



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche  
Scientifique



Université Saad Dahleb-Blida 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie  
département de la biotechnologie  
Laboratoire de Recherche des Plante Médicinales et Aromatique

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de diplôme de master en  
**Spécialité**

Biotechnologie et Valorisation des Plantes

**Filière**

Biotechnologie Végétale

**THEME**

**Étude Phytochimique et Activité Biologique de CYMBOPOGON  
CITRATUS "citronnelle"**

Présenté par : Mlle IHADDADENE Wafa

Mlle MERROUCHE Aya

Soutenu Publiquement le **01/09/2020** Devant le Jury :

**Mme Allal L.**

Prof

**Présidente**

**Mme Kebour D.**

Prof

**Promotrice**

**Mme Faidi H.**

Maa

**Examinatrice**

:

**2019/2020**

## Remerciement

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage »

Avant tout on s'adresse nos vifs remerciements à Dieu, le tout puissant, qui nous a dotés d'une grande volonté, de force, de patience et d'un savoir adéquat pour mener à bien ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice **Madame KEBOUR Djamila** pour son aide, ses conseils précieux, ses qualités humaines, ses explications et suggestions pertinentes qui nous ont permis d'enrichir nos connaissances et de réaliser un travail convenable.

Un grand remerciement à **Madame ALLAL L.** D'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance, recevez ici toute notre gratitude et notre reconnaissance.

Nous tenons aussi à remercier **Madame FAIDI H.** d'avoir fait l'honneur d'examiner notre modeste travail. Vous nous faites l'exemple avec vos compétences.

Il nous 'est spécialement agréable, d'exprimer toute ma reconnaissance envers les personnes qui de près ou de loin nous ont apporté leurs soutiens dans la réalisation de ce projet.

Un grand remerciement aussi à **Monsieur BENDALI Abdelaziz**, chef de département des Biotechnologies.

Enfin je remercie également tous mes enseignants et mes camarades de cette promotion pour leurs encouragements.

Merci à tous.

**AYA ET Wafa**

## *Dédicaces*

Je dédie ce modeste travail à...

A la mémoire de mon très cher papa **MERROUCHE BOUALEM**.

Je ne saurais exprimer mon grand chagrin en ton absence. J'aurais aimé que tu sois à mes cotés ce jour.

*A ma chère maman **GACEM MALIKA** qui m'a encouragé et de ma donner tout son amour durant toutes mes études, et qui sans elle, ma réussite n'aura pas eu lieu.*

**« Pour vos mains qui ont tant travaillées, Pour votre cœur qui m'a tant donné Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé, Pour vos yeux qui furent parfois mouillés, Pour vous qui m'avez tant aimé »**

*A ma très chère sœur **AICHA**, la personne qui m'a arrosé la vie par son sourire, son humeur et son amour.*

*A mes frères **TAKIEDDINE** et **KHEIREDDINE**, vous étiez toujours mon point de fort et ma force.*

*A ma très chère grand-mère **AICHA GACEM**, qui ma soutenu toujours avec ses prières.*

*A mes tantes **NAIMA** et **MERIEM** et leurs maris **BRAHIM** et **YOUCEF** vous étiez toujours là pour m'encourager dans mon cursus.*

*A mes cousins **SIDAHMED**, **MAKHELOUF**, **TAMER** ET **AMINE**.*

*A mes cousines **NOURHANE** et **ROUEYA**.*

*A mon binôme **Wafa IHADDADENE**.*

*A toute ma grande famille, mes enseignants, mes amies et tous ceux que j'ai connu durant mon cycle d'étude.*

***Merrouche Aya.***

*A ma chère mère **NOURA ALISAHRAOUI***

*Les mots ne suffise pas pour exprimes ma gratitude pou tous ce que tu ma donne le soutien, affection et la tendresse, n'importe quel obstacle Jai affronté t'étais toujours la pour moi,*

*Merci maman.*

*A mon très cher père*

*T'étais toujours mon soutien j'aimerais que ce travail exprime ma gratitude pou toi*

*A mon très cher frère et sœurs **AYMEN, WISSEM, YASMINE.***

*A mes meilleurs amies **YASMINE RABEA DRAI, NESRINE HAMIDET.***

*A mon binôme **AYA MERROUCHE.***

*A toute ma grande famille, mes enseignants, mes amies et tous ceux que j'ai connu durant mon cycle d'étude.*

***Ihaddadene Wafa.***

## Résumé

Notre objectif est d'étudier et valoriser la plante *Cymbopogon citratus*, commençant par son origine, sa répartition géographique, l'usage de cette plante, on s'est approfondi dans notre étude où on a fait l'extraction en utilisant l'hydrodistillation et l'analyse des huiles essentielles de la citronnelle en utilisant différentes méthodes d'identifications combinées (Chromatographie et Spectrométrie de masse), dans le composé principal est le citral et nous avons fait une comparaison entre les composés chimiques de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* de deux pays Brésil et Cuba.

Enfin on a étudié l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de la citronnelle où on a testé les différentes concentrations de l'huile essentielle (5% 10% 15% 20% 25% 30%) sur les souches bactériennes suivantes : *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, et déterminé la concentration Minimale Inhibitrice de l'huile essentielle de citronnelle sur les souches précédentes.

**Mots clés :** *Cymbopogon citratus* ; Huile essentielles ; Citral ; Activité antibactérienne ; *E. coli* ; *K. pneumoniae* ; *P. aeruginosa* ; *S. aureus*

## Abstract

Our objective is to study and valorize the plant *Cymbopogon citratus*, starting with its origin, its geographical distribution, the use of this plant, we deepened, in our study where we did the extraction using hydrodistillation and an analysis of essential oils of citronella using different methods of identification combined (Chromatography and Mass Spectrometry), in which the main compound is citral and we made a comparison between the chemical compounds of the essential oil of *Cymbopogon Citratus* from two countries Brazil and Cuba .

Finally, we studied the antibacterial activity of the essential oil of citronella where we tested the different concentrations of the essential oil (5% 10% 15% 20% 25% 30%) on the following bacterial strains: *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. *Staphylococcus aureus*, and determined the Minimal inhibitory concentration of citronella essential oil on the previous strains.

**Keywords :** *Cymbopogon citrus* ; Essential oil ; Citral ; Antibacterial activity ; *E. coli* ; *K. pneumoniae* ; *P. aeruginosa* ; *S. aureus*

## ملخص

هدفنا هو دراسة وتعزيز النبات *Cymbopogon citratus* ، بدءاً من أصله، والتوزيع الجغرافي لها، واستخدام هذا النبات، ولقد تعمقنا، في دراستنا أو السنة استخراج باستخدام التحليل المائي وتحليل الزيوت الأساسية من عشب الليمون باستخدام أساليب مختلفة من تحديد مجتمعة (الكروماتوغرافيا وقياس الطيف الشامل)، حيث وجدنا المكون الرئيسي هو سيترال وقمنا بمقارنة بين المركبات الكيميائية للزيوت الأساسية من *Cymbopogon citratus* من بلدين البرازيل وكوبا.

وأخيراً، درسنا النشاط المضاد للبكتيريا من زيت الليمون الأساسية حيث اختبرنا تركيزات مختلفة من الزيوت الأساسية *E. coli* ، *K.pneumoniae* ، *P.aeruginosa* ، *Staphylococcus.aureus* ، على (5% 10% 15% 20% 25% 30%) على وتحديد الحد الأدنى من تركيز المثبطة من الليمون الأساسية النفط على سلالات السابقة

الكلمات المفتاحية: حمضيات سيمبوجون؛ زيوت أساسية؛ سيترال؛ نشاط مضاد للجراثيم؛ بكتريا قولونية؛ ك.الرئوية.الزنجارية  
بكتريا المكورة العنقودية البرتقالية

## Liste de tableaux :

<b>Tableau 1</b> : Analyse qualitative du constituant phytochimique présent dans <i>C. citratus</i> extrait.....	<b>31</b>
<b>Tableau 2</b> :Analyse quantitative du constituant phytochimique présent dans <i>C. citratus</i> extrait.....	<b>32</b>
<b>Tableau 3</b> :Composition chimique (%) des huiles essentielles de feuilles fraîches de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf originaire du Brésil et de Cuba.....	<b>37</b>
<b>Tableau 4</b> : Activité antibactérienne de l'huile brute de citron contre diverses bactéries pathogènes sélectionnées.....	<b>38</b>
<b>Tableau 5</b> : MIC (Initial, final) et MBC des organismes de test contre l'huile de citronnelle.....	<b>39</b>



## Liste des figures :

<b>Figure 01 :</b> Aspects morphologique et botanique de <i>Cymbopogon citratus</i> (citronnelle)....	6
<b>Figure 02:</b> schéma des étapes de l'hydrodistillation.....	10
<b>Figure 03:</b> Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau..	11
<b>Figure 04 :</b> Schéma du système d'extraction CO2 des solides.....	12
<b>Figure 05 :</b> Schéma de clivenger.....	24
<b>Figure 06 :</b> Spectre RMN 1H du <i>Cymbopogon citratus</i> (extrait méthanolique).....	33
<b>Figure 07 :</b> ChromatogrammeGC-MS obtenu à partir de <i>Cymbopogon citratus</i> .....	34
<b>Figure 08 :</b> Illustration du schéma de fragmentation de la molécule de Citral présente dans le <i>Cymbopogon citratus</i> (extrait méthanolique).....	35
<b>Figure 09 :</b> Illustration du schéma de fragmentation de la molécule de Farnesol, Myrcène et Pinène présente dans <i>Cymbopogon citratus</i> .....	36

## Liste des abréviations

<b>HE</b>	Huile essentielle
<b>SM</b>	Spectrométrie de masse.
<b>CPG</b>	Chromatographie en phase gazeuse
<b>CMI</b>	Concentration minimal inhibitrice
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire.

## Tables des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre I : données bibliographique</b>	
1.1. Histoire et l'origine de la plante .....	5
1.2. La morphologie et la description de la plante.....	5
1.3. Systématique.....	6
1.4. Plantes voisines .....	7
1.5. L'usage de la plante.....	7
1.6. Composition chimique.....	8
1.7. Les activités biologiques de la plante.....	9
2. Les Huiles Essentielles .....	9
2.1.1. Définition .....	9
2.2. Les méthodes d'extraction.....	9
2.2.1. L'hydrodistillation.....	11
2.2.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau .....	11
2.2.3. L'expression au solvant volatil.....	11
2.2.4. Expression à froid.....	11
2.2.5. L'enfleurage.....	12
2.2.6. L'extraction au CO2 supercritique.....	12
2.3.1. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles .....	13
1. Chromatographie sur couche mince.....	13
2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) .....	14
3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM).....	14
4. La chromatographie liquide à haute performance.....	15
5. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	15
2.3.2. Composition chimique d'une huile essentielle.....	16
a) Les composés terpéniques.....	17
b) Les monoterpènes.....	17
c) Les sesquiterpènes.....	17
d) Les composés aromatiques dérivé du phenylpropane.....	17
e) Les composés d'origines diverses.....	18

2.3.3. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles.....	19
2.3.4. Les Voies d'interactions des huiles essentielles avec le corps.....	19
2.3.5. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles.....	19
2.3.6. L'huile essentielle de la citronnelle.....	19
2.3.7. Méthodologie des tests antibactériens.....	19
1) AntibioGramme en milieu solide .....	19
2) Ensemencement.....	19
3) Lecture.....	20
2.3.8. Méthode de diffusion de disques.....	20
<b>Chapitre II : Matériel et Méthode .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Matériel .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Méthodes .....</b>	<b>24</b>
Extraction de l'huile essentielle .....	26
Préparation d'extrait de plante .....	26
Détermination du profil Chromatographie .....	27
Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	27
Organismes de test .....	28
Propagation et conservation des organismes d'essais .....	28
Préparation des concentrations d'huiles Essentielle.....	28
3.3. Activités antimicrobiennes .....	28
3.3.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice .....	29
<b>Chapitre III : Résultat et Discussions .....</b>	<b>30</b>
4.1. Analys quantitative et qualitative .....	31
4.2. Analys RMN 1 H de <i>C.Citratu</i> s .....	33
4.3. Analys CG-MS de <i>C.Citratu</i> s .....	34
4.4. Comparaison des composé chimiques de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon citratu</i> s issue de BRAZIL et CUBA .....	36
4.5. Activités antimicrobiennes .....	38
<b>Conclusion .....</b>	<b>39</b>

## INTRODUCTION

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tel que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne et a toujours été faites de façon empirique (SVOBODA, 2000) De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. Leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnue et répertorié, et donc mises à profit, dans le cadre des médecines traditionnelles et également dans la médecine moderne (BOURGAUD et al., 2001 ; KAR, 2007). Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribues pour 90% du traitement médicales. Jusqu'en 2004, on a estimé que près de 75% de la population africaine ont toujours recours aux plantes pour se soigner. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce (KAR, 2007).

