

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

Faculté des Sciences

Département de chimie



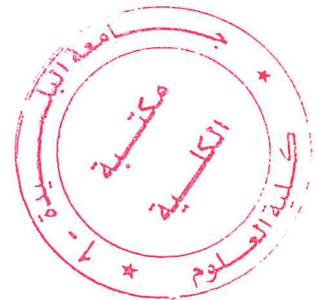
Mémoire Présenté par

ABZOUZI wissem

En vue de l'obtention

Du diplôme de Master en chimie

Option : Chimie des Produits Naturelles



Intitulé du mémoire

**Extraction, modification et application de
l'huile essentielle de la verveine odorante**

"Lippia citriodora"

Soutenu publiquement le 03 juillet 2017 devant le jury :

Y. Daghbouche	Pr	Présidente	Université de Blida 1
R. Zahi	MCA	Examinateur	Université de Blida 1
H. Boutoumi	Pr	Promoteur	Université de Blida 1

Promotion 2016-2017

Résumé

Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. Dans ce contexte, nous avons essayé de modifier l'huile essentielle de la verveine odorante par thionation dans le but d'augmenter leur hydrophobie et leur volatilité et d'évaluer l'activité antibactérienne et insecticide de cette huile essentielle avant et après modification chimique.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation de type clevenger. Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction est de 0,28 % de l'espèce *Lippia citriodora*.

L'étude des caractéristiques physicochimiques et l'analyse organoleptiques a révélé des résultats conformes aux normes internationaux (AFNOR).

La réaction de thionation a été réalisée sur la matrice de l'huile essentielle en utilisant le P_2S_5 avec le bicarbonate de sodium dans le CH_2Cl_2 .

Les analyses IRTF ont montré la disparition de la bande d'absorption de la fonction carbonyle situé à 1672 cm^{-1} pour les aldéhydes aliphatique dans l'huile essentielle de *Lippia citriodora* et l'apparition de nouveau pic situé à 989 cm^{-1} responsable de la vibration de la fonction thioaldéhyde aliphatique.

Les analyses GCMS montre l'apparition de nouvelles molécules thionée identifié par les spectres de masse.

L'huile essentielle thioné est donnée des activités microbiologique et insecticide plus importante que celle de l'huile essentielle native.

Mots clé : huile essentielle, verveine odorante, *Lippia citriodora*, thionation, activité antibactérienne, activité insecticide.

Abstract

Several research studies have focused on essential oils extracted from aromatic plants. The different results published indicate that they are endowed with several biological properties. In this context, we tried to change the essential oils of Lemon verbena by thionation in order to increase their hydrophobicity and their volatility and to evaluate the antibacterial and insecticidal activity of this essential oils before and after chemical modification.

The extraction of the essential oil has been carried out by hydrodistillation of type Clevenger. The results obtained show that the performance of extraction is 0.28% of the species *Lippia citriodora*.

The study of the physicochemical characteristics and the organoleptic analysis revealed the results conform to the international standards (AFNOR).

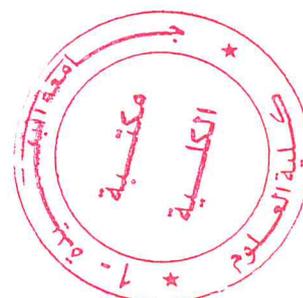
The thionation reaction was carried out on the essential oil matrix using P_2S_5 with sodium bicarbonate in CH_2Cl_2 .

IRTF analysis showed the disappearance of the absorption band of the carbonyl function located at 1672 cm^{-1} for the aliphatic aldehyde in the essential oil of *Lippia citriodora* and the appearance of a new peak at 989 cm^{-1} responsible of the vibration of the function aliphatic thioaldehyde.

The GCMS analysis shows the appearance of new thiomolecules identified by mass spectra.

The modified essential oil have given greater microbiological and insecticide activity than the native essential oil.

Key words: essential oil, Lemon verbena, *Lippia citriodora*, thionation, antibacterial activity, insecticidal activity



ملخص

ركزت العديد من الدراسات البحثية على الزيوت الأساسية المستخرجة من النباتات العطرية. وتشير نتائج مختلفة أنهم يمتلكون العديد من الخصائص البيولوجية.

في هذا السياق، و من أجل زيادة مفعول الزيت الأساسي للويضة حاولنا تعديل الزيت الأساسي بإجراء تفاعل thionation من أجل زيادة خصائصه الطيارة و تقييم النشاط المضاد للجراثيم و الحشرات لهذا الزيت الأساسي قبل و بعد التفاعل الكيميائي .

تم إستخلاص الزيت الأساسي بواسطة التقطير بخار الماء من نوع clevenger. بينت النتائج المحصل عليها أن نسبة المرود المستخلص قدرت ب 0,28% بالنسبة لنوع *Lippia citriodora* .

إن دراسة الخصائص الفيزيائية و الكيميائية و تحاليل مؤثرات الحواس أعطت نتائج تتوافق مع المعايير الدولية المقدمة من طرف AFNOR

تم إجراء تفاعل thionation على الزيت الأساسي بإستخدام المتفاعل P_2S_5 مع بيكربونات الصوديوم في $CH_2 Cl_2$. و أظهر تحليل IRTF إختفاء وظيفة الكربونيل للألدهيدات الأليفاتية و تقع في 1672 سم⁻¹ في الزيت الأساسي لـ *Lippia citriodora* و ظهور ذروة جديدة في الأهتزاز 989 سم⁻¹ الخاص بوظيفة الثيوكربونيل الأليفاتية، ويؤكد تحليل GCMS ظهور جزيئات ثيو ألدهيدية جديدة.

تم إجراء تقييم للنشاط ضد البكتيريا و الحشرات للزيت الأساسي والمعالج، و أظهرت النتائج أن الزيت المعالج أكثر فعالية من الزيت الأساسي.

الكلمات المفتاحية : الزيت الأساسي، اللويضة، *Lippia citriodora* ، thionation، النشاط المضاد للبيكتيريا، النشاط المضاد للحشرات.

