2 échantillons analysés une moyenne d'environ 24,75%, avec 10,15 % de néral et 14,6% de géranial ; les plus grandes teneurs ont été obtenues à partir de l'HE de la verveine odorante récoltée en Avril-Mai; Les sesquiterpènes, le Curcumene, le Spathulenol et le Caryophylleneoxide représentent 37,07 % en croissance végétative à 26,66 % au moment de floraison ; d'un autre côté les monoterpènes ont été détectés en quantités plus importantes à partir de la plante récoltée en automne où le limonène représente environ 23, 64% de l'huile totale (Figure 4.5 ).



**Figure 4.5 :** Comparaison de la composition chimique de l'HE a différentes périodes.

Dans une première étude, des parties aériennes d'*Aloysia triphylla* récoltées à trois stades phénologiques c.-à-d (végétative, pleine floraison et nouaison) ; 13, 12 et 11 composés d'huile essentielle ont été identifiés en végétation, pleine floraison et nouaison des fruits respectivement. Les principaux composés aux trois stades étaient le géraniol et neral. Le géraniol était le composé le plus abondant au stade végétatif (33,7%) et le plus faible au stade de floraison (32,7%). la haute teneur en néral a été observée au stade végétatif (26,1%) et la plus faible en nouaison (25,06%)[109].

Dans une deuxième étude, la composition chimique de l'huile essentielle extraite des feuilles fraîches d'*Aloysia triphylla* récoltée en mai, lorsque les taux de croissance sont maximaux, est en septembre, en pleine floraison. Dans les deux échantillons, les principaux constituants étaient le géraniol, le néral et le limonène, constituant 66,3% du rendement total en huiles essentielles en mai et atteignant 69% en septembre. Cependant, leurs valeurs individuelles en pourcentage ont considérablement changés pour le géraniol et le néral, où les teneurs les plus importantes ont été révélées au mois de Mai, passant de 38,7 à 26,8% et de 24,5 à 21,8%, respectivement. Quant au limonène, il est passé de 5,8 à 17,7%. Tous les autres composants sont restés plus ou moins inchangés à la fois qualitativement et quantitativement. Nos résultats sont en accord avec ce phénomène[17]. La teneur et la composition des huiles essentielles de nombreuses plantes médicinales et aromatiques sont grandement influencées par les conditions agronomiques, telles que la

période de récolte Bylaite et al.[110]; Santos-Gomes et Fernandes-Ferreira,[111]; Sefidkon et al.[112]. Le temps de la récolte est important en ce qui concerne le rendement en huile et composition [113-115]et en ce qui concerne l'économie globale. Carnat et al.[116]ont montré que les principaux composés de l'huile essentielle des feuilles de la verveine citronnée étaient le néral et le géranial[109].

#### 4.2. Thionation de L'huile essentielle d'*Aloysia triphylla*

La thionation de l'huile d'*Aloysia triphylla* riche en aldéhydes qui possèdent des propriétés antibactériennes et insecticides a été réalisée dans le but d'améliorer ces propriétés.

La thionation de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* a fourni un produit de consistance semi-solide de couleur orange avec une très forte odeur agréable et sulfurée après 5h de réaction et un suivi par CCM.

##### 4.2.1. Caractérisation par CCM

Les résultats obtenus de la chromatographie sur couche mince d'huile essentielle (native et modifiée) d'*Aloysia triphylla* sont représentés par le **tableau 4.6**.

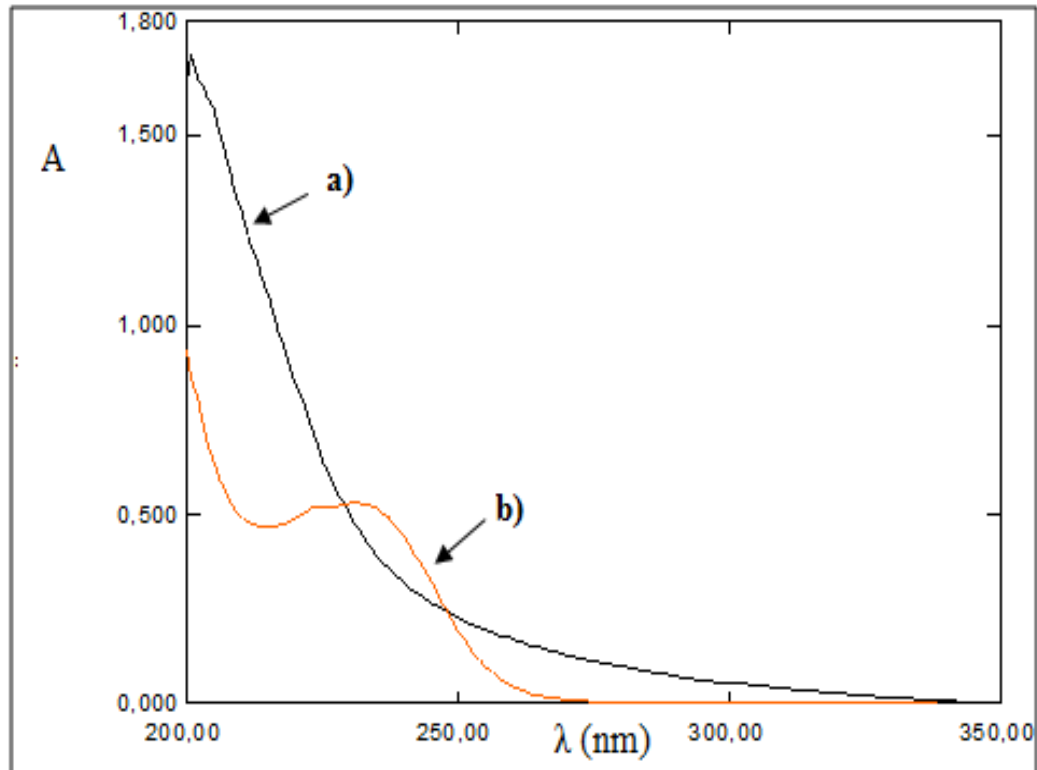
**Tableau 4.6** : Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla*.

Huile étudiée	Système de solvant v /v (ml)	N° de spot	Rf
HE	Hexane/Acétate d'éthyle (9,5/0,5)	1	0,31
		2	0,25
HEM		1	0,89
		2	0,81

La cinétique de la réaction de thionation de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla*. Après 5 heures de chauffage à reflux, on a observé la disparition des deux taches l'huile essentielle et l'apparition de deux nouvelles taches responsables de la formation de thiocarbonyle C=S.