Nous citerons, entre autres, la citronnelle *Cymbopogon citratus* dont la fragrance reste, hélas, peu étudiée et exploitée.

Bien que les extraits du *Cymbopogon citratus* ou certains de ses constituants tels que le citral, le myrcène et le limonène soient toxiques à forte dose, aucun cas d'intoxication relatif à l'utilisation du *Cymbopogon citratus* n'a été décrit dans la littérature. (KOUAME et al., 2016)

De ce fait, l'objectif assigné à déterminer la composition chimique de l'essence de la plante. Ainsi que son pouvoir antimicrobien. communément appelé *Lémongrass*, et qui demeure très peu exploitée dans les domaines *nutraceutique* et agro- alimentaire malgré ses immenses potentialités thérapeutique et antiseptique (ONAWANMI et al., 1984 ; PARANAGAMA et al., 2003 ; FANDOHAN et al., 2008 ; BLANCO et al., 2009 ; AKHILA, 2010 ; KOUAME et al., 2016 ; LAWAL et al., 2017).

## **CHAPITRE 1 : Données bibliographiques**

### **1.1.Histoire et l'origine de la plante :**

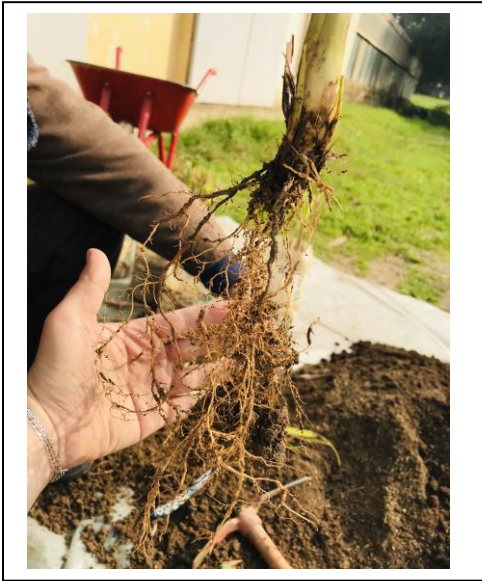
Le nom botanique de la citronnelle, *Cymbopogon* est dérivé des mots grecs kymbe : « nacelle » et *pogon* : « barbe »; il se réfère à ses épis en forme de nacelle porteurs de nombreuses fleurs qui font songer à une barbe.

Originnaire d'Inde, du Sri Lanka et de tout l'espace sud-asiatique, la citronnelle a une longue tradition et est utilisée depuis des siècles, et ce pas seulement dans la cuisine ou la médecine. Le genre *Cymbopogon* comprend une cinquantaine d'espèces originaire d'Asie mais dont certaines sont depuis très longtemps introduites et naturalisées dans tout le monde (**TEUSCHER et al., 2005**). La citronnelle verveine des Indes, nommée les ou par anglophones « Lemongrass », est une graminée très commune en Asie du Sud-est, d'où elle est originaire. C'est à partir de 1820 que la distillation de l'HE d'espèces du *Cymbopogon* a débuté à des fins commerciales sur le marché mondial. On cultive cette plante pour son huile qui sert de parfum d'assaisonnement et de remède(**ISERINetal.,2001**).

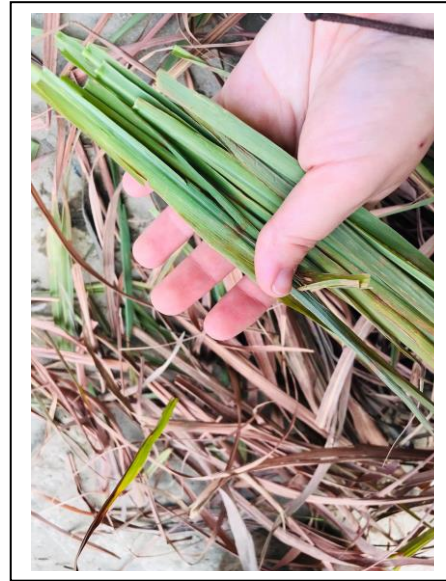
Cette espèce est très répandue sous les tropiques et plus particulièrement au Sud de l'Asie (Inde, Vietnam, Sri Lanka, Java) et aussi en Australie, au Brésil, en Afrique de l'Ouest, aux États-Unis (Floride, Californie), en Amérique Centrale et en Amérique du Sud (**TEUSCHER et al., 2005**)

### **1.2. La morphologie et la description de la plante :**

La citronnelle est une plante herbacée vivace, formée de tiges serrées pouvant atteindre 1,5m de haut, lisses et glabres. Elles forment des touffes composées de feuilles linéaires, terminées en pointe, de 90 cm de long sur 3 à 5 cm de large ; ces feuilles sont raides, coupantes, lisses sur leurs deux faces et de couleur vert clair grisâtre; elles ont une nervure centrale saillante et plus claire, fortement parfumées, effilées et réunies en gaine sur une certaine portion de leurs longueur, un pétiole engainant et présentent une ligule parcheminée d'à peine 1 mm de long. Elle ne fleurit qu'exceptionnellement pour donner naissance à une inflorescence terminale, d'une trentaine de cm de long, formée d'épis disposés en panicules lâches, de 6 mm de long, la plante se termine dans la partie souterraine par une base renflée comme un oignon mais qui ne correspond pas à un bulbe ou rhizome. (**TEUSCHER et al., 2005, KOUAME et al., 2016**).



**c) La partie racinaire de la plante  
(Originale, 2020)**



**d) Les feuilles de la plante  
(Originale, 2020)**

**Figure 01 :** Aspects morphologique et botanique de *Cymbopogon citratus*(citronnelle).

### **1.3. Systématique : (KOUAME et al., 2016)**

La classification botanique de la plante est la suivante :

-Règne: *plantae*

-Division: *Magnoliophyta*

-Classe: *Liliopsida*

-Ordre: *Cyperales*

-Famille: *poaceae*

-Genre: *Cymbopogon*

-Espèce: *Cymbopogon citratus (DC.) Stapf*

Plusieurs noms sont attribués *Cymbopogon citratus* . Nous citerons : citronnelle, herbe citron, verveine des indes, jonc odorant, Lémongrass

#### 1.4. Plantes voisines :

Le genre *Cymbopogon* comprend une cinquantaine d'espèces originaires d'Asie, dont certaines sont depuis très longtemps introduites et naturalisées dans tout le monde intertropical du fait de leurs excellentes aptitudes aromatiques culinaires et médicinales. Les noms commerciaux de *C. citratus* sont citronnelle des Indes et verveine des Indes. Elle serait en effet d'origine indienne. La citronnelle dite de Ceylan, est la plus commercialisée dans le monde et est extraite de *C. nardus* (L.) Rendle. La citronnelle de Java correspond à l'espèce *C. winterianus*. Les appellations Lemongrass, Gingergrass et *Palmarosa* renvoient respectivement à *C. flexuosus*, *C. martinii* var. *sofia* et *C. martinii* var. *motia*. (AKHILA, 2010).

#### 1.5. L'usage de la plante :

Il est bien établi que la connaissance des usages des plantes médicinales et de leurs propriétés pharmacologiques est généralement acquise à la suite d'une longue expérience et transmise d'une génération à l'autre (KLOTOÉ et al., 2013). Dans la médecine traditionnelle, l'on utilise la citronnelle pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques (FRANCISCO et al., 2011).

Le décocté des feuilles ou l'huile essentielle est utilisé pour traiter les douleurs gastro-intestinales, la toux, l'herpès, la fièvre, les céphalées, les troubles cardiaques, la drépanocytose, les flatulences, les vomissements, la dyspepsie, l'ictère, l'insomnie, la morsure de serpent, la coqueluche, l'éléphantiasis et la dépression (LING et al., 2009). Utilisation par voie orale le décocté des feuilles séchées de cette plante, pour traiter l'hypertension artérielle (N'GUESSAN et al., 2009) Et comme eau de bain pour soulager les douleurs osseux, articulaires et diminuer ou arrêter les hémorragies du postpartum et la diarrhée (PANYAPHU et al., 2011), l'infusion ou la décoction de cette plante (4 onces de citronnelle ajoutée à un litre d'eau bouillante) est un excellent remède contre les stomatites de l'enfant. L'ajout de gingembre (*Zinziber officinale*), de sucre et de cannelle dans la solution est fébrifuge. La citronnelle mélangée au poivre noir est utile pour réguler les troubles menstruelles et la dysménorrhée (PANDA, 2004) Pour traiter la fièvre, les feuilles de citronnelle sont portées à ébullition avec les feuilles du bambou (*Bambusa vulgaris*) et de gingembre. Egalement, le thé des feuilles de la citronnelle avec les feuilles du *Tripogandra serrulata*, du *Persea americana* (avocatier) et du *Scoparia dulcis* est



consommé contre *l'ictère*. Par ailleurs, le décocté des feuilles de citronnelle avec celle du *Amonaglabra* et la tige du *Musaparadisiaca* (banane plantain) est utilisé comme *antiémétique* et *mucolytique* (LACHMAN-WHITE et al., 1992) Cette plante est aussi utilisée pour ses propriétés répulsives.

Le jus du broyat de la base charnue des feuilles de citronnelle est appliqué sur les parties du corps exposées aux piqûres de moustiques (BARRETT, 2009) La citronnelle possède un usage domestique, son huile est utilisée comme répulsif sous la forme d'aérosols, de désodorisants, de vernis pour le plancher et de détergent ménager. L'huile est prescrite en usage externe pour traiter l'eczéma, Les racines augmentent la diurèse et la transpiration, Une dose comprise entre 10 et 20 g de racines permet de traiter le *coryza* et la grippe. Son action carminative est obtenue avec trois à quatre gouttes d'HE diluées dans un verre d'eau. (LING et al., 2009)

Les tiges de la citronnelle sont utilisées comme parfum alimentaire. L'extrait des racines est utilisé en parfumerie et en cosmétologie dans l'élaboration de parfums, de champoings et de savons. Dans l'eau de bain, il procure une sensation de fraîcheur (HOFFMAN et al., 2002).

### 1.6. Composition chimique :

Le potentiel thérapeutique des herbes médicinales pourrait être associé à la présence de composés *phytochimiques* ou de métabolites secondaires. Ces composés sont répartis uniformément dans les plantes médicinales. Les composés importants tels que les *phytostérols, l'anthocyanine, acides aminés, acide organique, composés phénoliques, composants volatils, acides gras, fumesol, flavonoïdes, aldéhyde isovaléranique, laméthylhepténone, les esters valériques, le L-linanol, le furfurool, l'isopulégol, l'acide p-coumarique* ont été isolés et caractérisés à partir de la citronnelle ( OLADJI et al., 2019)

Les principaux constituants sont *le citral* dont la teneur varie entre 65 et 86%, renfermant dans les mêmes proportions du *néral* et du *géraniol*. Les autres composés majoritaires sont *le myrcène* (jusqu'à 20%), *le camphène* (10%) et *le géraniol* (2 à 10%). (SALLE, 1991; AKHILA, 2010 ; EKPENYONG et al., 2014).

## **1.7. Les activités biologiques de la plante :**

La citronnelle a de nombreux bienfaits pour la santé et ses propriétés curatives contiennent de nombreux composés, huiles, minéraux et vitamines qui sont connus pour avoir des propriétés anti-oxydantes et qui prévient certaines maladies. Le composant chimique principal de la citronnelle est le citral qui a des fortes propriétés antimicrobiennes et antifongiques (EKPENYONG et al.,2014).

Ces propriétés pharmacologiques justifient son utilisation traditionnelle en *infectiologie*, dans les troubles digestives, cardiovasculaires, en *psychiatrie* et comme antalgique. Cependant, d'autres usages restent à être confirmés tels que dans la *drépanocytose*, les pathologies virales telles que *l'herpès* et la morsure de serpent. (KOUAME et al., 2016)

## **2. Les huiles essentielles**

### **2.1. Définition :**

les huiles essentielles (essences = huiles volatiles) sont des produits de compositions généralement assez complexe renfermant des principes volatils(BRUNETON,1999).obtenus à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques (GARNERO, 1996).