Remerciment

En premier lieu, je remercie ALLAH le tout puissant pour m'avoir accordé le courage, la volonté, la force et la patience de bien mener ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

J'adresse ma profonde gratitude et mon plus vif remerciement à mon encadreur Dr. BOUTOUMI Hocine maître de conférences à l'université de BLIDA 1, pour avoir accepté de diriger ce travail et pour ses orientations dont on a bénéficié. Il nous a réservé des moments précieux de discussion et nous a facilité toutes les conditions pour mener à bien ce travail, malgré ses multiples obligations, qu'il soit assuré de toute notre gratitude.

Mes reconnaissances vont également en vers tous mes professeurs qui ont contribué à ma formation pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont prodigué au cours des années passées à l'université, pour leurs efforts, conseils, et leurs patience.

Je remercie vivement les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail. A mon Présidente de jury de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de cette mémoire.

Je remercie vivement les membres de laboratoire de Bactériologie d'hygiène de la wilaya de Blida, qui nous a accueillis afin de réaliser la partie de l'activité antibactérienne, et les responsables de laboratoire de chimie à l'université de BLIDA 1.

En fin, je remercie tout les étudiants de ma promotion "chimie des produits naturelles" 2016/2017.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un
Magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail.

Toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A tous ceux qui me sont chers :

Mes frères Aziz, Ahcene et Hocine

Ma sœur Choumaïssa

A ma grande mère et mes tantes

Mes oncles

A toute mes copines et toute ma famille

Ainsi que pour toutes mes amies de ma promotion de Master « chimie des produits
naturelles ».

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°1	Les microorganismes testés.....	21
Tableau N° 2	Condition opératoire du GC-MS de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	23
Tableau N° 3	Réactifs utilisée.....	23
Tableau N° 4	Solvants utilisée.....	24
Tableau N° 5	Propriétés organoleptique de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	34
Tableau N° 6	Caractéristiques physiques de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	34
Tableau N° 7	Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	36
Tableau N° 8	Composition chimique de l'HE modifiée de <i>Lippia citriodora</i>	40
Tableau N° 9	Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches en (mm) par la méthode de diffusion sur disque de l'HE native et modifiée à différentes concentrations.....	43
Tableau N° 10	Le taux de mortalité des insectes traité par l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée.....	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1	L'espèce <i>Lippia citriodora</i>	4
Figure 2	Structure générale des thioaldéhydes.....	12
Figure 3	Thionation avec le sulfure d'hydrogène.....	14
Figure 4	P ₄ S ₁₀	14
Figure 5	HMDO.....	15
Figure 6	Réactif zwitterionique du P ₄ S ₁₀ dans la pyridine.....	15
Figure 7	Réactif de Lawesson.....	16
Figure 8	Mécanisme de réaction avec LR.....	17
Figure 9	Réactif de Belleau.....	17
Figure 10	Structure chimique de réactif de Davy.....	18
Figure 11	Mécanisme de réaction avec le réactif de Davy.....	18
Figure 12	Organigramme de la méthodologie d'étude de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	20
Figure 13	Bactéries et levure vue sous microscope.....	21
Figure 14	Cycle de vie de la <i>Sitophilus oryzae</i>	22
Figure 15	Montage de l'hydrodistillation « Clevenger ».....	25
Figure 16	Principe de la méthode de diffusion par disque.....	30
Figure 17	Boîte pour l'application insecticide	32
Figure 18	L'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	34
Figure 19	Spectre IRTF de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	35
Figure 20	La chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	36
Figure 21	Spectr IRTF de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> modifiée.....	37
Figure 22	Spectre UV-visible de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée.....	38
Figure 23	Chromatogramme de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> modifiée.....	39
Figure 24	Spectre de masse de (1E,3Z,5E)-3,7-d'méthyl octa-1,3,5,7-tetra ène-1-thiol.....	39
Figure 25	Structure de (1E,3Z,5E)-3,7-d'méthyl octa-1,3,5,7-tetra éne-1- thiol.....	39

Figure 26	Spectre de masse (1Z,3Z,5E)-3,7-d'méthyl octa-1,3,5,7-tetra éne 1-thiol.....	39
Figure 27	Structure de (1Z,3Z,5E)-3,7-d'méthyl octa-1,3,5,7-tetra éne-1- thiol.....	40

LISET DES GRAPHIQUES

Graphique N° 1	Représentation des différents rendements en huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	33
Graphique N° 2	Activité antibactérienne de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée sur la souche bactérienne <i>Escherichia col</i>	43
Graphique N° 3	Activité antibactérienne de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée sur la souche bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Graphique N° 4	Activité antibactérienne de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée sur la souche fongique <i>candida albicans</i>	44
Graphique N° 5	Activité antibactérienne de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée.....	45
Graphique N° 6	Variation du taux de mortalité des insectes traité par l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native en fonction du temps.....	47
Graphique N° 7	Variation du taux de mortalité des insectes traité par l'HE de <i>Lippia citriodora</i> modifiée en fonction du temps.....	47
Graphique N° 8	Variation du taux de mortalité des insectes traité par l'HE de <i>Lippia citriodora</i> native et modifiée en fonction du temps....	48

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association française de normalisation

CH₂Cl₂ : dichlorométhane

CCM : chromatographie sur couche mince

DMSO : diméthylsulfoxyde

HE : huile essentielle

HEM : huile essentielle modifiée

HMDO : hexaméthylidisilxane

IR : infrarouge

IRTF : spectroscopie Infra-Rouge à Transformé de Fourier

Gram- : gramme négative

Gram+ : gramme positive

GCMS : Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

LR : réactif de Lawesson

MH : Muler Hinton

P₂S₅ : pentasulfure de phosphore

S.oryzae : *Sitophylus oryzae*

TR : Temps de rétention

UV-visible : Ultraviolet-visible

Sommaire

Introduction générale.....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :	
Chapitre I : Aperçu bibliographique sur l'espèce <i>Lippia citriodora</i>	
1-Présentation de l'espèce <i>Lippia citriodora</i>	3
2-Place dans la systématique botanique.....	3
3-Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	4
4-Propriétés pharmacologique.....	5
Chapitre II : Les huiles essentielles	
1-Définition des huiles essentielles.....	6
2-Localisation des huiles essentielles chez les végétaux.....	6
3-Composition chimiques des huiles essentielles.....	7
4-Les méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	7
4-1-Entrainement à la vapeur d'eau.....	7
4-2-L'hydrodiffusion.....	7
4-3-La distillation à vapeur saturée.....	7
4-4-L'expression à froid.....	7
4-5-Extraction par solvants.....	8
4-6-Hydrodistillation.....	8
4-7-Extraction par micro-ondes.....	8
4-8-Extraction au CO ₂ supercritique.....	8
5-Utilisation des huiles essentielles.....	9
6-Activité biologique des huiles essentielles.....	10
6-1-Activité antibactérienne des huiles essentielles.....	10
6-1-1-Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	11
6-2-Activité insecticide des huiles essentielles.....	11
6-2-1-Activité insecticide de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	11
Chapitre III : Thionation des huiles essentielles	
1-Mdification chimique des huiles essentielles.....	12
2-Généralité sur la thionation.....	12
2-4-Méthode de synthèse.....	14
2-4-1-Réaction avec du sulfure d'hydrogène.....	14
2-4-2-Réaction avec du penta sulfure de phosphore.....	14