#### 4.2.2. Caractérisation par UV/vis

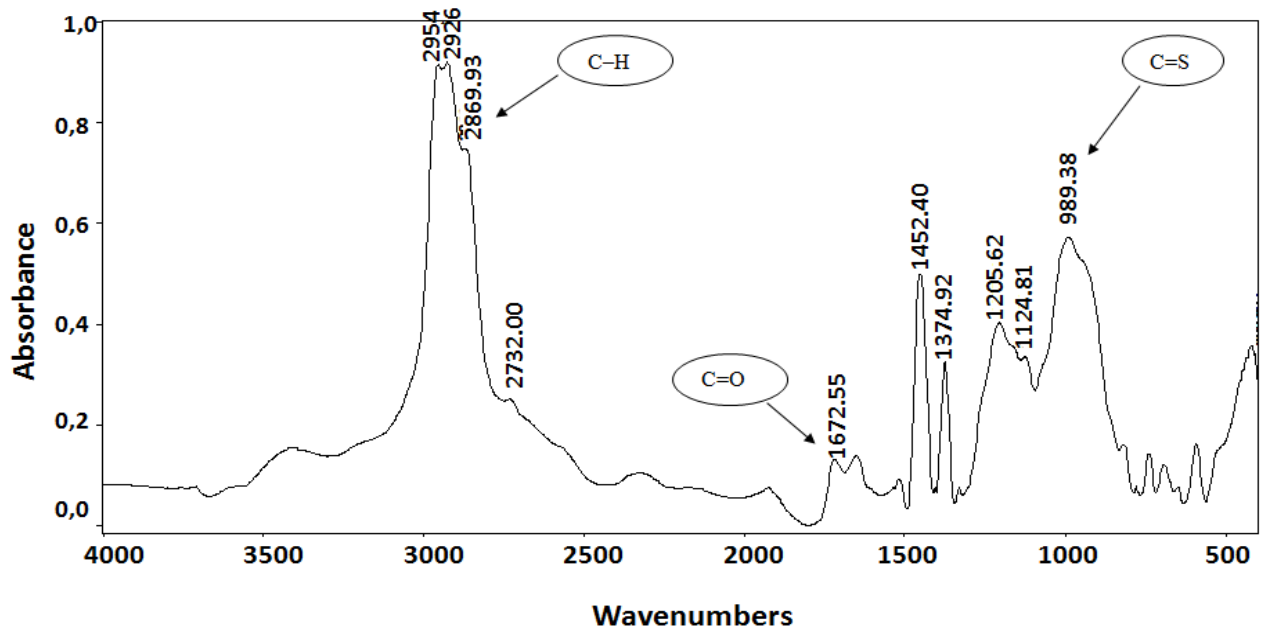
Le spectre UV-Vis enregistré après thionation dans le méthanol est totalement différent de l'huile de départ et il montre clairement la disparition de la bande spécifique de la fonction carbonyle et l'augmentation de celle localisée à 223 nm (**Figure 4.6**).



**Figure 4.6 :** Spectre UV-Vis de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* thionée (a), et native dans le méthanol (b).

#### 4.2.3. Caractérisation par IR

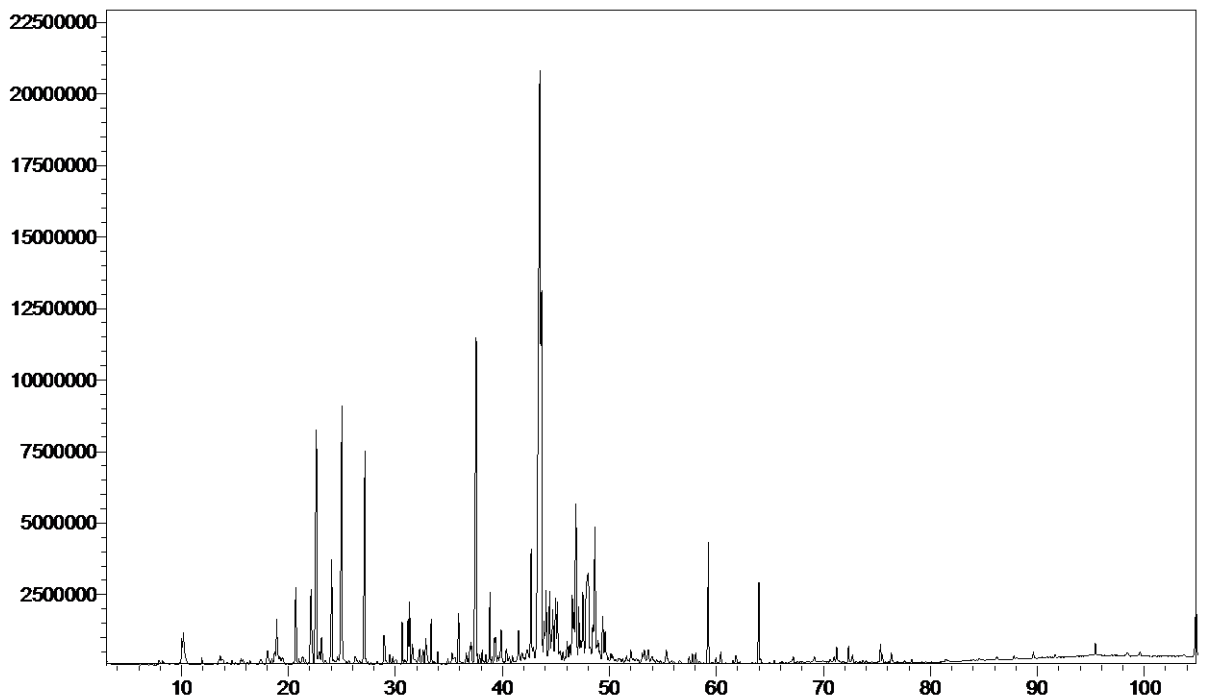
Sur le spectre IRTF de l'HE d'*Aloysia triphylla* modifiée, nous observons respectivement les mêmes bandes de l'HE d'*Aloysia triphylla* native (figure 4.7), un nouveau pic apparaît à  $989.38\text{ cm}^{-1}$  après thionation, ce dernier correspond à l'absorption du groupement C=S, cette bande est absente sur le spectre de l'HE d'*Aloysia triphylla* par conséquent, on observe la disparition partielle du pic responsable de la vibration de la fonction aldéhyde situé à  $1672\text{ cm}^{-1}$ .



**Figure 4.7:** Spectre IR de l'HE d'*Aloysia triphylla* modifiée.

#### 4.2.4. Caractérisation par GC/MS

Le chromatogramme de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* thionée (Figure 4.8) confirme les résultats obtenus par l'UV-vis et IR.