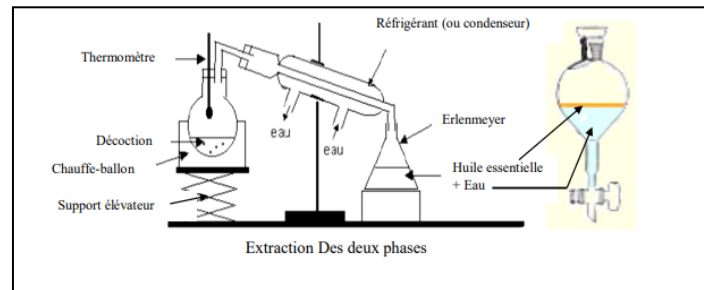
### **2.2. Les méthodes d'extraction :**

#### **2.2.1. L'hydrodistillation :**

Cette méthode est réalisée en 2 étapes :

- La partie de la plante contenant la molécule à extraire est placée dans un ballon avec de l'eau et quelques morceaux de pierre ponce pour assurer le brassage de la solution. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense et tombe dans un erlen meyer (fiolle) où il est possible de distinguer 2 phases bien distinctes : l'huile essentielle et, dessous, l'eau aromatique (ou hydrolat) chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée.

- On récupère les 2 phases huile essentielle / eau aromatique, chargée d'espèces volatiles, dans une ampoule à décanter. Après avoir laissé reposer le contenu quelques secondes, il est possible d'éliminer totalement l'eau aromatique. Il ne reste alors plus que l'huile essentielle dans l'ampoule à décanter (**LUCCHESI, 2005 ; MORO BURONZO, 2008**).



**Figure 02:** schéma des étapes de l'hydrodistillation

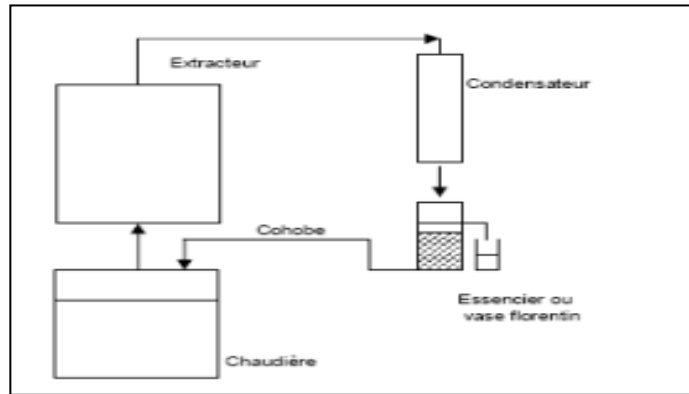
(**LAGUNEZ RIVERA, 2006**).

Maintenant, d'autres méthodes d'hydrodistillation sont inventées, on peut citer :

- Hydrodistillation sous pression : pour les essences difficilement distillables. Bien que le procédé sous pression conduise à une amélioration du rapport d'entraînement, donc, à des économies d'énergie, l'influence d'une température élevée (supérieure à 100°C) sur la qualité de l'huile essentielle donne lieu à certains artefacts.
- Le système de thermopompage : consiste à pomper la chaleur du condenseur et à l'utiliser pour la production de vapeur. Les économies d'énergie calorifique et d'eau de refroidissement se situeraient entre 60 et 90%.
- Turbo distillation : Pour activer la distillation à la pression atmosphérique, l'alambic est équipé d'une turbine qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part une agitation turbulente, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation (**CU et al., 1999**)
- L'hydrodistillation assistée par ultrasons : Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement « pré » ou « post » opératoire. En effet, les micros cavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, les rendements en huile essentielle sont augmentés et les cinétiques accélérées (**SKARIA et al., 2007**).

### 2.2.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic.



**Figure 03:** Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau (PEYRON et RICHARD, 1992)

Le matériel végétal dont on veut extraire une huile est placé sur des grilles puis dans des cuves appelées extracteurs. On les remplit de solvant et on effectue ainsi plusieurs lavages successifs. Le mélange est ensuite envoyé dans un décanteur où on le laisse reposer : cette phase de repos va permettre d'obtenir deux phases. Celle au fond contiendra l'eau contenue dans les plantes, l'eau étant plus lourde que le solvant celui-ci sera à la surface. Les huiles essentielles étant très solubles dans le solvant, elles se retrouvent dans la même phase. Il suffit donc d'éliminer l'eau. Ensuite on fait s'évaporer le solvant afin d'obtenir un composé pur (WERNER,2002).

En fonction de la technique et du solvant utilisé on obtient: des hydrolysats, alcoolats, teintures, résinoïdes, oléorésines et des concrètes.

### 2.2.4. Expression à froid :

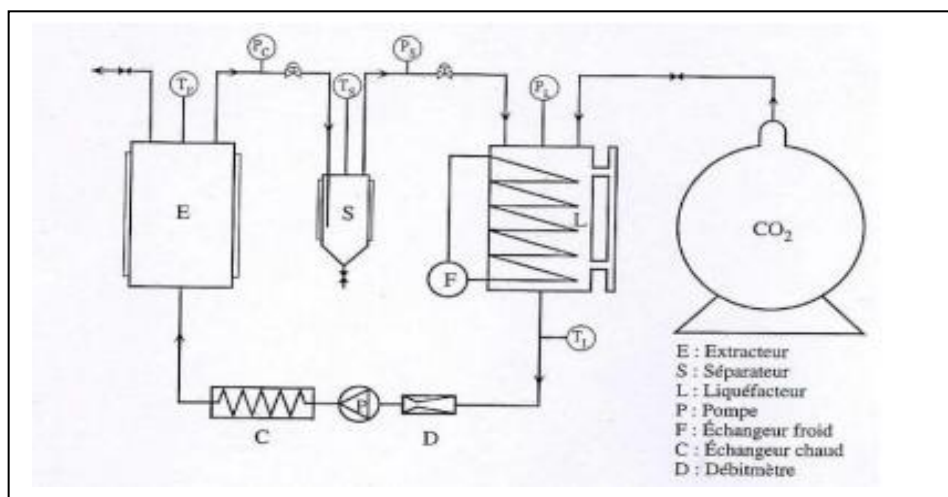
Ce mode d'obtention ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes (*Citrus spp.*) par des procédés mécaniques à température ambiante. Le procédé consiste à exercer sous un courant d'eau une action abrasive sur toute la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation (WILSON, 2002). La plupart des installations industrielles permettent en fait la récupération simultanée ou séquentielle des jus de fruits et de l'huile essentielle (AFSSAPS, 2008).

### 2.2.5. L'enfleurage :

Cette méthode se rapproche quelque peu de l'extraction par solvants volatils mais dans ce cas on utilise des graisses comme solvant, ces dernières ayant elles aussi une forte affinité avec les composés odorants, cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade (**LARDRY et HABERKORN, 2007**).

### 2.2.6. L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique :

Le terme supercritique signifie que le CO<sub>2</sub>, sous pression et à une température de 31°C, se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux. Lorsqu'il est dans cet état, il est capable de dissoudre les huiles essentielles. La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO<sub>2</sub> supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO<sub>2</sub> s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle qui est proche du naturel et sans trace de solvant. De plus le CO<sub>2</sub> est non toxique, incolore, inodore et ininflammable, ce qui permet des conditions de sécurité supérieures (**KEVILLE et GREEN, 1995 ; BAYSAL et STARMANS, 1999**).



**Figure 04** : Schéma du système d'extraction CO<sub>2</sub> des solides  
(**LAGUNEZ RIVERA ; 2006**).

### **2.3.1. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles :**

L'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituant présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter. En effet l'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile (**FRANCE-IDA, 1998**).

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase (**SCHWEDT, 1993**). Plusieurs méthodes existent :

#### **1. Chromatographie sur couche mince :**

La CCM est utilisée comme technique de routine, pour l'analyse rapide de fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. L'efficacité de la CCM comme technique de séparation est souvent mise à profit dans la phase ultime de purification, au moins sur de faibles quantités, lorsque les autres techniques ont montré leurs limites (**PRADEAU et DAUPHIN, 2007**). La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption: la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (**CAUDE et JARDY, 1996**).

Après la migration, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode. La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale  $R_f$  caractéristique de chaque composé. (**BRUNETON, 1999**) précise que la technique du CCM, bien que beaucoup moins performante que la chromatographie en phase gazeuse, peut être utilisée en routine pour le contrôle de qualité des huiles essentielles.

## **2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :**

Elle s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur. C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine...), on parle de chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption (AUDIGIE*et al.*,1995).

La CPG permet une évaluation quantitative et qualitative de la composition chimique des huiles essentielles. Elle présente de nombreux avantages : facilité de mise en œuvre, temps d'analyse assez court et fiabilité des résultats (BRUNETON, 1999).

## **3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM) :**

Si la chromatographie permet à elle seule de séparer correctement les différents constituants d'un mélange, il est néanmoins délicat de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine, car les paramètres déduits de la rétention sélective des solutés au travers de la colonne sont souvent lourds à manier et, dans la plupart des cas, peu reliés aux édifices moléculaires organiques. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM (DE MAAK et SABLIER, 1994).

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables (DESJOBERT *et al.*, 1997; BRUNETON , 1999).

#### **4. La chromatographie liquide à haute performance :**

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine. Les particules solides ont un diamètre pouvant atteindre jusqu'à 5  $\mu\text{m}$ . Le garnissage est tassé dans une colonne fermée. La phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques microlitres) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (AUDIGIE *et al.*, 1995;BENCHEIKH, 2005).

Cette technique est peu intéressante pour les fractions volatiles, toutefois elle est efficace pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements, on peut la coupler également à un analyseur de masse(BRUNETON, 1999).

#### **5. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN :**

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution. L'originalité de la *RMN* par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres. La stratégie présentée pour la détermination de structure par *RMN* est très efficace pour les molécules de dimension moyenne. Les méthodes de base de la *RMN* monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent suffisantes pour atteindre l'objectif fixé (PLATZER, 2002).

##### **2.3.2. Composition chimique d'une huile essentielle :**

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir (BACIS, 1999). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques



dérivés du phenylpropane, beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils **(BRUNETON ,1999)**

**a) Les composés terpéniques :**

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) **(LAMARTI et al. (1994)**. Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique. Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments: *cytoplasmes*, *mitochondries* et *plastés*) sont hydrosolubles ou membranaires. Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones **(LAMARTI et al., 1994)**.

Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono –et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles **(BRUNETON ,1999)** et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives **(PIBIRI, 2006)**. Il convient de souligner que la synthèse des terpènes n'est pas propre aux végétaux. Le *squalène*, ainsi que son nom l'indique est un terpène abondant chez les requins. Des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent également chez les spongiaires et les *cœlentérés* **(GUIGNARD, 2000)** .

Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés *oxygénés* dérivés de ces hydrocarbures. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures prédominent (l'essence de *Térébenthine*) dans d'autres, la majeure partie de l'essence est constituée de composés *oxygénés*. Il est à noter que l'odeur et le goût des huiles essentielles sont donnés par ces composés oxygénés. Parmi ces composés *oxygénés*, on note d'alcools (*géraniol*, *linalol*), d'esters (*acétate de linalyle*), d'aldéhydes (*menthone*, *camphre*, *thuyone*), les cétones, les éthers, les phénols et les peroxydes **(PARIS et HURABIELLE, 1981; SVOBODA et HAMPSON, 1999)**.

#### **b) Les monoterpènes :**

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> (**RAHAL, 2004**). Ces composés peuvent être: monoterpènes acycliques (*myrcène, ocimènes*), monoterpènes monocycliques (*α- et γ-terpinène, p-cymène*) et aux monoterpènes bicycliques (*pinènes, Δ<sup>3</sup>-carène, camphène, sabinène*). la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions: alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes, phénols (**BRUNETON, 1999**).

#### **c) Les sesquiterpènes :**

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est C<sub>15</sub>H<sub>24</sub> soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes (**BELAICHE, 1979**). Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé l'élucidation de leurs structures (**RAHAL, 2004**). Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (*farnésol*), monocycliques (*humulène, α-zingibèrene*) ou polycycliques (*matricine, artéannuine, β,artémisinine*). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (*farnésol, carotol, β-santalol, patchoulol*), cétones (*nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione, β-vétivone*), aldéhydes (*sinensals*), esters (*acétate de cédryle*) (**BRUNETON, 1999 ; LAOUER, 2004**).