2-4-3-Réaction avec le réactif de Lawesson.....	16
2-4-4-Réactif de Belleau.....	17
2-4-5-Réactif de Davy.....	18
PARTIE EXPERIMENTALE :	
Chapite I : Matériel et méthodes	
1-Matériels.....	21
1-1-Matériel végétale.....	21
1-2-Matériel biologique.....	21
1-2-1-Souches bactériennes et fongiques étudiées.....	21
1-2-2-Milieu de culture.....	22
1-2-3-Souche de <i>Sitophilus oryzae</i>	22
1-3-Matériel de caractérisation.....	23
1-3-1-Réactifs et solvants.....	23
2-Méthodes.....	24
2-1-Extraction de l'huile essentielle.....	24
2-2-Détermination du rendement.....	25
2-3-Analyses organoleptiques.....	25
2-4-Charactérisation de l'huile essentielle.....	26
2-4-1-Détermination des indices physiques.....	26
2-4-2-Chromatographie sur couche mince CCM.....	28
2-5-Thionation de l'huile essentielle.....	28
2-6-Activité antibactérienne.....	29
2-7-Etude de l'activité insecticide.....	31
Chapitre II : Résultats et discussions	
1-Extraction de l'huile essentielle.....	33
1-1-Rendement en huile essentielle.....	33
1-2-Charactérisation de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	34
1-2-1-Détermination des caractéristiques organoleptiques.....	34
1-2-2-Détermination des Indices physiques.....	34
1-3-Charactérisation de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> par IRTF.....	37
2-Résultats de la Thionation.....	35
2-1-Thionation de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	35
2-1-1-Charactérisation par CCM.....	36

2-1-2-Caractérisation de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> modifiée par IRTF.....	37
2-1-3-Caractérisation de l'HE native et modifiée de <i>Lippia citriodora</i> par UV- visible.....	38
2-1-4- Etude analytique de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> modifiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	39
3-Résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne.....	42
3-1-Détermination de l'activité antibactérienne.....	42
4-Résultats de l'évaluation de l'activité insecticide.....	46
Conclusion générale	49

Référence bibliographique

Annexe

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverse plante trouvées dans son environnement, a fin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études [1].

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux [1].

La popularité dont jouissent de puis long temps les huiles essentielles et les plantes aromatiques en générale reste liée à leurs propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, anti-toniques, insecticides, tonifiantes, stimulantes, et calmantes [2].

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large, leurs activités biologique sont principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs.

Les composés soufrés sont très rare dans les huiles essentielles, et n'existe pas dans l'huile essentielle de la verveine odorante. Le soufre en tant qu'élément chimique tient une place particulière en chimie organique, son nombre d'oxydation peut varier entre -2 et $+6$ ce qui lui permet d'être présent dans des fonctions équivalentes aux fonctions oxygénées classiques, telles que les thiols, les sulfures et les thiocarbonyles. La présence d'un ou plusieurs atomes de soufre au sein d'une molécule est souvent synonyme d'activité biologique voire de toxicité. Son action est reliée à sa réactivité propre ou bien se limite à un rôle purement structural [3].

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales, au regard de sa superficie et de sa diversités bioclimatique, ses espèces sont très riche en huiles essentielles et sont utilisées en médecine populaire pour leurs propriétés antiseptiques, anti diarrhéiques et anti

bronchiques. À cet effet, et dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de notre pays, nous nous sommes intéressés à étudier l'espèce *Lippia citriodora* (Verbénaceae).

Le choix de cette plante a été justifié par le fait qu'elle est très utilisée dans la médecine traditionnelle Algérienne.

Dans le présent travail notre objectif fut alors de modifier la matrice de cette huile essentielle par thionation des composés carbonylée présent et d'étudier son activité antimicrobienne vis-à-vis des souches bactériennes et des espèces fongiques avant et après modification. Dans un deuxième volet, nous nous sommes intéressés à étudier aussi l'activité insecticide de cette huile essentielle pour pouvoir valoriser la réaction de thionation et tirer ultérieurement les meilleures informations possibles sur la relation entre la structure et l'activité.

Ainsi ce manuscrit s'articule autour de trois parties :

Dans la première partie, une étude bibliographique est menée sur : La matière végétale, leur composition chimique et les différents travaux dont elle a fait l'objet, ensuite on présentera la chimie des huiles essentielles et de ses applications biologiques, le troisième chapitre est consacré à la thionation des huiles essentielle.

Dans la seconde partie, nous détaillerons l'outil méthodologique utilisé :

- L'extraction de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* par Hydrodistillation.
- La caractérisation physico-chimique et organoleptique de l'huile essentielle.
- La thionation de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.
- L'analyse des produits obtenus par les différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques afin d'élucider leurs structures chimiques.
- L'étude du pouvoir antibactérien et du pouvoir insecticide de l'huile essentielle avant et après thionation.

Dans la troisième partie, nous discutons les résultats obtenus lors de cette étude.

Partie

Bibliographique

Chapitre I : Aperçu bibliographique sur l'espèce *Lippia citriodora*

1. Présentation de l'espèce *Lippia citriodora*

La verveine odorante (*Lippia citriodora*) est un sous-arbrisseau de la famille des Verbénacées, originaire d'Amérique du Sud, introduit et cultivé sur le pourtour méditerranéen (midi de la France et Afrique du Nord).