**Figure 4.8 :** Chromatogramme de l'HE d'*Aloysia triphylla* modifiée.

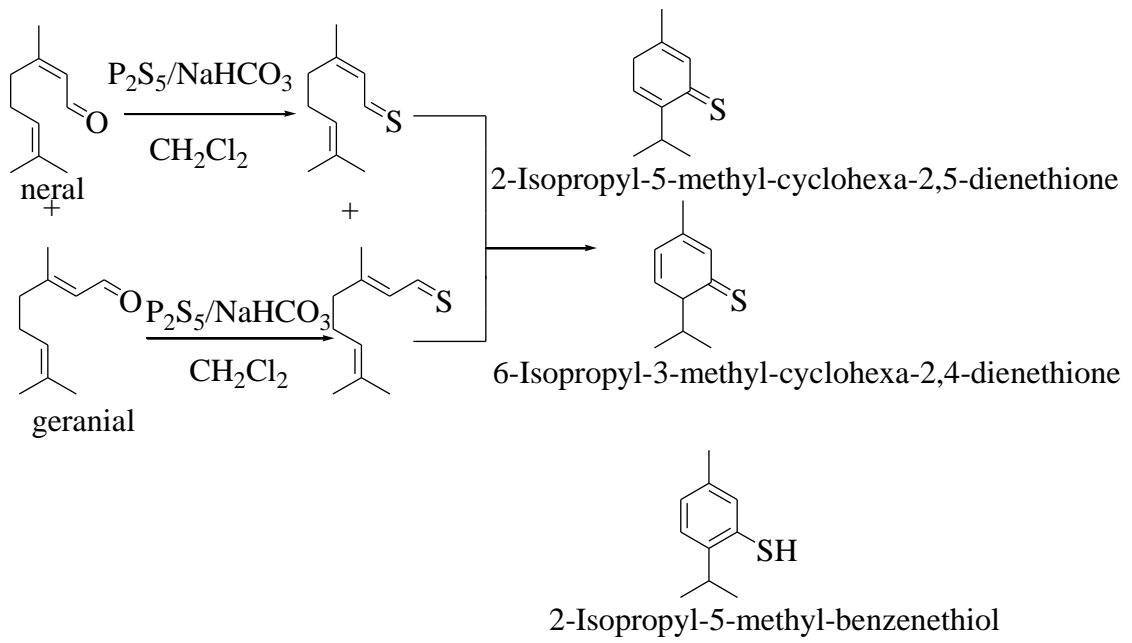
L'analyse par CG/SM a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 4.7.

**Tableau 4.7 :** Composition chimique de l'HE d'*Aloysia triphylla* modifiée.

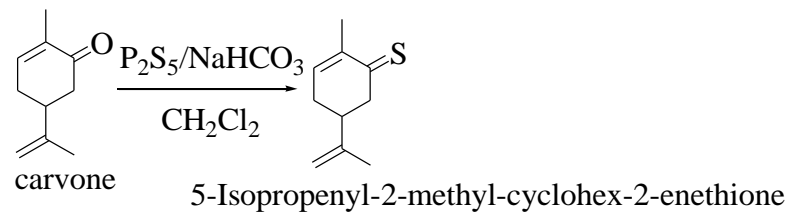
Composés	Tr (min)	Composition (%)
Eucalyptol (1,8-Cineol)	10,18	1.77
D-Limonène	10.02	0.89
5-Isopropenyl-2-methyl-cyclohex-2-enethione	20,67	2.87
2-Isopropyl-5-methyl-cyclohexa-2,5-dienethione	22,59	3.50
6-Isopropyl-3-methyl-cyclohexa-2,4-dienethione	24,99	10,88
2-Isopropyl-5-methyl-benzenethiol	27,13	7.98
δ- Muurololene	29.04	1.51
δ- cadinene	31,24	3.16
Curcumene	37,53	14.05
Spathulenol	43,50	39.48
Caryophylleneoxide	43,66	12.53
Nerolidol	31.24	1.38

Les composés carbonyles à savoir le néral, le géranial et le carvone ont été transformés par cyclisation en enethiol et thione (Figure 4.9) ainsi que la thionation du carvone en 5-Isopropenyl-2-methyl-cyclohex-2-enethione (carvothione) selon les réactions suivantes (Figure 4.10). Il faut ajouter qu'en solution la fonction thione se transforme en fonction thiole par tautomérie irréversible [9].

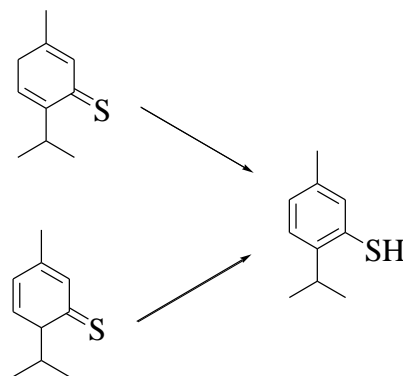




**Figure 4.9:** Réaction de thionation du néral et géranial



**Figure 4.10:** Réaction de thionation du carvone



**Figure 4.11:** Réaction de tautomérisation thione–enethiol.

#### 4.3. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* native et modifiée

Nous avons testé l'huile essentielle avant et après modification chimique vis-à-vis des souches bactériennes et moisissures citées précédemment en appliquant la méthode de diffusion sur disque qui nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des huiles essentielles.

La détermination de l'activité antibactérienne se fait par la méthode de diffusion par disque (aromatogramme). Nous rapportons dans le (**tableau.4.8**) les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles d'*Aloysia triphylla*, native puis modifiée.

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* native donne des zones d'inhibitions entre 14 et 26 mm avec les deux souches bactériennes. La bactérie gram<sup>-</sup> (*E. coli*) présente la plus grande activité avec une zone d'inhibition de 32 mm alors que la bactérie gram<sup>+</sup> présente une zone d'inhibition de 26 mm pour *S. aureus*. Les résultats obtenus pour la souche antifongique testée ont montré que la souche *C. albicans* est extrêmement sensible pour l'HE d'*Aloysia triphylla* native avec une zone d'inhibition de 36mm. La différence des diamètres d'inhibition pourrait être due principalement à la composition chimique de l'huile essentielle extraite et l'activité antibactérienne de ces dernières pourrait principalement être due aux composés majoritaires : Citral (géraniol, néral) et limonène. D'après Cushnie T et al. 2011[117]. Il y a plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antimicrobienne comme : le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives des métabolites secondaires.

Pour l'HE d'*Aloysia triphylla* modifiée, le tableau 4.6 montre une activité fortement inhibitrice. Des diamètres d'inhibition plus élevés que l'HE native surtout pour les souches antifongiques. Alors que L'HE d'*Aloysia triphylla* modifiée montre une activité extrêmement sensible vis-à-vis les deux souches bactériennes testées *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition de 32 mm et 26 mm respectivement.