#### **d) Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane :**

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogénèse est totalement différente. (**PARIS et HURABIELLE, 1981**).

Ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, . On peut également selon le même auteur, rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'anthranilate de méthyle. Les lactones dérivée des cinnamiques (par exemple les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaibles par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles (**BRUNETON, 1999**) .

#### **e) Les composés d'origines diverses :**

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras, de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Enfin, il n'est pas rare

de trouver dans les concrètes des produits de masses moléculaires plus importantes non entraînaibles à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants : homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc...(BRUNETON ,1999) .

### **2.3.3. Facteurs influençant la qualité des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par des facteurs intrinsèques et des facteurs extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée (BESOMBES, 2008)

Les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (APROTOSOAIIE et al., 2010).

### **2.3.4. Les Voies d'interactions des huiles essentielles avec le corps :**

Les huiles essentielles peuvent réagir avec le corps via trois voies, quand vous ouvrez un flacon d'huile essentielle la première sens affecté c'est l'odorat ce qui excite l'appareil olfactif qui est directement lié au cerveau, donne à ces composés volatiles leur effet de soulager le corps. Quand vous inhalez les huiles essentielles, ils entrent aussi à travers la voie respiratoire, dans les poumons quelques molécules peuvent réagir avec l'oxygène et ainsi pouvant gagner la circulation sanguine puis les cellules. La troisième voie où les huiles essentielles peuvent être absorbé c'est la peau, les minuscules molécules pénètrent via les pores des glandes sébacées, passent ainsi dans le fluide intercellulaire puis la circulation sanguine (en ce cas, elles sont appliquées sur une base d'huile végétale comme la noisette, amande, etc., à cause de leur effet irritant). A travers ces capacités de pénétration, les huiles essentielles peuvent aider le corps à améliorer ses moyens de défense contre les agents stressants. L'administration orale ou rectale, doit être suivie par un phytothérapeute ou un *aromathérapeute*, à cause de la complexité constitutive et la puissance de ces formes volatiles d'une plante (WILSON, 2002 ; WORWOOD, 1995 ; SNYDER et LINDQUIST, 2010 ; SCIMECA, 2006).

### **2.3.5. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums ; Elles ont des propriétés antiseptiques pour les poumons et les reins ou comme bain de bouche, dépuratives, cicatrisantes, analgésiques et *anti-inflammatoire*, des activités antimicrobiennes, *antifongiques*, *antiparasitaires* ; et aussi des propriétés antioxydants .L'effet *irritant/anesthésiant* des huiles essentielles est utilisé pour soigner les douleurs *rhumatismales*; Action stimulant sur *l'utérus* ,effet abortif en cas *d'intoxication* ; Action sur le système nerveux central, en exerçant des effets sédatif ou narcotique, relaxant et déstressant ; Effet *anticancer*, en stimulant l'apoptose des cellules *tumorales*(CAPASSO et al., 2003; DANIEL , 2006; WORWOOD , 1995; HÜSNÜ CAN BASER et BUCHBAUER , 2010). Plusieurs études ont montrés que l'utilisation d'huile essentielle peut diminuer les troubles menstruels, *le stress post-partum* ainsi que *les troubles ménopausiques*(LARDRY, 2007).

### **2.3.6. L'huile essentielle de la citronnelle :**

La citronnelle, encore appelée citronnelle d'Inde ou de Madagascar ou de Java, est une plante herbacée tropicale de la famille des *Poaceae*, cultivée pour ses tiges et feuilles aux qualités aromatiques (goût de citron). Son HE est obtenu par distillation des feuilles hachées que l'on récolte plusieurs fois par an. Ses parties utilisées sont généralement les feuilles. L'HE de citronnelle est obtenu par distillation à la vapeur d'eau à partir des feuilles et tiges fraîches ou sèches. La matière fraîche de citronnelle contient de 0.26 à 0.52% d'HE et parfois 0.7% et la matière sèche en contient 0.4% (BARDEAU, 2009 ; LAWAL et al., 2017).

### **2.3.7. Méthodologie des tests antibactériens :**

#### **1) Antibiogramme en milieu solide :**

L'étude de la sensibilité des bactéries a été réalisée par la méthode de disque ou antibiogramme standard. Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papiers buvard imprégnés des antibiotiques à tester sont déposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture pure.(DAOUDA et al 2015)

#### **2) Ensemencement :**

Dans les boîtes de Pétri, deux à quatre millilitres de chaque suspension bactérienne préalablement préparée sont distribués distinctement sur des boîtes gélosées de Mueller-

Hinton puis homogénéisés dans tous les sens de sorte à couvrir toute la surface de la boîte gélosée.

La suspension bactérienne est laissée au contact de la gélose pendant 1 mn puis l'excès de suspension est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile surmontée de poire. Les boîtes de gélose ainsi ensemencées sont laissées pendant 15 mn à la température du laboratoire. **(DAOUDA et. al 2015)**

### **3) Lecture :**

La mesure des diamètres d'inhibition et la détermination des phénotypes des souches étudiées ont été réalisées avec le logiciel ADAGIO.

Il existe deux méthodes pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles

- La méthode de diffusion de disque
- La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les CMI

**(DAOUDA et. al 2015).**

### **2.3.8. Méthode de diffusion de disques :**

Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs.. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Chaque antibiotique ou substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine une zone d'inhibition en fonction de la concentration de l'antibiotique ou de la substance. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance.

On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique. Plus il est petit plus la bactérie est résistante **(DAOUDA et. al 2015).**

Pour la réalisation technique du travail, deux millilitres d'inoculum sont déposés sur chaque boîte gélosée. Après une imprégnation de 5 minutes, l'excédent d'inoculum a été éliminé par aspiration. A la surface de chaque boîte, quatre disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre (*bio Mérieux*) ont été déposés. Au cours de l'opération, deux essais ont été réalisés : 20  $\mu\text{L}$  d'huile essentielle supplémentée de 10% de DMSO. Deux témoins ont été réalisés : un témoin négatif avec 20  $\mu\text{L}$  d'eau distillée stérile en présence de 10% de DMSO et un disque de gentamicine (15 $\mu\text{g}$ ) comme témoin positif. Les boîtes sont laissées 1 heure à température ambiante puis retournées et incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures. Après incubation, le diamètre d'inhibition a été mesuré en millimètres disque inclus. (DAOUDA *et al.*, 2015)

## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

### **II.1. Matériel**

#### **1) Verrerie :**

- Eprouvettes.
- Verres de montre.
- Clevenger.
- Ballon mono col .
- Erlenmeyer.
- Fioles jaugés.
- Béchers.
- Burettes.
- Réfrigérant à boule.
- Pipettes pasteur.
- Tubes à essai .

#### **2) Appareillage :**

- Chauffe ballon.
- Balance analytique.
- pelle.
- brouette.

#### **3) Matériel végétal**

Le matériel végétal, utilisé pour l'extraction des huiles essentielles, est constitué de parties aériennes de *Cymbopogon citratus* qui a été acheté dans la région de BATNA en mars 2020.

Une culture de citronnelle a été faite à fin d'obtenir plus de rendement en huile essentielles( et les plantes rapporter était détériorer)

pour la réalisation de la culture :

-10kg de terreaux.

-10 kg de terre.

- 7 plantes de citronnelle.

- 24 pots.

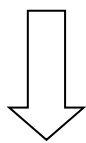
-Toute les feuilles on était coupées et les racines ( boutures)séparées et réinstallé dans d'autres pots en attente de leurs proliférations.



**Originale 2020**



**Originale 2020**



**Originale 2020**



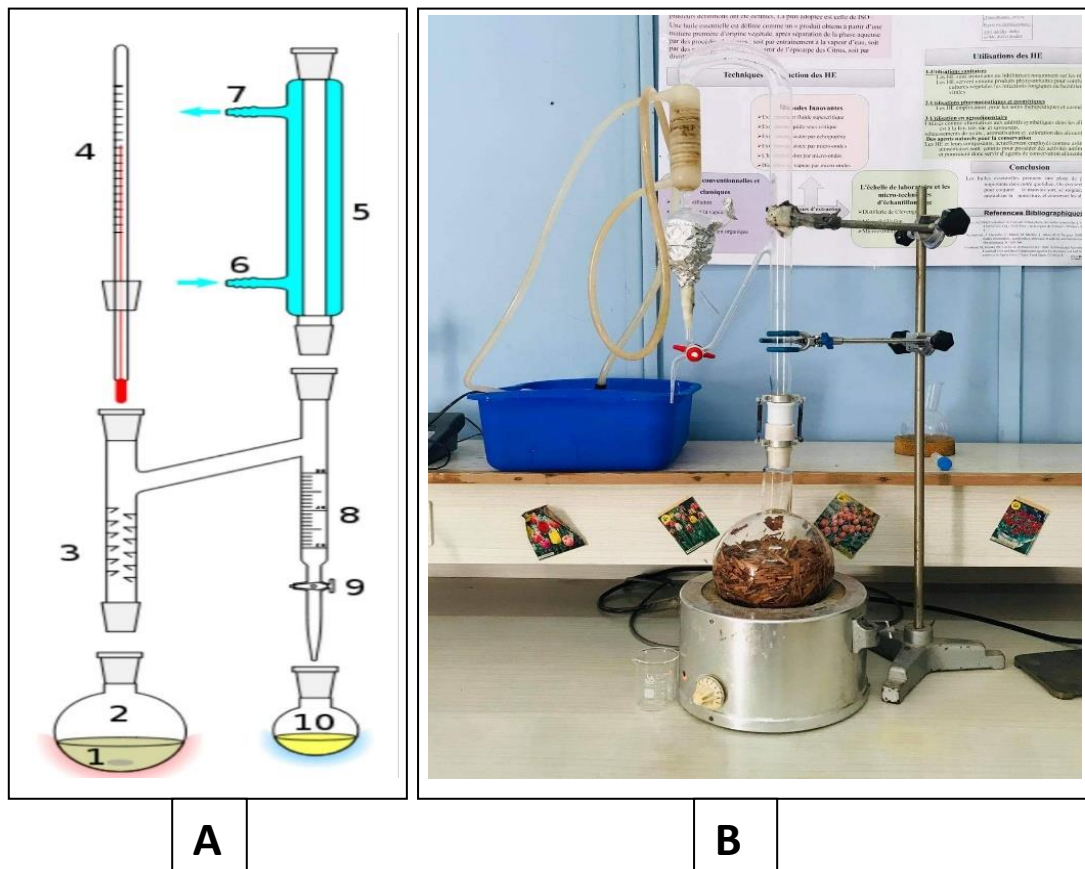
**Originale 2020**



### 3.2. Méthodes :

#### A. Extraction de l'huile essentielle :

A fin d'extraire l'huile essentielle de citronnelle (*Cymbopogon citratus*) la technique d'hydrodistillation a été faite ( la plus simple), grâce à l'appareil de clivenger qui consiste à l'ébullition de l'eau qui est mélangée avec les feuilles sèches de la citronnelle dans un ballon de laboratoire ,grâce à ce chauffe ballon la vapeur hétérogène ascendante provenant du ballon progresse dans la partie (3) puis se condense sur la phase froid du réfrigérant (5). Le condensât et récupérer dans la partie (8) ou l'huile essentielle se sépare de la phase aqueuses grâce à leurs différents densités. ( les mêmes étapes pour les feuilles fraîches).



**Figure 5 :** a) clivenger (original2020), b) clivenger schématisé ( Wikipedia deanstark)

Pour la réalisation de l'hydrodistillation les étapes suivantes :

- 1) Peser 51,7 grammes pour les feuilles sèches et 31.2 pour les feuilles fraîches de *Cymbopogon citratus* mélanger avec 500 ml d'eau contenue dans un ballon d'un litre de volume .