Il s'agit d'un arbrisseau vivace ramifié pouvant atteindre 1 à 5 m de hauteur [4], dont les tiges anguleuses et cannelées portent des feuilles rudes, courtement pétiolées, verticillées par 3. Les fleurs disposées en épis possèdent 4 pétales soudés à la base en un tube et étalés en 4 lobes bicolores : blancs sur la face externe et bleu violacé sur la face interne [5]. Les rameaux sont récoltés peu avant la floraison, rassemblés en bouquets puis séchés. Les feuilles sont mondées une fois séchées puis consommées en infusion [6].

La verveine odorante est utilisée en herboristerie et en industrie de la parfumerie à cause de l'odeur de citron que dégagent les feuilles broyées.

2. Place dans la systématique botanique

Lippia citriodora est répertoriée comme suit :

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Verbenaceae

Genre : *Lippia*

Espèce : *Lippia citriodora* [7]

➤ Noms Vernaculaires :

Nom français : verveine vraie, verveine citronnée ou verveine du Pérou.

Nom en arabe : Louiza laymunia, « لوزة ليمونية »

Nom scientifique : *Lippia citriodora* [7]



Figure 1 : L'espèce *Lippia citriodora*

3. Composition chimique de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

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

L'étude menée par Fatima Bensabah et al. (2015) [8] sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* de la région de Settat Maroc est majoritairement composée de limonène (25.86%) suivie par géraniol (15.63%) et néral (15.29%), accompagné de faible quantité de D-germacrène (4.0%), β caryophyllène (3.0%), β - ocimène (3.0%) et sabinène (3.0%). Hanaa et al., (2008) [9] ont étudié l'huile essentielle de la région de Gizeh Égypt, la composition chimique de cette huile essentielle est constituée principalement de citral (14.21%), β - caryophyllène (10.71%), 1,8-cinéole (9.1%), citronellol (8.87%), iso menthone (6.43%), α -bergamotene (5.33%), menthonol (5.10%) et p-cymene (4.23%).

En Jordanie Mohammed et al., (2013) [10] ont mis en évidence les principaux composés : limonène (17.7%), 1,8-cinéole (11.7%), géraniol (10.1%), néral (9.8%), α -curcumène (6.3%) et spathulenol (4.6%). L'huile essentielle de *Lippia citriodora* Syrien [11] est également composée de géraniol (25.6%) et le néral (19.4%) comme produits majoritaires ; les autres composés sont : le β -caryophyllène (8.74%), le D-Germacrene (5.91%), le γ -Elemene (5.84%) et le Ar-curcumene (4.95%).

Par ailleurs, les principaux constituants de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* cultivée en Turquie [12] ; ont été déterminés comme étant, le limonène (30.33%), le trans-citral (17%),

Chapitre II : Les huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des extraits végétaux volatiles et odorants appelés également substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes et des épices, elles sont volatiles et sensibles à l'effet de la chaleur [26].

L'Association Française de Normalisation (AFNOR, Edition 2000) [27], a défini les huiles essentielles comme étant : des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Les huiles essentielles sont des molécules volatiles et odoriférant, synthétisées grâce à l'énergie solaire, pour les cellules sécrétrices. Ces huiles sont comme sous différents noms : essences végétales, essences aromatiques, huiles volatiles ou parfums [28].

2. Localisation des huiles essentielles chez les végétaux

Les huiles essentielles n'existent quasiment, que dans les végétaux, elles peuvent être stockées dans tous les organes des plantes aromatiques.

Fleurs : orange, rose, lavande, le bouton floral (girofle),...

Feuilles : eucalyptus, menthe, thyme, laurier, sarriette, sauge,...

Fruite : fenouil, anis, épicarpes des citrus,...

Tiges : citronnelles,...

Rhizomes et racines : gingembre, vétives, iris,...

Graines : noies de muscades, coriandre,...

Bois et écorces : cannelle, santal, bois de rose,... [29].

3. Composition chimique des huiles essentielles

Les plantes vertes sont des véritables petites usines chimiques [30]. Dans le cas des huiles essentielles seuls sont rencontrés les terpènes les plus volatils c'est-à-dire ceux dont le poids moléculaire n'est pas élevé [31], on distingue deux types d'HE :

a) Mélange des terpènes et sesquiterpènes contenant de petites quantités des autres classes chimiques.

b) Mélange des composés aromatiques.

D'une manière générale, Les constituants plus couramment représentées sont les terpénoïdes et les composés aromatiques, mais on y trouve rarement d'autres composants d'origines diverses (dérivés soufrés, nitriles, thiocyanates...) [32].

4. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles

4.1. Entraînement à la vapeur d'eau

La plus part des huiles essentielles sont obtenus par l'entraînement à la vapeur d'eau qui est applicable en générale à tous les essences qui ne sont pas sensiblement altérées par l'eau à 100C°.

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe.

Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation [33].

4.2. L'hydro diffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux Techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant [34]

4.3. La distillation à vapeur saturée

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales [34].

4.4. L'expression à froid

L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine,...etc. Son principe consiste à rompre

dans le domaine gazeux. Le CO₂ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant [36].

5. Utilisations des huiles essentielles

Les industries alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et la phytothérapie consomment des dizaines de milliers de tonnes de plantes à huile essentielle.

L'utilisation des huiles essentielles présente pour l'être humain l'un des plaisirs de la vie

5.1. Utilisations en industrie agro alimentaire

Les huiles essentielles sont utilisées en industrie alimentaire comme agents naturels de conservation [37]. Leur utilisation pour cette dernière est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydants [38].

- Elles augmentent le goût des aliments.
- Pour parfumer et colorer.
- Le secteur des boissons gazeuses se confirme un gros consommateur d'huiles essentielles.
- Les HEs peuvent être utilisés comme additifs alimentaire [39].
- Les fabricants d'aliments utilisent de plus en plus les HEs parce que le consommateur recherche d'avantage les produits avec les ingrédients naturels. L'huile la plus utilisée dans le monde est l'huile essentielle d'orange.
- Les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.
- La fabrication des gâteaux, biscuits, soupes, sauces, chewing gum, chocolats et bonbons.