Selon le **tableau 4.8** l'HE d'*Aloysia triphylla* modifiée présente aussi une très forte activité antifongique vis-à-vis *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de 40 mm. dans ce cas l'HE modifiée est alors fortement inhibitrice.

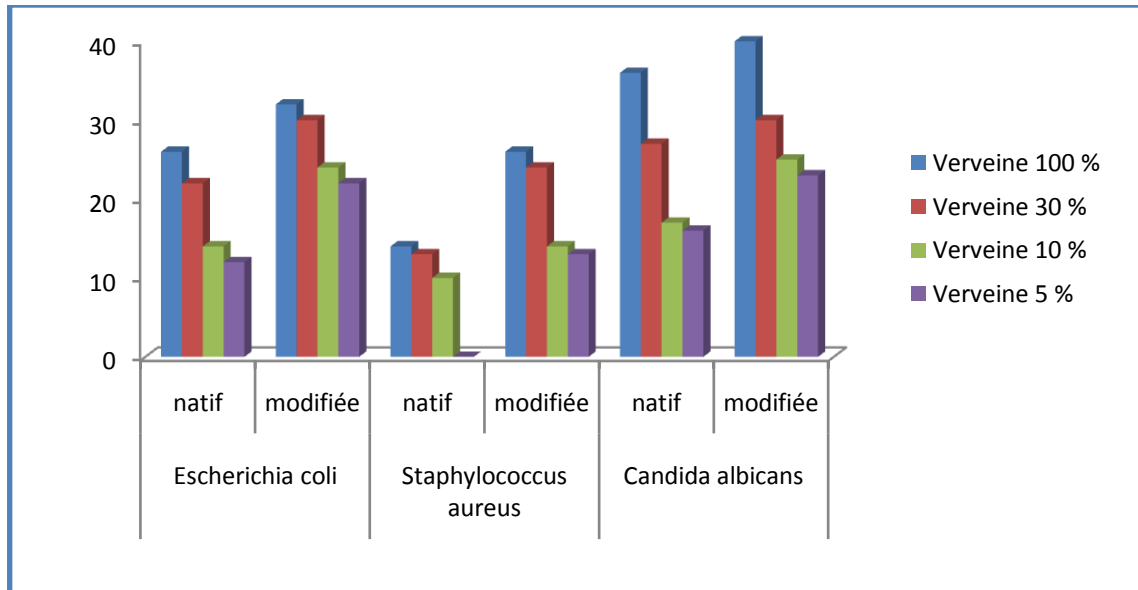
**Tableau 4.8:** Résultats des tests d'activité antimicrobienne des huiles essentielles natives et des thio-cyclisées (mm) \*.

		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Ciprofloxacine		25	35	-
Metronidazol		-	-	40
HE	5	12	-	16
	10	14	10	17
	30	22	13	27
	100	26	14	36
HEM	5	22	13	23
	10	24	14	25
	30	30	24	30
	100	32	26	40

\*Les tests avec du solvant pur (DMSO) étaient négatifs

D'après les résultats obtenus dans le **tableau 4.10**, Il faut noter que tous les dérivés thionés testés ont montré des diamètres d'inhibition supérieure devant celle de l'huile essentielle native. Nous remarquons que la souche antifongique *Candida albicans* est plus sensible à toutes les huiles essentielles (native et modifiée) elle révèle des résultats assez modérés, les meilleurs zones d'inhibition sont observées pour l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* modifiée. Les composés thionés possèdent une activité très intéressante surtout contre la

souche antifongique *candidat albicans*, malgré la non solubilité totale du produit, il révèle des résultats assez modérés.



**Figure 4.12 :** Activité antibactérienne de l'HE d'*Aloysia triphylla* native et modifiée.

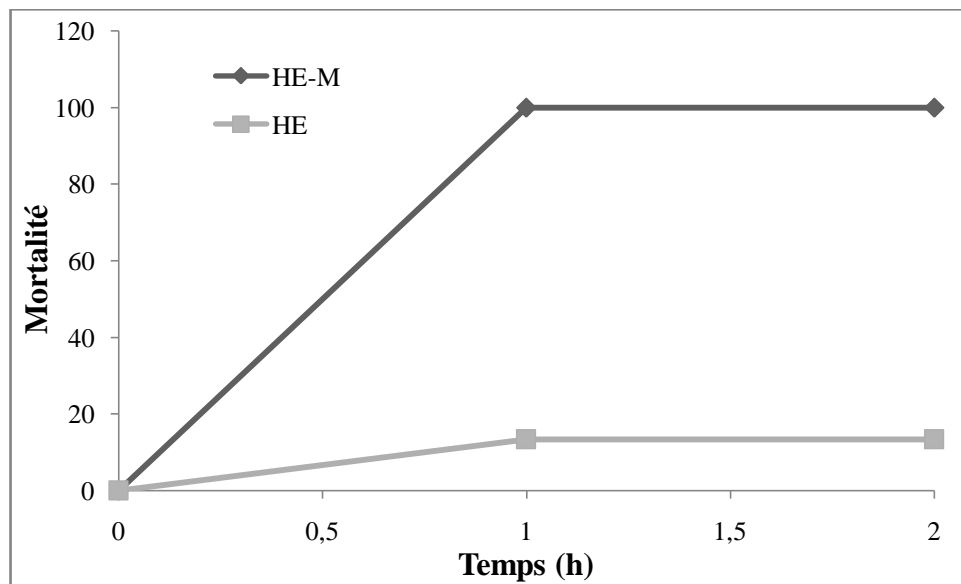
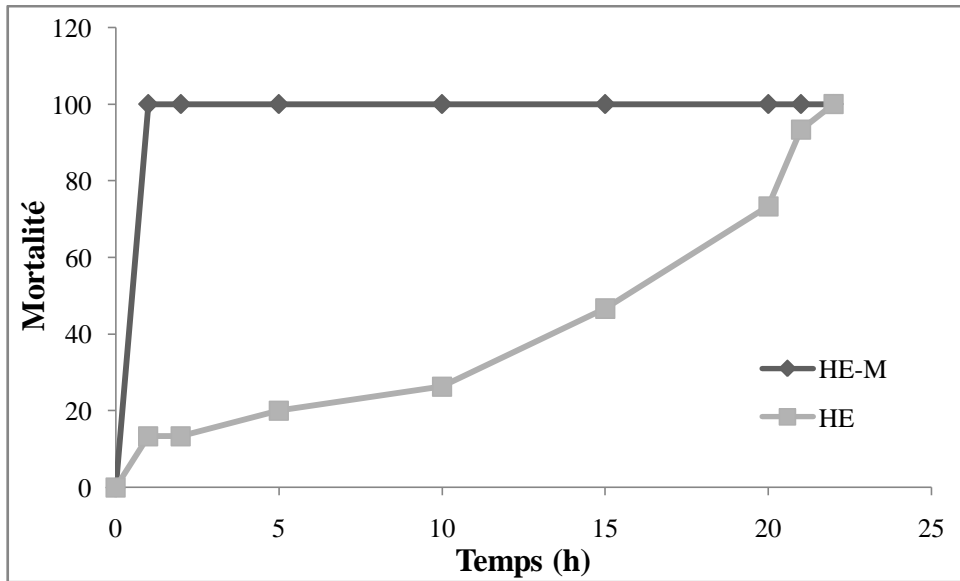
En conclusion, l'HE native et modifiée ont réagit positivement sur toutes les souches microbiennes testées ce qui confirme que l'HE native et modifiée de la plante d'*Aloysia triphylla* sont douées de propriétés antimicrobiennes.