Feuilles sèches (Originale 2020)



Feuilles fraîches (Originale 2020)



(Originale 2020)

- 2) Placer le ballon dans le chauffe ballon
- 3) Allumez le chauffe ballon

## **B. Préparation d'extraits de plantes :**

Pour préparer l'extrait de plante, les feuilles et les fruits crus ont d'abord stérilisé en surface avec de l'eau distillée, puis avec de l'éthanol à 70 (Merck, Ltd) pour l'élimination des poussières et des particules indésirables. Les graines étaient obtenues à partir de fruits bruts en enlevant la pulpe et stérilisé avec de l'éthanol à 70 % (Merck, Ltd). Usine stérilisée les matériaux (feuilles et graines) ont été séchés au soleil puis réduits en poudre avec broyeur mécanique. Pour l'extraction, la méthode soxhl et était ont été choisis, si le méthanol (Fisher Scientific, Ltd) a servi de solvant. Pour chaque plante, des conditions différentes, telles que le rapport solvant (ml) : la matière végétale (g) et le temps ont été optimisés. Les échantillons extraits ont ensuite été concentrés à l'aide de Rota évaporateur (*RotavacHeidolph*). (**BASERA et. al., 2019**).

## **C. Détermination du profil chromatographique :**

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse (CPG), à régulation électronique de pression, de type Hewlett Packard (série HP 6890, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0.25 mm) avec une épaisseur de film de 0.25  $\mu\text{m}$ , d'un détecteur FID réglé à 280 °C et un injecteur split-splitless réglé à 250 °C. Le mode d'injection est split. Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1.7 mL/min. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison d'une montée de 2 °C/min. L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP Chem Station », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. (**ADAMS, 2007**).

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs Indices de Kovats (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0.25 mm), l'épaisseur du film est de 0.25  $\mu\text{m}$ . La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison de 2 °C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1.2 mL/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/70).

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse (Wiley7, NIST 2002). L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (CG/SM) respectifs avec les spectres de la bibliothèque et de la bibliographie (ADAMS, 2007) et sur la base de calcul des Indices de Kovats (IK). L'indice de rétention ou l'IK d'un composé A est indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée. L'IK d'un composé A dépend de la phase stationnaire et de la température. Les IK sont calculés comme suit :

$$IK = 100n + \left[ \frac{TR_c - TR_n}{TR_{(n+1)} - TR_n} \right] \times 100$$

n : Nombre d'atomes de carbone de l'alcane élué avant le composé ;

TR c : Temps de rétention du composé ;

TR n : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le composé ;

TR (n+1) : Temps de rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone élué après le composé. (ADAMS, 2007)

#### D. Résonance magnétique nucléaire (RMN) :

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire a été effectuée pour obtenir les spectres RMN 1H de l'extrait de C. citratus, qui a été enregistrée à l'aide d'un spectrophotomètre RMN (BrukerAvance III) avec fréquence de 400 MHz à une température de 289K, les spectres obtenu de 12 ppm de largeur. Pour acquérir des spectres de haute qualité ; des échantillons ont été prélevés pour 64 balayages et des décalages chimiques ont été signalés dans certaines parties par million (ppm). (BASERA, 2019).

### **E. Organismes de test / Organismes bactériens :**

Les organismes utilisés dans cette étude étaient : *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. *Staphylococcus aureus* (NAIK et al., 2010).

### **F. Propagation et conservation des organismes d'essai :**

Les organismes testés ont été marqués sur la gélose nutritive et ont été incubés pendant la nuit à (37 ±1) C°. Les cultures ont été conservées dans des conditions de réfrigération et ils ont été sous-culture tous les quinze (15) jours (NAIK et al., 2010).

### **G. Préparation de concentrations d'huile de citronnelle :**

Les différentes concentrations (v/v) de l'huile de citronnelle sont de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % ont été préparés de manière aseptique dans des tween-80 stérile. (NAIK et al., 2010).

### **3.3. Activité antibactérienne :**

L'essai des cultures bactériennes pour l'inhibiteur effet de l'huile essentielle de citronnelle pour différents (5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % et 30 %) étaient en utilisant la méthode de diffusion par puits de gélose (SOUTHWELL et al., 1993).

Le milieu de gélose nutritive contenant 0,5 % de tween-80a été fondu et 20 ml de milieu ont été ajoutés aux des plaques de pétri stérilisées séparément sur un formulaire de plaque de niveau et a permis de se solidifier. 1 ml de suspension cellulaire active de s'est propagée à l'aide de tampons stérilisés sur la surface de l'agar est uniforme. Trois puits de 5 mm de diamètre chacun a été fabriqué dans des plaques d'agar de l'agar solidifié milieu à l'aide d'un coupe-gel creux en acier inoxydable stérilisé. La quantité mesurée de 25µL de chaque concentration était à l'aide d'une pipette stérilisée et déposée dans les puits aseptiquement. Dans la plaque de contrôle, seul du Tween-80 a été ajouté dans le puits. On a laissé le pétrole se désamorcer dans le puits pour une d'une heure et les plaques ont été incubées à (37±1) C° pendant 24-48 heures. La zone d'inhibition (mm) a été mesurée avec une échelle graduée après la période d'incubation. (NAIK et al., 2010).

### 3.3.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice :

(CMI) et la concentration bactéricide minimale (CFM) La détermination de la CMI de l'huile essentielle de citronnelle sur la souche bactérienne testée a été réalisée en utilisant une dilution de bouillon comme expliqué par Hammer et al. avec différentes des concentrations de pétrole (HAMMER ,1999) Les cultures des souches d'essai ont été préparés en inoculant la souche d'essai dans des tube à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif. Les tubes étaient incubé pendant la nuit à  $(37\pm 1)$  C°. La CMI a été définie comme la plus faible concentration du composé d'essai pour inhiber la croissance des microorganismes et le MBC a été défini comme étant la concentration la plus faible du composé d'essai pour tuer les microorganismes. Les tubes à essai contenant 10 ml de bouillon de soja *tryptique* stérilisé (TSB) avec 0,5% (v/v) de tween-80 ont été inoculées avec une concentration différente de citronnelle de 0,5 % à 0,015 % (v/v). TSB avec 0,5 % (v/v) le tween 80 sans huile a été utilisé comme contrôle de croissance positif. Une aliquote de suspension bactérienne (25  $\mu$ L) à chaque tube a été ajouté de manière uniforme. Les tubes ont été incubés à  $(37\pm 1)$  C° pendant 24 heures puis 48 heures. Les tubes ont été observés pour la turbidité après la période d'incubation. La concentration la plus faible à qu'aucune croissance visible ne se produit dans les deux tubes de culture était pris comme MIC. Ensuite, les tubes ne montrant aucune augmentation dans la la turbidité à chaque intervalle de temps 24-48 heures ont été striées sur des plaques de gélose nutritive pour contrôler la croissance bactérienne. Chaque essai a été répétée trois fois.(NAIK et al., 2010).

### Chapitre III : Résultat et discussions

Après l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation (qui a dure 2 heurs )on a obtenu : 0.7 ml de huile essentielle de *Cymbopogon citratus* ( Issue de feuilles sèches) et 0.3 ml de l'huile essentielle ( Issue de feuilles fraîches)



Originale 2020

-Trouver le quelle des type de feuilles a plus rendement en huile essentielles fraîches ou sèches :

52.7 g → 0.7 ml

31.2 g → x

$$X = 31.2 \times 0.7 \div 52.7 = 0.4 \text{ ml.}$$

0.4 > 0.3

Le rendement de l'huile essentielle de citronnelle issu de feuilles sèches > le rendement de l'huile essentielle de citronnelle issu de feuilles fraîches.

#### 4.1. Analyse qualitative et quantitative :

Les rapports précédents de MATOUSCHEK et STAHL (1991), CHISOWA et al.(1998), NEGRELLE et GOMES (2007), AFTAB et al. (2011), et LAWAL et al. (2017) sur *C. citratus* ont suggéré que les est responsable de la variation de la composition chimique des extrait de plante, mais présence de sucre, de stéroïdes, de phénols, de tanins, alcaloïde, flavanoïde et terpénoïde est bien connu. Les résultats de un dépistage phytochimique préliminaire a confirmé la présencedes classes chimiques similaires (**tableau 1**).

**TABLEAU 1.** Analyse qualitative du constituant phytochimique présent dans *C. citratus* extrait.

S.NO	TEST phytochimique	extrait Méthanolique de <i>C. citratus</i>
1	Hydrates de	+
2	carbone	-
3	Saponin	+
4	Steroid	+++
5	Phénols	+
6	Tannins	++
7	Flavanoid	+
8	Alcaloïde	+++
9	Terponoid	+
	Glycoside cardiaque	

"+++" Très présent ; "+" modérément présent ; et "-" absent. ( BASERA et. al., 2019).

L'existence de ces produits chimiques dans les plantes peuvent agir comme des composants bioactifs pour les plantes, qui sont responsable de l'activité antimicrobienne



(**SHAH et al., 2011**). Les composés Phénolique sont omniprésents dans la nature et ils exercent plusieurs les fonctions sur les plantes telles que la croissance, la reproduction des plantes, le développement et la résistance aux maladies. Ces composés étaient considérée comme la fraction bioactive vitale pour la plante et produite par la voie du shikimate(**LIN et al., 2016**). Plusieurs rapports ont été suggérant que le composé phénolique, y compris le terpénoïde et flavonoïdes sont des composants bioactifs antimicrobiens résident dans les plantes (**PARVEEN et al., 2010 ; BHAT et al., 2011 ; VOON et al., 2012 ; WU et al., 2013**). La constatation quantitative de la recherche sur la concentration de phénol a été estimée à soit  $1584,56 \pm 16,32$  mg/g (**tableau 2**). Selon **MIRGHANI(2012)**, une quantité élevée de phénol est signalée dans l'étude *C. citratus*. Données précédemment communiquées sur les composés phénoliques y compris les flavonoïdes le confirment, ces composés contiennent les groupes hydroxyles polaires qui sont responsables des antioxydants, Le chercheur a en outre estimé que l'impact inhibiteur du capteur de radicaux libres bioactif, les actions anti-bactériennes et anti-inflammatoires (**CHEEL et al., 2005; COMPEAN et YNALVEZ, 2014; PRATIWI et ELIN, 2016**). (terpénoïdes et phénols) est due à l'interaction et à la perturbation des enzymes et des protéines utiles pour le métabolisme microbien (**ASHRAF et al., 2016**).

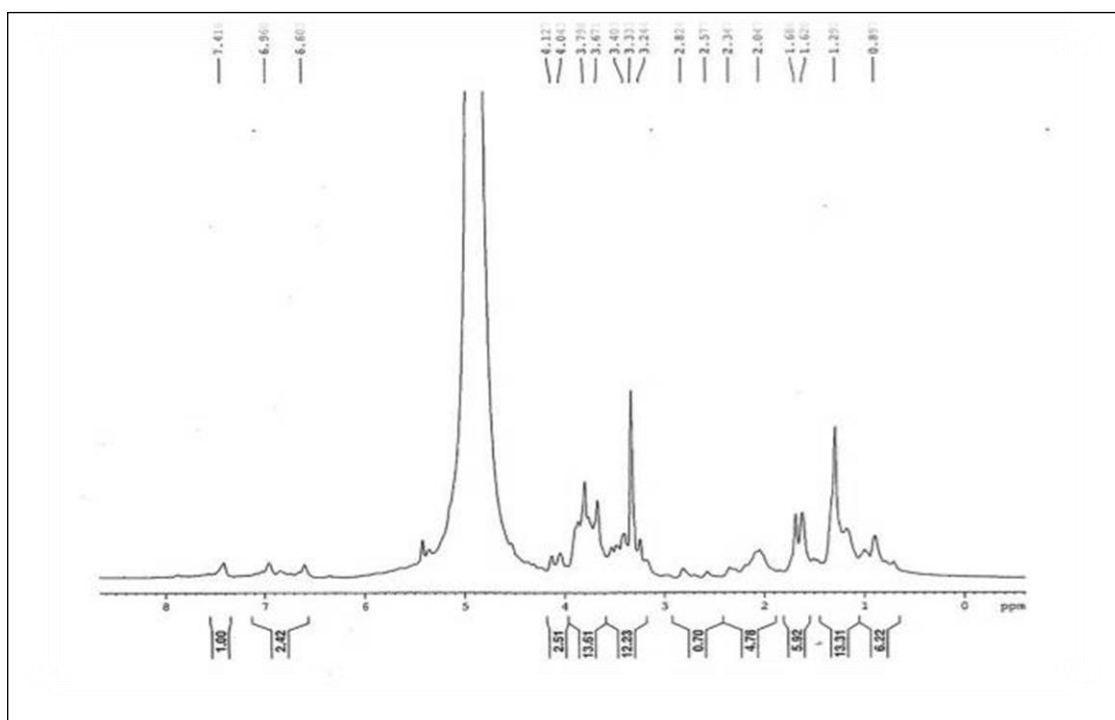
**TABLEAU 2** .Analyse quantitative du constituant phytochimique présent dans *C. citratus* extrait.