5.2. Utilisations en industrie pharmaceutique

- Elles permettent l'amélioration de la circulation du sang et la bronchite chronique.
- Elles soulagent les nerfs, les symptômes d'estomac tels que le vomissement et la flatulence aussi le rhumatisme et allègent la douleur.
- Elles calment les émotions.
- Elles ajustent la tension artérielle.
- Elles interdisent l'acétylcholine de la décomposition, activent les cellules du cerveau et améliorent la réminiscence

- Elles sont bonnes pour le bain sénile de crétinisme même aux applications de peau avec l'essence de Romarin.
- Elles protègent l'ADN contre l'oxydation.

5.3. Utilisations en industrie cosmétique

- Les marques de cosmétiques naturels contiennent des huiles essentielles pour leurs propriétés, pour servir de conservateur et aussi pour remplacer les parfums de synthèse.
- Les HEs sont largement utilisés dans la fabrication des produits cosmétiques tels que les parfums, savons, lotions et les pommades de soins [40], [41] et [42].

6. Activités biologiques des huiles essentielles

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et anti-oxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques.

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses.

6.1. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Depuis l'antiquité, les extraits aromatiques de plantes ont été utilisés dans différentes formulations, comme les médicaments et la parfumerie [43]. Les huiles essentielles ont été considéré comme agents antimicrobiens les plus efficaces dans ces plantes. Lorsque nous parlons d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets: une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides. Les qualités microbiologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues. Toutefois, la première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix [44]. Depuis, de nombreuses huiles ont été définies comme antibactériennes [45].

6.1.1. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

L'huile essentielle de *Lippia citriodora* présente, in vitro, une activité antibactérienne et antifongique intéressante. Les composants majeurs comme le géraniol, néral et limonène peuvent être responsables de la différenciation de l'activité antimicrobienne. D'ailleurs, tous ces composés sont bien connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [46].

Plusieurs études ont montré l'efficacité des extraits et de l'HE de *Lippia citriodora* sur des souches microbiennes tels : L'activité antifongique des extraits méthanolique de *Lippia citriodora* a été démontrée par les travaux de Ramzi et al, 2010 [47]. Il existe aussi d'autres travaux sur l'activité antimicrobienne des extraits aqueux et acétoniques de l'espèce *Lippia citriodora* [48]. Hanaa et al. [49] ont montré l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'espèce *Lippia citriodora* sur différentes souches bactériennes.

6.2. Activité insecticide des huiles essentielles

L'effet insecticide des huiles essentielles par contact, ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les déprédateurs des denrées entreposées, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer et de rentabiliser leur activité insecticide. Beaucoup de travaux indiquent que les huiles essentielles extraites des plantes odorantes ont une activité insecticide indéniable vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* F [50-51]. Ces huiles essentielles agissent par diffusion, c'est ce qui leur permet d'atteindre toutes les interstices dans la masse de graines stockées. Elles peuvent donc être utilisées en fumigation et leur emploi est facile.

6.2.1. Activité insecticide de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

L'huile essentielle de *Lippia citriodora* présente, une activité insecticide intéressante. L'effet insecticide de l'huile essentielle extraite de la plante aromatique *Lippia citriodora*, sur la population d'insectes *T.confusum* a été réalisé par Veranocia et al. 2014[52]. Les résultats ont montré que les huiles essentielles de *Lippia citriodora* expriment un effet insecticide sur *T.confusum* (les adultes de Tribolium brun de la farine), avec une dose ($CL_{50}=5.53\text{mg/L}$ d'air) par fumigation. Une étude similaire a été réalisée par Abbas et al. 2012 [53], Les résultats ont montré que l'huile essentielle de *Lippia citriodora* possédant une excellente efficacité larvicide contre les *C.maculata* (ravageuses des grains stockés (*Callosobruchus maculatus*)). Les tests biologiques ont montré une valeur de ($CL_{50} = 10.2\mu\text{l/d'air}$), après 24 heures d'exposition.

Chapitre III : Thionation des huiles essentielles

1. Modification chimique des huiles essentielle :

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

2. Généralité sur la thionation :

2.1. Définition :

La thionation est la conversion d'un groupement carbonyle en un thiocarbonyle. Les thio-analogues des composés carbonylés tel que les thioaldéhydes, les thiocétones, les thioesters, les thioamides et les thiolactames sont des intermédiaires importants pour la synthèse de différents composés organosulfurés d'activité biologique intéressante [54-55].

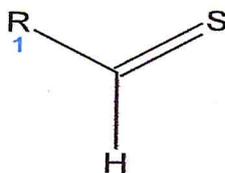


Figure 2: Structure générale des thioaldéhydes.

2.2. Nomenclature :

Le nom se déduit de celui de l'hydrocarbure correspondant en ajoutant la terminaison thione, précédé du numéro du carbone fonctionnel (le plus petit possible). Si le groupe thione n'est pas prioritaire, il est désigné par le préfixe thioxo [56].

2.3. Intérêt :

La thionation est l'une des possibilités de modification chimique qui peut influencer sur les activités des composés.

Deux différences principales différencient les thioaldéhydes des autres carbonyles : la double liaison (C=S) entre le carbone et le soufre utilise des orbitales de tailles très différentes (2p sur du carbone et 3p sur le soufre), qui ne se chevauchent pas bien à cause des plus hautes énergies des orbitales p du soufre. Les doubles liaisons entre le carbone et le soufre sont relativement inhabituelles, le groupe thiocarbonyle est plus réactif et a tendance à s'oligomériser et/ou à se polymériser [57].

- S : $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^4 3d^{10}$
- O : $1s^2 2s^2 2p^4$
- C : $1s^2 2s^2 2p^2$

De plus, la double liaison entre le carbone et le soufre est moins polarisée du fait d'une différence d'électronégativité plus petite entre ces 2 atomes. Ceci réduit la sélectivité en cas d'addition nucléophile [57].

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

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

La fonction thiocaronyl est isoélectronique de la fonction cétone. La double liaison C=S est formée par le recouvrement de l'orbitale 2p du carbone avec l'orbitale 3p du soufre. Elle présente un degré de recouvrement plus faible que la liaison C=O du fait de la différence de symétrie spatiale et de densité entre les orbitales. En conséquence, les dérivés thiocarbonylés présentent une réactivité supérieure et sont moins stables que d'atomes ou de groupements fonctionnels. De plus, le caractère moins électronégatif du soufre par rapport à l'oxygène, la forte polarisabilité de la liaison C=S et la participation éventuelle des orbitales 3d vacantes sont autant de facteurs qui par leurs effets propres ou cumulés, apportent à la fonction thiocarbonyl une réactivité chimique bien distincte de la fonction cétone [58].