#### 4.4. Résultats de l'évaluation de l'activité insecticide de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* native et modifiée

L'évaluation du pouvoir insecticide de l'huile essentielle d'*Aloysia triphylla* native et modifiée adonné les résultats suivants :

L'ensemble des figures représente l'effet de l'HE d'*Aloysia triphylla* contre la *Sitophilus oryzae* par fumigation. D'après la **Figure 4.13**, nous remarquons après 1h d'exposition le taux de mortalité de l'HE d'*Aloysia triphylla* atteint une valeur de 13,33 %, et une valeur de 73,33 % après 20 h, les *Sitophilus oryzae* ont été éliminés totalement après 22 h et que le taux de mortalité de l'HE d'*Aloysia triphylla* modifiée atteint après 1h une valeur de 100 %. Les résultats obtenus montrent que les *Sitophilus oryzae* ont été éliminés partiellement

avec un taux de mortalité de 13,33 % après 1h d'exposition. Par contre le taux de mortalité de l'HE modifiée après la même durée atteint son maximum.



**Figure 4.13 :** Variation du taux de mortalité des insectes traités par l'HE d'*Aloysia triphylla* native et modifiée en fonction du temps.

## CONCLUSION GENERALE

Au cours de ce travail, nous avons présenté une contribution à la valorisation du potentiel aromatique et médicinaux de la flore algérienne. Nous avons effectué des tests d'évaluation utilisant des composés phytochimiques, la synthèse organique et la recherche sur l'activité biologique. Nous avons étudié les composés cycliques et aliphatiques comportant le motif thiocétone comme biopesticide.

Dans cette étude, des parties aériennes d'*Aloysia triphylla* ont été récoltées à deux saisons (automne et printemps). Les rendements moyens en huile essentielle isolée par hydro distillation pendant 3 h à l'aide d'un appareil de type Clevenger sont variables (0.2-0.35%). L'huile essentielle extraite a été analysée par GC-MS. Les principaux composés étaient le néral et le géraniol avec des teneurs plus élevées au stade végétatif (48,17%) qu'en pleine floraison (35,13%). Où le néral présentait 20,62% de l'huile essentielle récoltée en Avril-Mai et 15,97% de l'huile récoltée en Septembre; d'un autre côté, le géraniol a été détecté avec 27,55% et 19,16% respectivement.

La thionation de l'huile essentielle de la verveine a été effectuée par action de  $P_2S_5$ , ceci a conduit à la transformation par cyclisation des aldéhydes, géraniol et néral en thiol et thione ainsi que la thionation du carvone en 5-Isopropenyl-2-méthyl-cyclohex-2-énethione (carvothione).

L'activité antibactérienne et antifongique de l'HE d'*Aloysia triphylla* a été déterminée selon la méthode de l'aromatogramme ; cette technique montre que notre huile possède une activité sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et la levure *Candida albicans*. On constate que l'HE d'*Aloysia triphylla* présente une activité antimicrobienne modérée.

La modification chimique de cette huile essentielle a provoqué une amélioration de l'activité antimicrobienne contre ces souches ainsi que l'augmentation de l'activité insecticide testée par fumigation contre la souche *Stiphilus Oryzae*.

A la lumière de ces résultats, une étude plus approfondie sur l'effet tautomère et la stabilité des thioaldéhydes sont recommandées; de plus les activités biologiques de ces huiles essentielles étudiées peuvent être approfondies par la détermination des concentrations minimales inhibitrice ainsi que la  $DL_{50}$ .

L'huile essentielle thionée d'*Aloysia triphylla* pourrait être utilisée dans d'autres applications, comme: un bio-pesticide.

## Référence :

1. Ghédira, K. and P. Goetz, *Verveine odorante Aloysia citriodora Paláu (Lippia citriodora)*. *Phytothérapie*, 2017. **15**(1): p. 33-37.
2. Bouhdid, S., et al., *Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities*. Congrès international de biochimie, 2006. **324**: p. 327.
3. Goudjil, M., et al., *Chemical compounds profile, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil extracted from the Artemisia herba-alba of Southern Algeria*. *Int. J. Biol. Chem*, 2015. **9**: p. 70-78.
4. Sarkic, A. and I. Stappen, *Essential oils and their single compounds in cosmetics—A critical review*. *Cosmetics*, 2018. **5**(1): p. 11.
5. Cavanagh, H.t.t. and J.t. Wilkinson, *Biological activities of lavender essential oil*. *Phytotherapy research*, 2002. **16**(4): p. 301-308.
6. Şahin, F., et al., *Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey*. *Food control*, 2004. **15**(7): p. 549-557.
7. Mujtaba, M., et al., *Critical review on sesame seed oil and its methyl ester on cold flow and oxidation stability*. *Energy Reports*, 2020. **6**: p. 40-54.
8. Fabio, A., et al., *Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 2007. **21**(4): p. 374-377.
9. Burt, S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. *International journal of food microbiology*, 2004. **94**(3): p. 223-253.
10. Demo, M., et al., *Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina*. *Pharmaceutical biology*, 2005. **43**(2): p. 129-134.
11. Paolini, J., et al., *Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of Calendula arvensis L.* *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010. **38**(5): p. 865-874.
12. Filippi, J.-J., X. Fernandez, and E. Duñach, *Les composés volatils soufrés en chimie des arômes*. *Sciences des aliments*, 2007. **27**(1): p. 23-46.
13. Swiegers, J. and I. Pretorius, *Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007. **74**(5): p. 954-960.
14. Gnanambal, K.M.E., J. Patterson, and E.J. Patterson, *Isolation of a novel antibacterial phenyl thioketone from the seagrass, Cymodocea serrulata*. *Phytotherapy Research*, 2015. **29**(4): p. 554-560.
15. Fekhar, N., et al., *Thionation of essential oils from algerian Artemisia herba-alba L. and Ruta montana L.: impact on their antimicrobial and insecticidal activities*. *Chemistry Journal of Moldova*, 2017. **12**(2): p. 50-57.
16. DjamilaBelouahem-AbedaFoudilBelouahemaMohamedBenslamabGérardde BélaïrbSerge D.MullerLes aulnaies de Numidie (N.E. algérien) : biodiversité floristique, v.e.c.f.o.N.N.E.A.F.b., vulnerability and conservation. *Comptes Rendus Biologies and I. Volume 334*, 2011 :61-73.
17. Argyropoulou, C., et al., *Chemical composition of the essential oil from leaves of Lippia citriodora HBK (Verbenaceae) at two developmental stages*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007. **35**(12): p. 831-837.
18. Santos-Gomes, P.C., M. Fernandes-Ferreira, and A.M. Vicente, *Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain [Aloysia triphylla (L'Herit.)*