Test phytochimique	mg /acide gallique équivalent
Teneur totale en phénols (TPC)	<b>1584.56 ± 16.32</b>

±signifiez la valeur de l'écart type (SD). (**BASERA et. al., 2019**).

#### 4.2. Analyse RMN 1H de *C. citratus* :

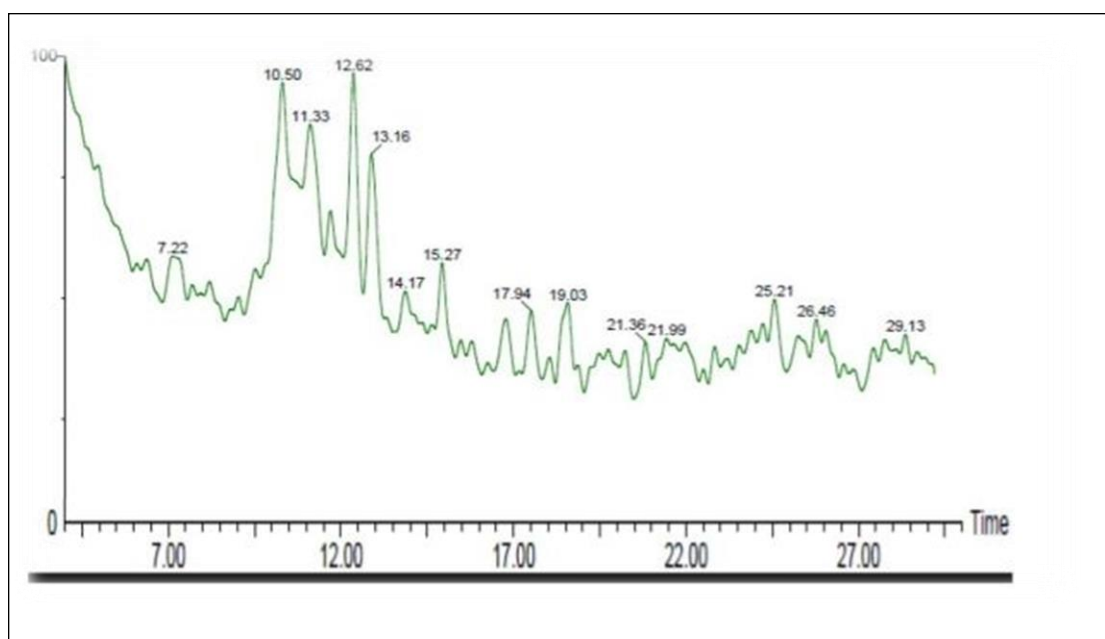
La RMN de 1H est une technique efficace pour l'étude des métabolites dans les plantes car il analyse tous les métabolites présents dans l'extrait (KIM *et al.*, 2010 ; HEYMAN et MEYER, 2012). La **figure 6** illustre le spectre RMN 1H de l'extrait de *C. citratus*. Déplacement chimique obtenus à partir de spectres RMN 1H peuvent être dus au proton sur le carbone ou le proton sur l'oxygène/l'azote. Le changement chimique obtenu du proton sur le carbone est indiqué par un signal à  $\delta$  0.897, 1.292 et 7,416 ppm qui correspondent au méthyle, au méthylène et à l'aromatique respectivement. La fourchette de valeurs entre  $\delta$  2-2.3 montre la présence de groupe carbonyle. Plage unique entre  $\delta$  4.043-7.416 et  $\delta$  0.5-5 en raison du passage au proton sur l'oxygène/azote qui expliquent la présence d'alcool dans l'extrait. Occurrence du groupe allylique dans l'extrait, est due au déplacement acquis entre  $\delta$  1.686–2.047. Les tissus de crête obtenus à partir du profil RMN illustre que l'extrait de *C. citratus* comprenant un mélange de terpénoïdes et flavanoïdes. (BASERA *et al.*, 2019).



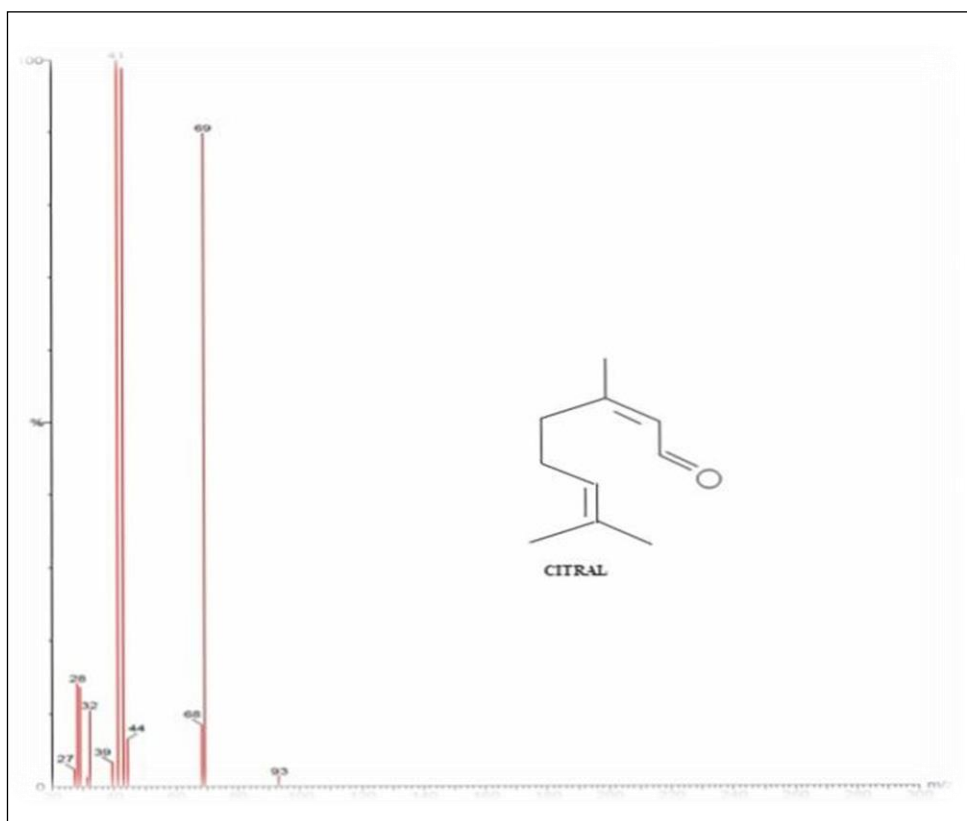
**FIGUR 6** . Spectre RMN 1H du *Cymbopogon citratus* (extrait méthanolique). (BASERA *et al* 2019).

### 4.3. Analyse GC-MS de *C. citratus* :

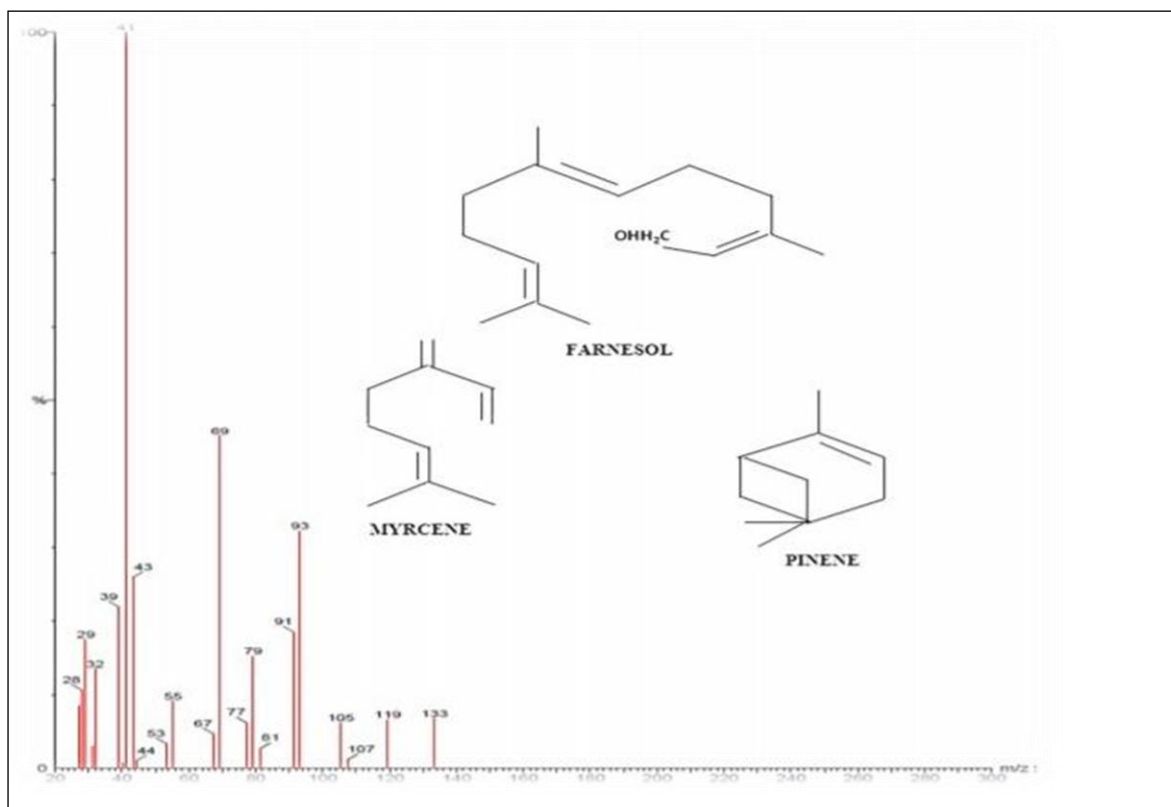
La GC-MS a été réalisée pour valider les données acquises NMR de *C. citratus*. La spectroscopie GC-MS a été largement utilisée comme une puissante caractérisation structurale technique. L'analyse de l'extrait de *C. citratus* a révélé la présence de  $\alpha$ -citral dans l'échantillon montré par le pic élué à 10,50 min (**FIGURE 7**).



**FIGURE 7.** Chromatogramme GC-MS obtenu à partir de *Cymbopogon citratus* (extrait méthanolique) ; représente le pic de la molécule éluée à un temps de rétention particulier. ( **BASERA et. al.,2019**).



**FIGURE 8** . Illustration du schéma de fragmentation de la molécule de Citral présente dans le *Cymbopogon citratus* (extrait méthanolique). ( **BASERA et. al., 2019**).



**FIGURE 9.** Illustration du schéma de fragmentation de la molécule de Farnesol, Myrcène et Pinène présente dans *Cymbopogon citratus* (extrait méthanolique). ( **BASERA et. al., 2019**).

En observant les pics de la bibliothèque du système élués avec temps de rétention de 12,62 et 13,16, correspond à myrcène et le farnesol. Les schémas de fragmentation des pics et des Les composés identifiés de la plante sont présentés dans **les figures 8 et 9** . En analysant le schéma de fragmentation de la GC-MS divulguée l'existence de Citral, Myrcene, Farnesol,  $\beta$ -myrcene et  $\beta$  - Pinène avec des pics à 29, 41, 69, 79, 93,105 et 119 m/z, respectivement. En raison du clivage hémolytique alpha et bêta, citral montre un pic à m/z 29, 69 ( **BASERA et. al., 2019**).

D'après ( **NANJUNDASWAMY et al. (2007)**, **KUMAR (2012)**, **2ADIVOLI et al. (2012)**, et **OLORUNNISOLA et al. (2014)** ) Le composant bioactif tel qu'expliqué ci-dessus est antibactérien effet. Les données RMN ont indiqué la présence de terpénoïde et des favanoïdes du composant bioactif, qui était comme le prouvent les données GC-MS.

#### **4.4. Comparaison du composé chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* issue de BRAZIL ET CUBA :**

Composés identifiés dans les huiles essentielles de *C. citratus* du Brésil et Cuba sont présentés dans le **tableau 3**. Analyse GC/MS autorisée l'identification de 13 et 12 composants chimiques principaux pour Les huiles brésilienne et cubaine, respectivement. Dans les deux cas, les principaux étaient les isomères géraniels avec 53,2 et 51,14% et néral avec 36,37 et 35,21% pour les échantillons brésiliens et cubains, respectivement. En outre, 8 autres composés apparaissent en commun. Le myrcènemonoterpène (6,52%), observé dans l'échantillon cubain, était le seul composé différenciateur qu'il est présent dans les l'abondance relative. (PINTO et. al.,2015).