La plus grande instabilité et réactivité des dérivés thiocarbonylés peut expliquer que d'une façon générale ils aient été beaucoup moins étudiés que leurs homologues carbonylés. C'est bien sûr plus particulièrement vrai de la fonction thioaldéhyde. Il convient d'ajouter à ces effets, purement structuraux des effets secondaires liés à l'environnement immédiat : les dérivés thiocarbonylés possèdent une odeur forte et désagréable qui a pu dissuader, directement ou indirectement, des équipes de chercheurs à travailler dans ce domaine [58].

Seuls, les dérivés possédant des substituants à effets électroniques stabilisants sont bien connus. Si des voies de synthèse de dérivés non stabilisés sont connues, elles ne semblent toutefois pas suffisamment générales et efficaces pour que la fonction thiocarbonyl puisse être considérée à l'image de la fonction carbonyl, comme une pierre angulaire en synthèse organique. Sa potentialité existe pourtant et l'on constate dans la littérature récente un intérêt renouvelé pour cette chimie [58].

2.4. Méthode de synthèse :

Plusieurs méthodes sont annoncées dans la littérature pour la thionation des composées organique.

2.4.1. Réaction avec du sulfure d'hydrogène :

L'utilisation de sulfure d'hydrogène en présence d'un catalyseur acide, en général de l'acide chlorhydrique, est une méthode classique. La réaction consiste en une activation du groupe carbonyle via une protonation qui permet la formation d'un hémiacétal mercapto hydroxyle suivie d'une élimination [59].

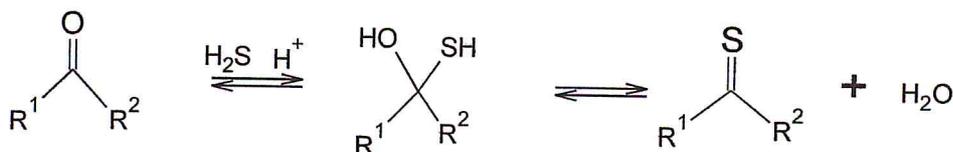


Figure 3: Thionation avec le sulfure d'hydrogène.

2.4.2. Réaction avec du pentasulfure de phosphore :

2.4.2.1. Introduction :

En 1869 le pentasulfure de phosphore était le premier réactif de thionation annoncé par Henry [60] et Wislicenus [61]. Il est connu également sous sa forme P_4S_{10} . Il permet la thionation à des températures plus élevées que le sulfure d'hydrogène. L'inconvénient de ce réactif est sa faible solubilité dans les solvants organiques. Les solvants les plus utilisés dans cette voie de synthèse sont le benzène, la pyridine et le 1,2-dichlorobenzène. La stabilité thermique de ce réactif peut être une de ses plus importantes caractéristiques. Ceci permet de le manipuler à des hautes températures dans la gamme 165-175°C [62].

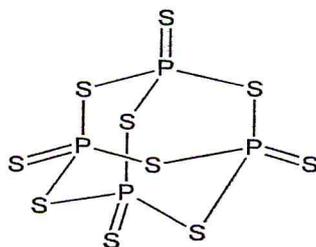


Figure 4 : P_4S_{10}

2.4.2.2. Combinaison de pentasulfure de phosphore et de l'hexaméthylidisiloxane :

Récemment Curphey [63-64] a montré que la combinaison de P_4S_{10} et de l'hexaméthylidisiloxane convertit efficacement les esters, les lactones, les amides, les lactames et les cétones à leurs dérivés thiono correspondant avec des rendements comparables ou supérieurs à ceux obtenus avec le réactif de Lawesson [65].

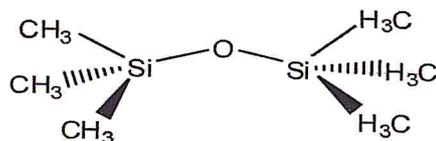


Figure 5: HMDO

2.4.2.3. Thionation avec le complexe P_4S_{10} – pyridine dans des solvants :

Bien que le P_4S_{10} dans la pyridine a été utilisé pour thioner les composés carbonylés pendant des années, sa structure n'a été déterminé que récemment. Il réagit facilement avec de la pyridine à chaud pour former un zwitterion [66-67]. Dans d'autres travaux, il a été évoqué que le P_4S_{10} peut être solubilisé dans l'acétonitrile et même dans le DMSO.

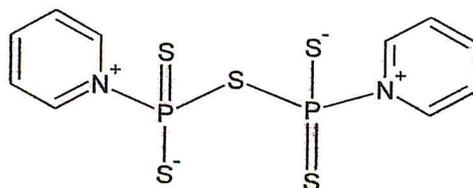


Figure 6 : Réactif zwitterionique du P_4S_{10} dans la pyridine.

2.4.2.4. Thionation avec le pentasulfure de phosphore dans l'Alumine :

Une méthode simple, efficace et nouvelle a été développée pour la synthèse de thioaldéhydes par thionation des aldéhydes en utilisant P_4S_{10} / Al_2O_3 dans l'acétonitrile. Il a été trouvé que la combinaison de $Al_2O_3 / P_4S_{10} / Al$ concerne un procédé simple et commode pour la synthèse des thioaldéhydes. Dans les années récentes l'utilisation de réactifs et des catalyseurs supportés sur des supports solides a reçu beaucoup d'attention. De tels réactifs non seulement simplifie les processus de purification aussi aider à prévenir la libération de résidus de réaction dans l'environnement Cela a conduit à une croissance dans le domaine des réactifs solides supportés sur de l'alumine [68]. Kauslik et al. ont développé une nouvelle thionation par encapsulation de pentasulfure de phosphore dans l'Aluminium basique.

La thionation des aldéhydes selon le procédé utilisant $P_4 S_{10} / Al_2O_3$ le a permis d'obtenir des produits avec très bon rendements mais l'interprétation de l'effet de sur le déroulement de la réaction de thionation avec P_4S_{10} n'est pas assez claire. La réaction (P_4S_{10} / Al_2O_3) a été effectuée dans l'acétonitrile et a donnée des très bon rendements mais cette méthode nécessite plus d'étude.