- Britton] grown in Portugal*. Journal of Essential Oil Research, 2005. **17**(1): p. 73-78.
19. Carnat, A., Carnat, A.P., Fraisse, D., Lamaison, J.L. (1999). The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*, 70, 44–49.
  20. Ganesan, K., et al., *Review on the Production of Polysaccharide Aerogel Particles*. Materials, 2018. **11**: p. 2144.
  21. Stashenko, E.E., et al., *Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from Lippia (Verbenaceae) aromatic plants*. Journal of separation science, 2013. **36**(1): p. 192-202.
  22. Siedo, S.J., *Four new species of the genus Aloysia (Verbenaceae)*. Lundellia, 2012. **2012**(15): p. 35-46.
  23. Gálvez-Ruíz, J.C., et al., *Actividad anti-proliferativa de Aloysia sonorensis sobre líneas celulares de cáncer*. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2020. **23**(1): p. 1-8.
  24. Werdin Gonzalez, J.O., et al., *Biological activity of essential oils from Aloysia polystachya and Aloysia citriodora (Verbenaceae) against the soybean pest Nezara viridula (Hemiptera: Pentatomidae)*. Natural Product Communications, 2010. **5**(2): p. 1934578X1000500227.
  25. Hellion-Ibarrola, M., et al., *The anxiolytic-like effects of Aloysia polystachya (Griseb.) Moldenke (Verbenaceae) in mice*. Journal of ethnopharmacology, 2006. **105**(3): p. 400-408.
  26. Mora, S., et al., *Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from Aloysia polystachya in rats*. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2005. **82**(2): p. 373-378.
  27. Pina, E.S., et al., *Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Aloysia polystachya (Griseb.) Moldenke grown in Brazil*. Journal of Medicinal Plants Research, 2012. **6**(41): p. 5412-5416.
  28. Montanari, R.M., et al., *Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: Alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D*. Química Nova, 2011. **34**(9): p. 1550-1555.
  29. Bassols, G.B. and A.A. Gurni, *Especies del género Lippia utilizadas en medicina popular latinoamericana*. Dominguezia, 1996. **13**(1): p. 7-25.
  30. Wasowski, C. and M. Marder, *Central nervous system activities of two diterpenes isolated from Aloysia virgata*. Phytomedicine, 2011. **18**(5): p. 393-401.
  31. Benovit, S.C., et al., *Anesthetic activity and bio-guided fractionation of the essential oil of Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. in silver catfish Rhamdia quelen*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2015. **87**(3): p. 1675-1689.
  32. Souza, M.A., et al., *Supercritical CO2 extraction of Aloysia gratissima leaves and evaluation of anti-inflammatory activity*. The Journal of Supercritical Fluids, 2020. **159**: p. 104753.
  33. Santos, F., et al., *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from the leaves and flowers of Aloysia gratissima*. Revista Brasileira de Plantas Medicinai, 2013. **15**(4): p. 583-588.
  34. Zeni, A.L.B., et al., *Phytochemical profile, toxicity and antioxidant activity of Aloysia gratissima (Verbenaceae)*. Química Nova, 2013. **36**(1): p. 69-73.
  35. Zeni, A.L.B., et al., *Antidepressant-like and neuroprotective effects of Aloysia gratissima: investigation of involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway*. Journal of ethnopharmacology, 2011. **137**(1): p. 864-874.



36. Simionatto, E., et al., *Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Aloysia sellowii*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2005. **16**(6B): p. 1458-1462.
37. Bahramsoltani, R., et al., *Aloysia citrodora Paláu (Lemon verbena): A review of phytochemistry and pharmacology*. Journal of ethnopharmacology, 2018. **222**: p. 34-51.
38. Pascual, M., et al., *Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review*. Journal of ethnopharmacology, 2001. **76**(3): p. 201-214.
39. Pascual, M.E., et al., *Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review*. J Ethnopharmacol, 2001. **76**(3): p. 201-14.
40. Moradi, M., A. Mehrafarin, and H. Naghdi Badi, *Phytochemical variations in lemon verbena (Lippia citriodora H.B.K.) plantlets affected by propagation methods and soil type*. Journal of Medicinal Plants, 2014. **13**: p. 54-68.
41. Karik, Ü., et al., *Limonotu (Lippia citriodora H.B.K.) Uçucu Yağının Morfolojik ve Gün İçindeki Değişimi*. Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2019: p. 114-120.
42. Rezig, L., et al., *Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Aloysia Triphylla L. essential oils and methanolic extract*. Italian Journal of Food Science, 2019. **31**(3).
43. Ponce-Monter, H., et al., *Spasmolytic and anti-inflammatory effects of Aloysia triphylla and citral, in vitro and in vivo studies*. Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi, 2010. **46**: p. 309-19.
44. Pastorelli, G., R. Rossi, and C. Corino, *Influence of Lippia citriodora verbascoside on growth performance, antioxidant status, and serum immunoglobulins content in piglets*. Czech Journal of Animal Science, 2012. **57**(7): p. 312-322.
45. Gómez, L.A., E. Stashenko, and R.E. Ocazonez, *Comparative study on in vitro activities of citral, limonene and essential oils from Lippia citriodora and L. alba on yellow fever virus*. Natural product communications, 2013. **8**(2): p. 1934578X1300800230.
46. Fellah Aicha, M.N., Etude de l'extraction et de l'activité antioxydante et, a.d.e.d.l. verveine, and C.p.e.s.n. "Lippia citriodora.
47. Teuscher, E., R. Anton, and A. Lobstein, *Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles* 2005: Tec & Doc.
48. Bruneton, J., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.)*. Tec & Doc/Lavoisier, Paris, 2009: p. 279-281.
49. Infante Espiñeira, R., et al., *Effect of drying process on lemon verbena (Lippia citrodora Kunth) aroma and infusion sensory quality*. 2010.
50. Cronquist, A., *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia Univ. Press, New York. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York., 1981: p. -.
51. Özek, T., et al., *Composition of the essential oil of Aloysia triphylla (L'Herit.) Britton grown in Turkey*. Journal of Essential Oil Research, 1996. **8**(5): p. 581-583.
52. Vigneau, C., *Plantes médicinales: thérapeutique-toxicité* 1985: Masson.
53. Bensabah, F., A. Lamiri, and J. Naja, *Effect of purified wastewater from the city of Settat (Morocco) on the quality of Lippia citriodora essential oil and infusion*. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2015. **14**(2): p. 101-108.
54. Ali, H., H. El Beltagi, and N. Nasr, *Assessment of volatile components, free radical-scavenging capacity and anti-microbial activity of lemon verbena leaves*. Res J Phytochem, 2008. **2**: p. 84-92.