**Tableau 3.** Composition chimique (%) des huiles essentielles de feuilles fraîches de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf originaire du Brésil et de Cuba. (PINTO et. al.,2015).

Constituants	Composition en % de BRAZIL	Composition en % de CUBA	Kovat's R.I.	ID
6-methylhept-5-en-2-one	0.19	0.23	936	MS, RI
Camphène	0.29	–	953	MS, RI
Myrcene	–	6.52	988	MS, RI
Limonene	0.99	–	1030	MS, RI
Linalool	0.42	0.69	1079	MS, RI
Citronellal	–	0.16	1132	MS, RI
n – décanal	0.19	–	1214	MS, RI
Z - citral (Neral)	36.37	35.21	1231	MS, RI
Geraniol	2.66	2.23	1247	MS, RI
E - citral (géraniol)	53.12	51.14	1258	MS, RI
2 – undécanone	0.22	0.35	1287	MS, RI
acétate de géranyle	1.5	0.20	1359	MS, RI
(E) - caryophyllène	1.03	–	1414	MS, RI
2- tridécanone -	–	0.10	1486	MS, RI
γ - cadinene	0.27	0.27	1513	MS,RI
oxyde de caryophyllène	0.59	0.59	1583	MS,RI
<b>Total identifié</b>	<b>97.92</b>	<b>97.62</b>		

**ID = méthodes d'identification ; MS = comparaison du spectre de masse avec celles des bibliothèques de masse informatiques, et Adams (2007) ; Kovat`s RI. = Kovat's Indice de rétention avec ceux rapportés dans la littérature.**

**Pour conclure :** Les Études chimiques de *C. citratus* dans différents habitats autour du monde a identifié le citral comme le principal constituant volatil (**SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2012**).

#### **4.5. Activité antibactérienne :**

L'huile de citronnelle a été jugée efficace contre tous les tests organismes, sauf *P. aeruginosa*. Organismes à Gram positif (*S. aureus*) qui a été trouvés plus sensible que les organismes gram négatifs (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*). L'activité antibactérienne s'est avéré augmenter progressivement avec l'augmentation des concentration de pétrole. L'effet maximal a été trouvé à 30 % de et un effet minimal a été observé à 5 % . concentration de pétrole (tableau 4). (**NAIK et al., 2010**).

**Tableau 4 :** Activité antibactérienne de l'huile brute de citronnelle contre diverses bactéries pathogènes sélectionnées.

Organismes	Zone d'inhibition (mm)* Huile de citronnelle					
	5%	10%	15%	20%	25%	30%
<i>Staphylococcus aureus</i>	14.33	19.33	22.33	24.66	27.33	29.66
<i>Escherichia coli</i>	8.33	11.33	14.00	16.33	19.33	22.33
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7.66	9.33	11.33	12.66	14.66	17.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

S.E. due au traitement = 0,72 C.D. due au traitement = 1,42 ; S.E. due aux organismes=0,72,C.D. dueaux organismes=1,42 ; \* Taille du puits 5 mm inclus.

Dans la méthode de dilution du bouillon, les organismes testés ont été trouvés être inhibée par l'huile de citronnelle à très faible concentration par rapport à la méthode de diffusion de l'agar. L'huile de citronnelle était s'est révélé efficace contre les grammes positifs par rapport à des bactéries gram négatives. *P. aeruginosa* a été trouvé être très résistant (même à l'état pur).

*S.aureus* s'est avéré plus sensible et a été inhibé à 0,03 %. (CMI initiale) et à une concentration de 0,06 %. (MIC final). On a constaté que *E. coli* est inhibé à une concentration de 0,06 % (CMI) avec une CME de 0,12 concentration. Par rapport à d'autres organismes d'essai, *K. pneumoniae* présentait une CMI (0,25 %) et une CBM (0,5 %) plus élevées que les autres organismes d'essai (**Tableau 5**).

**Tableau 5** : MIC (Initial, final) et MBC des organismes de test contre l'huile de citronnelle.

Organismes de test	CMI initial (%)	CMI final (%)	MBC (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.03	0.06	0.06
<i>Escherichia coli</i>	0.06	0.12	0.12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.25	0.50	0.50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND	ND	ND

Il ressort clairement de la présente étude que l'huile de citronnelle possèdent une activité antibactérienne prometteuse contre le test organismes. Les résultats obtenus par la diffusion de l'Agar et la méthode de dilution du bouillon soutiennent la indication que les organismes à Gram positif sont plus sensibles à l'huile que les bactéries gram négatives. Des observations similaires ont été réalisés par **ONAWUNMI et ONGULANA, (1986)** et **CIMANGA et al.,(2002)**. *P. aeruginosa* se sont révélés résistants à tous les concentration d'huile de citronnelle, y compris à l'état pur. Semblable aux résultats qui ont été rapportés **PEREIRA et al (2004)**, **MARTA WAR et al.,(2004)** et **ALAM et al.,(1994)**, et **ONAWUNMI et al.,(1984)**.

Les organismes testés ont été trouvés inhibés par la citronnelle huile à très faible concentration dans la méthode de dilution du bouillon comme par rapport à la méthode de diffusion sur gélose, cela est conforme avec les résultats de **TORTORANO et al.,(1998)**. Il s'agit de différences dans la croissance microbienne, l'exposition des micro-organismes à



l'huile, la solubilité de l'huile ou les composants de l'huile et l'utilisation et la qualité d'un émulsifiant, etc.

Ainsi, nous concluons qu'à l'ère actuelle de l'émergence de la multi drogue et la résistance des organismes à Gram positif et à Gram négatif ,L'huile de citronnelle sera utile pour traiter ces infections. **(NAIK et *al.*, 2010).**

## Conclusion

Les plantes médicinales ont considérablement et de façon inhabituelle amélioré notre santé. *Cymbopogon citratus* est l'une de ces plantes laquelle était utilisé pendant des centaines d'années comme une plante médicinale, La recherche scientifique sur cette plante nous a donné un aperçu de l'énorme potentiel biologique, et ces propriétés pharmacologiques justifient son utilisation traditionnelle en infectiologie, dans les troubles digestives, cardiovasculaires, en psychiatrie et comme antalgique.

Leurs utilisations ont été présentes aussi dans les aliments, les produits pharmaceutiques, les cosmétiques, les boissons, le savon et même dans les détergents. Afin de déterminer les activités pharmacologiques de la citronnelle, Les huiles et autres composés bioactifs ont été isolés, caractérisés et analysés. Pour l'amélioration de la composition physicochimique et activités biologiques de l'huile essentielle de cette plante, et surtout pour leur augmentation de sa valeur économique, il doit surveiller et traiter des facteurs importants tels que le mode de propagation, les procédures d'extraction, le temps de récolte. Les divers usages thérapeutiques et propriétés pharmacologiques des huiles essentielles de cette plante montrent qu'elle devrait susciter plus d'intérêt de la part de la communauté scientifique et de l'industrie pharmaceutique.

**« Suite au COVID-19 on a été contraint d'arrêter l'expérimentation. »**

## **Références Bibliographiques**

## Références bibliographiques :

(A) :

- **Afssaps,(2008)**. (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé), Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.
- **A.J. Ademuyiwa, S. Elliot, O.Y. Olamide, O.O. Johnson**, Nephroprotective effect of aqueous extract of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) in Wistar albino rats, *Int. J. Pharm. Biomed. Res.*(2015) 1–6.
- **Akhila, A. (2010)**. Essential oil-bearing grasses: the genus *Cymbopogon*. CRC Press, Taylor & Francis, New York, USA.
- **Ashraf, A., Sarfraz, R. A., Rashid, M. A., Mahmood, A., Shahid, M., and Noor, N. (2016)**. Chemical composition, antioxidant, antitumor, anticancer and cytotoxic effects of *Psidium guajava* leaf extracts. *Pharm. Biol.* 54, 1971–1981. doi: 10.3109/13880209.2015.1137604.
- **Aftab, K., Ali, M. D., Aijaz, P., Beena, N., Gulza, H. J., and Sheikh, K. (2011)**. Determination of different trace and essential element in lemon grass samples by X-ray fluorescence spectroscopy technique. *Int. Food Res. J.* 18,265–270.
- **Adams, RP., (2007)**. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation
- **Audigie C.L., Dupon G. et Zongain F. (1995)**. Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, p. 44.
- **Aprotosoie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F.,Dorneanu V.,Stanescu U.(2010)**. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 53-54.
- **Alam, K., Agua, T., Maven, H., Taie, R., Rao, KS., Burrows, I., et al., (1994)**. Preliminary screening of seaweeds, sea grass and lemongrass oil from Papua New Guinea for antimicrobial and antifungal activity. *Inter J Pharmacognosy*; 32 (4): 396-9.
- **Aprotosoie, A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F.,Dorneanu V.,Stanescu U.(2010)**. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 53-54
-

**(B) :**

- **Bardeau, F. (2009).** Les huiles essentielles: Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Fernand Lanore, Paris, France.
- **Basera P, Lavania M, Agnihotri A, and Lal B, (2019) .** Analytical Investigation of Cymbopogon citratus and Exploiting the Potential of Developed Silver Nanoparticle Against the Dominating Species of Pathogenic Bacteria.
- **Bacis. (1999).** Boelens Aroma Chemical information Service - ESO 2000, the complete Database of Essential Oils. Leffingwell and Associates publisher, Georgia, USA.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3ème Edition Lavoisier, Paris. 1120p.
- **Belaiche P. (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- **Bencheikh H. (2005).** Contribution à l'étude de la composition, de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de Thymus fontanesii et de Foeniculum vulgare. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- **Bhat, R., Ameran, S. B., Karim, A. A., and Liang, M. T. (2011).** Quality attributes of star fruit (Averrhoa carambola L.) juice treated with ultraviolet radiation. Food Chem. 127, 641–644. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.042.
- 
- **Barrett, J ., (2009).** What can I do with herbs? : How to grow, use & enjoy these versatile plants. 1re éd Everbest printing Co, China, p 85.
- **Baysal, T. et Starman, D.A.J.; (1999)** Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carvone and Linalene from Caraway Seeds; Journal of Supercritical Fluids 14; p: 225-234.
- **Bourgaud, F., Gravota, A., Milesi, S., et Gontier, E.,(2001)** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective; Plant Science 161, p: 839-851.

**(C) :**

- **Capassof, F. et al; (2003)**Phytotherapy: A Quick Reference to Herbal Medicine; Ed: SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG; p: 31- 40.
- **Chassaig, V.,(2006).** L'Aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval; Ed: VIOLAINE CHASSAING ; p: 4- 8.
- **Clarke, S.,(2008)** Essential oils; Ed 2: CHURCHILL LIVINGSTONE, ELSEVIER; p: 42- 77.
- **Compean, K. L., and Ynalvez, R. A. (2014).** Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: a review. J. Med. Plant Res. 8, 204–213. doi: 10.3923/rjmp.2014.204.213.
- **Carmo, E S., F. Pereira, N.M. Cavalcante, C.W. Gayoso, E. Lima,** Treatment of Pityriasisversicolor with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC)Stapf therapeutic pilot study, An. Bras. Dermatol. 88 (2013) 381–385.
- **Chisowa, E. H., Hall, D. R., and Farman, D. I. (1998).** Volatile constituents of the essential oil of *Cymbopogon citratus*stapf grown in Zambia. Flavour Frag. J.13, 29–30. doi: 10.1002/(SICI)1099-1026(199801/02)13:1<29::AID-FFJ682>3.0.CO;2-S.
- **Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriäquez, J., and Hirschmann, G. S. (2005).** Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus*)(DC.)(Stapf). J. Agric. Food Chem.53, 2511–2517. doi: 10.1021/jf0479766.
- **Caude M. et Jardy A. (1996).** Méthodes chromatographiques. Dossier P1445. Base documentaire : Techniques d'analyse. vol ; papier TA2.
- **CU, J.Q.,Ziouanih., Martel, J.P. et Perineau, F. (1999).** Production d'huile essentielle de Badiane de Chine par turbo-distillateur ; Parfums, Cosmétiques, Arômes 93 ; p: 67-74.