2.4.3. Réaction avec le réactif de Lawesson :

2.4.3.1. Introduction :

C'est un composé chimique organique utilisé comme agent de thionation. Il a été introduit par Sven-Olov Lawesson. Il est synthétisé pour la première fois en 1956 [69-70]. Ce réactif versatile et efficace de thionation est utilisé pour des nombreux composés carbonyles aromatiques, aliphatiques, insaturés et carboxamides hétérocycliques. Il a été signalés qu'il se décompose à des températures supérieures à $110^\circ C$ [71-72].

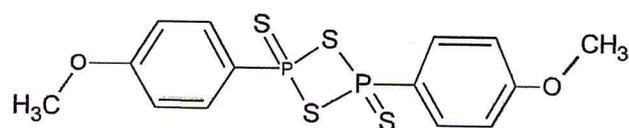
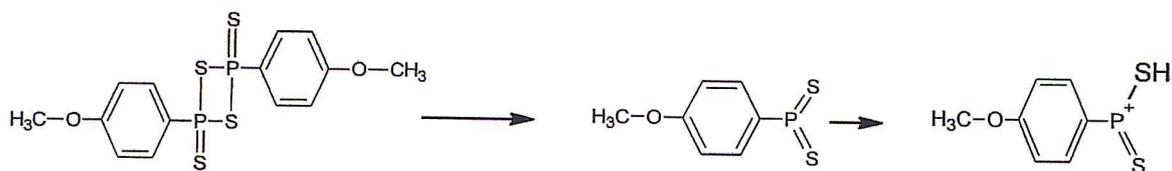


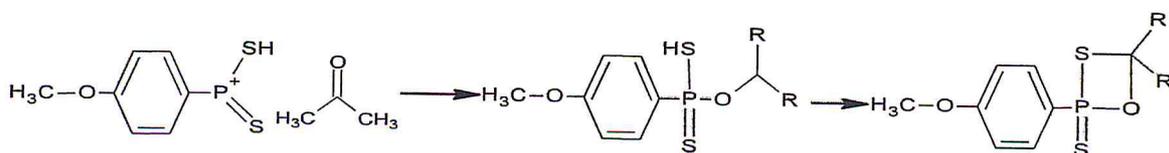
Figure 7 : Réactif de Lawesson; 2,4-disulfure de 2,4-bis (4-méthoxyphényl)-1,3-dithia-2,4-diphosphétane.

2.4.3.2. Mécanisme :

Les sites actifs de la molécule sont activés par l'ouverture du cycle central formé par les phosphores et les soufres [73]. Cette ouverture se fait principalement par voie thermique :



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



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

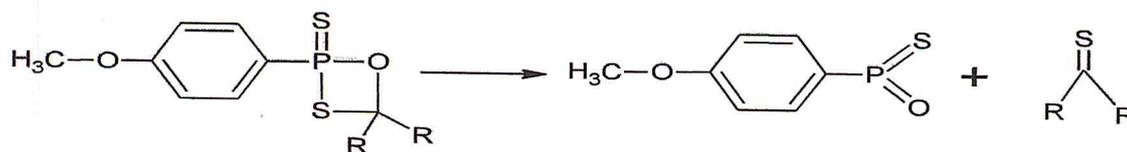


Figure 8: Mécanisme de réaction avec LR

Cette réaction ressemble à la réaction de Wittig et est valable pour les cétones, les amides et les lactames. Les esters réagissant dans des conditions réactionnelles plus agressives, il est possible d'effectuer des thionations sélectives [59].

Pour ce qui est du réactif de Lawesson, malgré son coût élevé, il a pu ces dernières années remplacer le P₄S₁₀. Il est considéré comme un réactif de choix pour de nombreuses thionations. Les propriétés de cette dernière ont été d'abord étudiées par Schumacher [74] à la fin des années 1960. Mais, le champ d'application et les limites du réactif ont été largement inconnus pendant assez longtemps alors que des travaux d'un groupe danois ont attiré l'attention généralisée à l'utilité de ce réactif. La littérature montre que le réactif de Lawesson est le meilleur agent de thionation pour la fonction carbonyle, ainsi que pour les amides, aussi il est plus sélectif que le P₄S₁₀ en cas d'amides primaires [75].

2.4.4. Réactif de Belleau :

Il est moins réactif comme agent de thionation. Sa structure est identique à celle du réactif de Lawesson dans laquelle les substituants méthoxyyles sont remplacés par des groupes phénoxyyles [76].

Sa structure est identique à celle du réactif de Lawesson dans laquelle les substituant méthoxyyles sont remplacés par des groupes phénoxyyles [77].

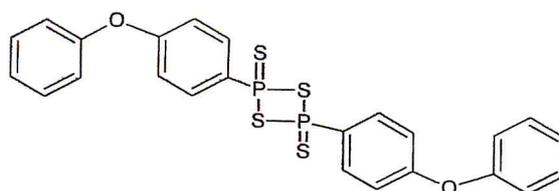


Figure 9: Réactif de Belleau.

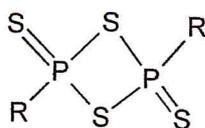
2.4.4.1. Mécanisme :

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

2.4.5. Réactifs de Davy :

2.4.5.1. Introduction :

C'est une famille de composés chimiques organiques utilisés comme agents de thionation. Ils sont composés d'un centre 2,4-disulfure de 1,3-dithia-2,4-diphosphétane et de deux extrémités qui sont des groupes thioalkyles où les alkyles sont un méthyle, éthyle, isopropyle ou butyle. Ils sont beaucoup plus réactifs que les réactifs de Lawesson et Belleau [76].



R=Me,Et,iPr,Bu

Figure 10: Structure chimique de réactif de Davy

2.4.5.2. Mécanisme :

Les sites actifs de la molécule sont activés par l'ouverture du cycle central formé par les phosphores et les sulfures. Cette ouverture se fait principalement par voie thermique [75-76].



Figure 11: Mécanisme de réaction avec le réactif de Davy

Ces différents réactifs agissent selon le même mécanisme, mais en fonction des différents substituant qui les composent, ils réagissent de manière plus ou moins rapide. Par un judicieux choix du réactif, une thionation sélective de certains groupes est possible. Le réactif de Lawesson est le plus utilisé actuellement pour la thionation des groupes carbonyles. Il occupe la position intermédiaire dans l'échelle de réactivité derrière les réactifs de Davy qui sont considérés comme les moins sélectifs, mais devant le réactif de Belleau [77-78-79].