55. Hudaib, M., K. Tawaha, and Y. Bustanji, *Chemical profile of the volatile oil of Lemon verbena (Aloysia citriodora Paláu) growing in Jordan*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2013. **16**(5): p. 568-574.
56. Mezni, F., et al., *Evaluation of Pistacia lentiscus seed oil and phenolic compounds for in vitro antiproliferative effects against BHK21 cells*. Pharmaceutical biology, 2016. **54**(5): p. 747-751.
57. Kizil, S. and Ö. Tonçer, *Essential Oil and Microelement Composition of Thymus citriodorus L. and Lippia citriodora HBK*. Cercetari Agronomice in Moldova, 2016. **49**(2): p. 97-105.
58. Ait Mohand, B., A. El Antari, and F. Benkhalti, *Chemical Composition of Pistacia lentiscus Seeds' Oil from Moroccan High Atlas Mountain*. Journal of Food Quality, 2020. **2020**.
59. Zoubiri, S. and A. Baaliouamer, *Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria*. Food Chemistry, 2011. **129**(1): p. 179-182.
60. Ragone, M.I., et al., *The spasmolytic effect of Aloysia citriodora, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum*s. Journal of Ethnopharmacology, 2007. **113**(2): p. 258-266.
61. Akkaya, M., *Fatty acid compositions of sunflowers (Helianthus annuus L.) grown in east Mediterranean region*. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse, 2018. **XCIV**: p. 239-247.
62. Newall, C.A., L.A. Anderson, and J.D. Phillipson, *Herbal medicines. A guide for health-care professionals*1996: The pharmaceutical press.
63. Graca, J., et al., *Guia práctico de remédios e tratamentos naturais*. Selecções do Reader's Digest, Lisboa, Portugal, 1996: p. 150.
64. Ragone, M.I., et al., *Sedative and cardiovascular effects of Aloysia citriodora Palau, on mice and rats*. Latin American Journal of Pharmacy, 2010. **29**(1): p. 79-86.
65. Bilia, A., et al., *HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **46**(3): p. 463-470.
66. De Figueiredo, R.O., et al. *Essential oil composition of Aloysia triphylla (L'Herit) Britton leaves cultivated in Botucatu, São Paulo, Brazil*. in XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants 629. 2002.
67. Kim, J., M.R. Marshall, and C.-i. Wei, *Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens*. Journal of agricultural and food chemistry, 1995. **43**(11): p. 2839-2845.
68. Oukerrou, M.A., et al., *Chemical composition and cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil of Aloysia citriodora palau grown in Morocco*. Advances in pharmacological sciences, 2017. **2017**.
69. Oliva, M.d.l.M., et al., *Antimicrobial activity of essential oils of Aloysia triphylla (LHer.) Britton from different regions of Argentina*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2010. **9**(1): p. 29-37.
70. de Souza, R.C., et al., *Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of Aloysia triphylla and Lippia alba against Aeromonas spp*. Microbial Pathogenesis, 2017. **113**: p. 29-33.
71. Benelli, G., et al., *Acute larvicidal toxicity of five essential oils (Pinus nigra, Hyssopus officinalis, Satureja montana, Aloysia citrodora and Pelargonium*

- graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergistic and antagonistic effects. *Parasitology international*, 2017. **66**(2): p. 166-171.
72. Block, E., *Reactions of Organosulfur Compounds: Organic Chemistry: A Series of Monographs, Vol. 37*. Vol. 37. 2013: Academic press.
  73. Cremlyn, R., *An Introduction to Organosulfur Chemistry John Wiley and Sons: Chichester*, 1996, USA.
  74. Panhwar, T., et al., *Characteristics and Composition of a High Oil Yielding Castor Variety from Pakistan*. *Journal of Oleo Science*, 2016. **65**: p. 471-476.
  75. Yeilaghi, H., et al., *Effect of salinity on seed oil content and fatty acid composition of safflower (Carthamus tinctorius L.) genotypes*. *Food Chemistry*, 2012. **130**(3): p. 618-625.
  76. Han, X., et al., *Extraction of safflower seed oil by supercritical CO<sub>2</sub>*. *Journal of Food Engineering*, 2009. **92**(4): p. 370-376.
  77. Patai, S., *The chemistry of double-bonded functional groups* 1997: Wiley-Blackwell.
  78. Henry, L., *Ueber eine neue Bildungs-und Darstellungsweise der Nitrile*. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1869. **152**(2): p. 148-152.
  79. Wislicenus, J., *Vorläufige Mittheilungen*. *Z. Chem*, 1869. **12**: p. 324-326.
  80. Murai, T., *Thio-, seleno-, telluro-amides, in Chalcogenocarboxylic Acid Derivatives* 2005, Springer. p. 247-272.
  81. Curphey, T.J., *Thionation with the reagent combination of phosphorus pentasulfide and hexamethyldisiloxane*. *The Journal of organic chemistry*, 2002. **67**(18): p. 6461-6473.
  82. Curphey, T.J., *Thionation of esters and lactones with the reagent combination of phosphorus pentasulfide and hexamethyldisiloxane*. *Tetrahedron letters*, 2002. **43**(3): p. 371-373.
  83. Eberhard.T et Robert.A et Annelise.L ; « *Plantes aromatiques : épices, a. and c.e.h.e.É.T.D.L.P.* pp488-489.
  84. Sudalai, A., S. Kanagasabapathy, and B.C. Benicewicz, *Phosphorus pentasulfide: A mild and versatile catalyst/reagent for the preparation of dithiocarboxylic esters*. *Organic Letters*, 2000. **2**(20): p. 3213-3216.
  85. Bergman, J., et al., *Thionations Using a P4S10– Pyridine Complex in Solvents Such as Acetonitrile and Dimethyl Sulfone*. *The Journal of organic chemistry*, 2011. **76**(6): p. 1546-1553.
  86. Mohammad Ghiath Naser Al-Deen., R.M., Malak Al Joubbeh., 2015. *Fluctuations of chemical composition of essential oil and Antimicrobial of Lemon Verbena (Lippia citriodora) during growth stages in Syria*, vol.8(6), pp.704-710.
  87. Polshettiwar, V. and M. Kaushik, *A new, efficient and simple method for the thionation of ketones to thioketones using P4S10/Al2O3*. *Tetrahedron letters*, 2004. **45**(33): p. 6255-6257.
  88. Brayton, D., et al., *A novel heterocyclic atom exchange reaction with Lawesson's reagent: a one-pot synthesis of dithiomaltol*. *Chemical communications*, 2006(2): p. 206-208.
  89. Cava, M.P. and M.I. Levinson, *Thionation reactions of lawesson's reagents*. *Tetrahedron*, 1985. **41**(22): p. 5061-5087.
  90. Kaleta, Z., et al., *Thionation using fluoros Lawesson's reagent*. *Organic letters*, 2006. **8**(8): p. 1625-1628.
  91. Dittmer, D.C. and E.S. Whitman, *Addition of thiobenzophenone to benzenediazonium-2-carboxylate*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1969. **34**(6): p. 2004-2006.