**(D) :**

- **Daniel, M.,(2006)** Medicinal Plants: chemistry and properties; Ed: SCIENCE PUBLISHERS; p: 59-77.
- **Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F. (1997).** Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. Analysis, 25 (6) : 13-16.

- **De Maack F. et Sablier M. (1994).** Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Dossier: P2614. vol papier n°: TA3. Bases documentaires, Techniques d'analyse.
- **Daouda Toure. (2015).** Terpenes, Antibacterial and Modulatory Antibiotic Activity of Essential Oils from *Croton hirtus* L' Hér. (Euphorbiaceae) from Ivory Coast. *Organic chemistry. University Felix Houphoet Boigny, Ivory Coast* , 45(2) : 150-153.
- 
- **De-Oliveira TL, Soares R De A, Piccoli RH (2013)** A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella enteritidis* in ground beef during refrigerated storage. *Meat Science* 93: 645–51

**(E) :**

- **Ekpenyong, C. E., Akpan, E. E., & Daniel, N. E. (2014).** Phytochemical Constituents, Therapeutic Applications and Toxicological Profile of *Cymbopogon citratus* (DC) Leaf Extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1).

**(F) :**

- **Fandohan, P., Gnonlonfin, B., Laleye, A., Gbenou, J. D., Darboux, R., & Moudachirou, M. (2008).** Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7), 2493-2497.
- **Fernie A.R., et al:** Natural genetic variation for improving crop quality. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**; 9: pp. 196-20
- **France-Ida J. (1998).** Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle? *Info – essences.* 7 : 1-2.

**(H) :**

- **Hammer KA, Carron CF, Relay TV., (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*; 86: 985-90.
- **Hoffmann FW, Manning M (2002)** Herbal medicine and botanical medical fads. 1ère éd, the Haworth Press Inc, New York p 149
- **Hopkins C.G.:** Improvement in the chemical composition of the corn kernel. *Illinois Agric. Exp. Stat. Bull.* **1899**; 55: pp. 205-240

- **HüsniCanBaşer, K. et Buchbauer G.,( 2010).** Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Application; Ed: CRC PRESS, TAYLOR & FRANCIS; p: 121-180, 235-580.

**(I) :**

- **Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Moulard, F., de La Roque, R., de La Roque, O., & Botrel, A.** Encyclopédie des Plantes Médicinales, 2ème édition, **2001.**

**(g) :**

- **Garnero J. (1996).** Huiles essentielles. Dossier : K345. Base documentaire: Constantes physico-chimiques. vol. papier n°: K2.
- **Guignard J.L. (2000).** Biochimie végétale. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177-185.

**(k) :**

- **Kar, A.,(2007).** Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie; Ed 2: NEW AGE INTERNATIONAL PUBLISHERS; p: 1-30.
- **Keville, K. et Green, M.,(1995).** Aromatherapy: A complete guide to healing art, Ed 1: THE CROSSING PRESS; p: 120-140.
- **Kim, H. K., Choi, Y. H., and Verpoorte, R. (2010).** NMR-based metabolomic analysis of plants. Nat. Protoc. 5, 536–549. doi: 10.1038/nprot.2009.237.
- **Kumar, A. K. (2012).** Brief review on cyclopropane analogs: synthesis and their pharmacological applications. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 5:472.
- **Koba K, Sanda K, Guyon C, et al. (2009)** In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L..essential oils from Togo. Bangladesh J Pharmacol 4: 29–34
- **Klotoé J.R., Dougnon T.V., Koutouvo K., Atègbo J.M., Loko F., Akoègninou A., Aklikokou K., Dramane K., Gbeassor M. (2013).**Ethnopharmacological survey on antihemorrhagic medicinal plants in south of Benin. European Journal of Medicinal plants, 3: 40-51.
- **Kouame, N. M., Kamagate, M., Koffi, C., Die-Kakou, H. M., Yao, N. A. R., & Kakou, A. (2016).** *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: ethnopharmacologie,



phytochimie, activités pharmacologiques et toxicologie. *Phytothérapie*, 14(6), 384-392.

(L) :

- **Lachman-White DA, Adams CD, Trotz UO (1992)** A guide to the medicinal plants of coastal Guyana. 2e éd Commonwealth Science council, Londre, p 92.
- **Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., et Carde J .P. (1994)**. Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133 :69-78.
- **Laouer H. (2004)**. Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Ammoidespusilla et de Magydarispastinacea. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- **Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., et al.,(2016)**. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules* 21:1374. doi: 10.3390/molecules21101374.
- **Lardry, J. M., (2007)**. Les Huiles Essentielles: Introduction à l'Aromathérapie ; *KinesitherapyReviews* 61 ; p: 35-42.
- **Lawal, O. A., Ogundajo, A. L., Avoseh, N. O., &Ogunwande, I. A. (2017)**. *Cymbopogon citratus*. Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases, Academic Press, 397-423.
- **Ling KH, Kian CT, Hoon TC (2009)** A guide to medicinal plant: an illustration, scientific and medicinal approach. World scientificpublishing Co Pte Ltd, Singapore, pp 57-8.
- **Lucchisi, M.E.,(2005)**. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-Ondes: Conception et Application à l'Extraction des Huiles Essentielles ; Thèse de Doctorat en Science ; Université de la REUNION ; p: 14-23.

**(M) :**

- **Madivoli, E. S., Gitu, L., and Gumba, E. (2012).** Isolation and identification of essential oils from *Cymbopogon citratus* (stapf) Dc Using GC-MS and FT-IR. Chem. Mater. Res. 2:22.
- **Matouschek, B. K., and Stahl, B. E. (1991).** Phyto chemical study of non-volatile substance from *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (Poaceae). Pharm. Acta Helv.66, 242–245.
- 
- **Moose S.P., et al.,(2004)** Maize selection passes the century mark: a unique resource for 21st century genomics. Trends Plant Sci.; 9: pp. 358-364
- **MoroBuronzo, A., (2008).** Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être; Ed : HACHETTE PRATIQUE; p: 14- 43.
- **Marta War, ON., MajraRajra Rodriguez, J., Gaston Garcia, S., Celia Lierene, R., (2004).** Antimicrobial activity of the essential oil and cream of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf. Rev cubana Plt Med; 2: 44-7.

**(N) :**

- **National Institute of Standards and Technology: (NIST) (2013)**  
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C481345>. Consulté le 13/05/13
- **Nanjundaswamy, N., Satish, S., Lokanatha, K. M., Shashikanth, S., and Raveesha, K. A. (2007).** Antibacterial activity of synthetic precursors of Podophyllotoxin. Int. J. Biomed. Sci. 3:472.
- **Negrelle, R. R. B., and Gomes, E. C. (2007).** *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf:chemical composition and biological activites. Rev. Bras. Plantas Med. 9, 80–92.
- **Naik, Mohd, Fomda, Bashir, Jeyakumar, Ebenezer, Bhat, Javid. (2010).** Antibacterial activity of lemongrass ( *Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 3. 535-538. 10.1016/S1995-7645(10)60129-0.
- **N’guessan K, Tiébré MS, Aké-Assi E, et al. (2009)** Ethnobotanical study of plants used to treat arterial hypertension, in traditional medicine, by abbey and krobou populations of agboville (Côte-d’Ivoire). Eur J SciRes 35: 85–98.

**(O) :**

- **Onawunmi, G. O. (1988).** In vitro studies on the antibacterial activity of phenoxyethanol in combination with lemon grass oil. *Die Pharmazie*, 43(1),
- **Onawunmi, GO., Ogunlana. (1986) .** EO. A study of the antibacterial activity of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citrates*). *Inter J Crud Drug Res*; 24 (2): 64-8.
- **Onawunmi, GO., Yesiak, WAB., Ongulana, EO., (1984)** Antibacterial constituent in the essential oil of *Cymbopogon citratus*. *J Ethanopharmacol*; 12 (3): 279-86.
- **Olorunnisola, S. K., Asiyambi, H. T., Hamed, A. M., and Simsek, S. (2014).** Biological properties of lemongrass: an overview *IFRJ* 21, 455–462.
- **Oladeji,O.S., Adelowo,F.E and D.T. Ayodele et al. (2019) /** *Scientific African* 6 e00137.

**(P) :**

- **Panda H (2004)** Handbook on medicinal herbs with used. Ire éd Asia Pacific Business, Pressinc, Delhi, p 437.
- **Parveen, M., Ghalib, R. M., Khanam, Z., Mehdi, S. H., and Ali, M.(2010).** A novel antimicrobial agent from the leaves of *Peltophorum vogelianum* (Benth). *Nat. Prod. Res.* 24, 1268–1273. doi: 10.1080/14786410903387688.
- **Pinto, Z., Sánchez, Félix , Santos, Arith, Amaral, Ana, Ferreira, José, Escalona, A., Julio, Queiroz, Margareth. (2015).** Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly- *Revista Brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology*: volume 24. 36-44, doi = { 10.1590/S1984-29612015006.
- **Pibiri M. C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, p.161.
- **Platzer N. (2002).** Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.

- **Pereira, RS., Sumita, TC., Furlan, MR., Jorge, AOC., Ueno, M., (2004).** Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infections. *Revista de Saude Publica*; 38(2): 326-8.
- **Paris M. et Hurabielle M. (1981).** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339.
- **Panyaphu K, On TV, Sirisa-Ard P, et al. (2011)** Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women. *J Ethnopharmacol* 135: 226–37
- **Paranagama, P. A., Abeysekera, K. H. T., Abeywickrama, K., &Nugaliyadde, L. (2003).** Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillusflavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in AppliedMicrobiology*, 37(1), 86-90.
- **Pénoël, D.,(1999).** Aromatherapy: for health professionals; Ed 2: CHURCHILL LIVINGSTONE, ELSEVIER; p: 8-33.

**(R) :**

- **Rahal S. (2004).** Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition. p.162.
- **Risch, SJ CH.T. HO, (1997) -** Flavour Chemistry and Antioxidant Properties, ACS smposium Series 660, American Chemical Society, Washington.

**(S) :**

- **Salle, JL., (1991).** Le totum en phytothérapie : Approche de phyto-biothérapie.Edition Frison-Roche,Paris,pp :12-35.
- **Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., and Mann, A. S.(2011).**Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 3–8. doi: 10.4103/2231-4040.79796.
- **Scimeca, D. ; (2006);** Les Plantes du Bonheur ; Ed: ALPEN ; p: 10-17.
- **Skaria, B.P. et al; (2007);** Aromatic Plants; Ed: NEW INDIA PUBLISHING AGENCY; p: 37-43.
- **Snyder, M. et Lindquist, R.,(2010);** Complementary and Alternative Therapies in Nursing; Ed 6: SPRINGER; p: 397-439.

- **Svopoda K. et Svopoda T.,(2000)** Secretory structures of aromatic and medicinal plants; Ed: MICROSCOPIX PUBLICATIONS; p: 7-12.
- **Solórzano, Santos, F., Miranda, Novales ,MG., (2012)**. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*; 23(2): 136-141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>. PMID:21903378
- **Southwell A., Hayes A., Markherm J, Leach D.,(1993)**. The search for optimally bioactive Australian eucalypt oil. *Acta Horti*; 334: 256-65.
- **Schwedt G. (1993)**. Méthodes d'analyse. Ed. Flammarion.
- **Svoboda K. P. and Hampson J. B. (1999)**. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars/>

**(T) :**

- **Tortorano, AM., Viviani, MA., Barchiesi, F., Scalise, G.,(1998)**. Comparison of three methods for testing Azole susceptibilities of *Candida albicans* strains isolated sequentially from oral cavities of AIDS patients. *J Clin Microbiol*; 36(6):1578-83.

**(V) :**

- **Voon, H. C., Bhat, R., and Rusul, G. (2012)**. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical application. *Compr. Rev. Food Sci. Food. Saf.* 11, 34–55. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00169.x.

**(W) :**

- **Werner, M., (2002)**. Les Huiles Essentielles: réveil du corps et de l'esprit ; Ed : VIGOT, Collection Santé Bien- Etre ; p: 60-95.
- **Wilson, R.,(2002)**. Aromatherapy: Essential oils for Vibrant Health and Beauty; Ed: PENGUIN PUTNAM; p: 1- 24.
- **Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S., et al. (2013)**. A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E.coli* by membrane interaction effect. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2751–2756. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.07.029.

- **Wordwood, S.E.,(1995).** Essential Aromatherapy: A pocket guide to essential oils and aromatherapy; Ed: NEW WORLD LIBRARY; p: 1-30.