92. Airiau, E., *Synthèse d'hétérocycles azotés par réactions multicomposantes et domino basées sur l'hydroformylation*, 2009, Strasbourg.
93. Pettersson, B., *Synthetic studies towards 7-and 8-membered N-heterocycles, particularly 1, 4-Pyrrolobenzodiazepines*, 2011, Ph. D. Dissertation, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.
94. Dastychová, L., et al., *Reactions of P4S10 and pyPS2Cl with N, N'-diphenylurea and N, N'-diphenylthiourea*. Polyhedron, 2007. **26**(15): p. 4250-4256.
95. El-Barbary, A., *Reaction of esters, ortho esters, acetals, thioacetals and epoxides with 2, 4-bis (4-methoxyphenyl)-1, 3, 2, 4-dithiadiphosphetane 2, 4-disulfide (Lawesson reagent)*. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 1984. **115**(6-7): p. 769-777.
96. Ong, M.J. and R.J. Hewitt, *Synthesis of 1, 4, 2-Oxathiazoles via Norrish Type II Generation of Thiocarbonyls*. ChemistrySelect, 2019. **4**(35): p. 10532-10535.
97. Jaiswal, V., B. Mondal, and J. Saha, *Recent Developments on the Synthesis of Various Sulfur-Containing Heterocycles via [3+ 2]-and [4+ 2]-Cycloaddition Reactions with Thiocarbonyls*. Asian Journal of Organic Chemistry, 2020. **9**(10): p. 1466-1477.
98. Ponce-Monter, H., et al., *Spasmolytic and anti-inflammatory effects of Aloysia triphylla and citral, in vitro and in vivo studies*. Journal of smooth muscle research, 2010. **46**(6): p. 309-319.
99. Manenzhe, N.J., N. Potgieter, and T. van Ree, *Composition and antimicrobial activities of volatile components of Lippia javanica*. Phytochemistry, 2004. **65**(16): p. 2333-6.
100. Benayad, N., *Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes marocaines et activité anticancéreuse*. 2013.
101. Chenni, M., *Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic «Ocimum basilicum L.» extraite par hydro-distillation et par micro-ondes*. Mémoire de doctorat, université d'Oran, 2016. **1**.
102. Ponce, A.G., et al., *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. und] Technologie. Food science + technology. Science + technologie alimentaire, 2003. **36**(7): p. 679-684.
103. Fekhar, N., et al., *Thionation of Essential Oils from Algerian Artemisia Herba-alba L. and Ruta Montana L.: Impact on their Antimicrobial and Insecticidal Activities*. Chemistry Journal of Moldova, 2017. **12**.
104. Saidj, F., et al., *Chemical composition and insecticidal properties of Thymus numidicus (Poiret) essential oil from Algeria*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2008. **11**(4): p. 397-405.
105. Duschatzky, C.B., et al., *Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants*. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 2005. **16**(4): p. 247-251.
106. Agah, M. and S. Najafian, *Essential oil content and composition of Lippa citriodora as affected by drying method before flowering stages*. European Journal of Experimental Biology, 2012. **2**(5): p. 1771-1777.
107. Sartoratto, A., et al., *Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil*. Brazilian Journal of Microbiology, 2004. **35**(4): p. 275-280.

108. Gomes, P., et al., *Production, transformation and essential oils composition of leaves and stems of lemon verbena [Aloysia triphylla (L'Herit.) Britton] grown in Portugal*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 2006. **8**: p. 130-135.
109. Shahhoseini, R., et al., *Essential oil content and composition of lemon verbena (Lippia citriodora Kunth.) during different phenological stages*. Journal of Medicinal Plants and By-products, 2013. **2**: p. 205-208.
110. Bylaitè, E., et al., *Composition of essential oil of costmary [Balsamita major (L.) Desf.] at different growth phases*. Journal of agricultural and food chemistry, 2000. **48**(6): p. 2409-2414.
111. Santos-Gomes, P.C. and M. Fernandes-Ferreira, *Organ-and season-dependent variation in the essential oil composition of Salvia officinalis L. cultivated at two different sites*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(6): p. 2908-2916.
112. Sefidkon, F., et al., *The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of Satureja rechingeri Jamzad*. Food chemistry, 2007. **100**(3): p. 1054-1058.
113. Rohloff, J., et al., *Effect of harvest time and drying method on biomass production, essential oil yield, and quality of peppermint (Mentha × piperita L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(10): p. 4143-4148.
114. Clark, R.J. and R.C. Menary, *The effect of two harvests per year on the yield and composition of Tasmanian peppermint oil (Mentha piperita L.)*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1984. **35**(11): p. 1191-1195.
115. Marotti, M., et al. *EFFECT OF HARVESTING STAGE ON THE YIELD AND ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF PEPPERMINT (MENTHA X PIPERITA L.)*. in *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants 344*. 1993.
116. Carnat, A., et al., *The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea*. Fitoterapia, 1999. **70**(1): p. 44-49.
117. Cushnie, T.T. and A.J. Lamb, *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*. International journal of antimicrobial agents, 2011. **38**(2): p. 99-107.