Partie expérimentale

Introduction

Dans cette partie, nous détaillerons l'outil méthodologique utilisé :

- L'extraction de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* par Hydrodistillation.
- La caractérisation physico-chimique et organoleptique de l'huile essentielle.
- La thionation de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*
- L'analyse de l'huile essentielle obtenu par les différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques afin d'élucider leurs structure chimique.
- L'étude du pouvoir antibactérien et du pouvoir insecticide de l'huile essentielle avant et après thionation.

Le schéma dans la figure 12 représente les étapes de travail.

Partie

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1 Matériel végétale

La partie aérienne (feuilles sèches) de *Lippia citriodora* (verveine odorante) a été achetée chez un herboriste et a été identifiée au niveau du laboratoire de botanique du département d'Agronomie de l'Université SAAD DAHLEB DE BLIDA 1.

Les feuilles de *Lippia citriodora* ont été récoltées en mois de Septembre 2016 dans la région de Khemis-Miliana, wilaya d'Ain Defla.

La verveine odorante (*Lippia citriodora*) est une plante herbacée appartenant à la famille des Verbénacées. Elle est caractérisée par ses feuilles très parfumées, au goût de citron. Elle est connue pour ces propriétés antipyrétique, antiasthmatique, et est également utilisé en cas de troubles digestifs, rougeole, maux de tête [80-81].

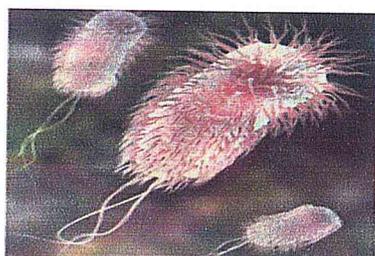
1.2. Matériel biologique

1.2.1. Souches bactériennes et fongiques étudiées

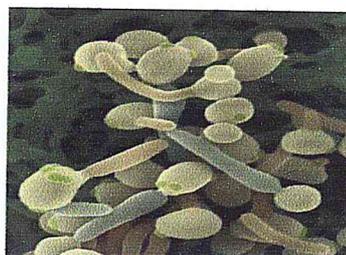
Pour la détermination de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*, deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) et une levure ont été choisies (*Candida albicans*). Ces bactéries sont pathogènes et sont connues pour leur forte antibiorésistance et leur pouvoir invasif et toxique chez l'Homme. Les souches pathogènes utilisées sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau N°1: Les microorganismes testé

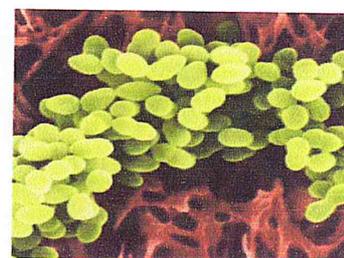
Souches	Références	Gram
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	+
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	/



Escherichia coli



Staphylococcus aureus



Candida albicans

Figure 13 : Bactéries et levure vue sous microscope.

1.2.2. Milieux de culture

Suivant les méthodes employées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisée les milieux de culture:

- **Gélose nutritive** : En biologie, la gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (*GNO*) ou encore gélose ordinaire est un milieu d'isolement non-sélectif.

L'isolement est réalisé dans le but de contrôler la pureté d'une souche bactérienne (pur s'il y a un type de colonie sur la gélose) ou de purifier la souche bactérienne si elle est contaminée.

L'isolement permet de séparer des micro-organismes différents dans un mélange qui pourront être ainsi étudiés individuellement. Sur cette gélose nutritive on observe le nombre de colonies différentes (nombre de type de colonies) et on fait une description des colonies isolées.

- **Muller Hinton (MH)** :

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

- **Sabouraud** :

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

1.2.3. Souche de *Sitophilus oryzae*

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

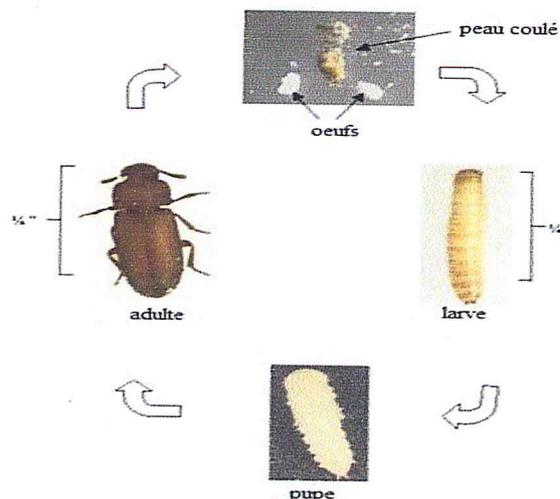


Figure 14 : Cycle de vie de la *Sitophilus oryzae*.

1.3. Matériels de caractérisation :

1.3.1. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/MS)

Chromatographe : HP 6890

Spectromètre de masse : Quadripôle.

1.3.1.1. Conditions opératoire

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

Tableau N° 2 : Condition opératoire du GCMS - HE de *Lippia citriodora*

Injecteur	Colonne	Détecteur de masse
Température : 250°C Mode d'injection : Splitless Volume injecté : 01µl	Type : HP-5Ms Dimensions : long 30 m, D int 0.25 mm, épaisseur film 0.25 µm Température du four : 60°C pendant 8min, pallier02 °C/min jusqu'à 250°C, isotherme pendant 10 min. Temps d'analyse : 113min Gaz vecteur : Hélium pure Débit GV : 0.5ml/min	Mode d'analyse : Scan (de 35à 550) Solvant utilisé : méthanol Délai du solvant : 3.5min Température de l'interface : 280 °c Type d'ionisation : Impact électronique Intensité du filament : 70 év Température de la source : 230 °c

1.4. Réactifs et Solvants

Les solvants, les réactifs et produits chimiques utilisés sont présenté dans les tableaux suivants :

Tableau N°3 : Réactifs utilisé

Produits chimiques	M (g/mol)	Marque	Pureté %
P ₂ S ₅	222,27	SIGMA-ALDRICH	99
NaHCO ₃	84,01	Biochem	99

Tableau N°4 : Solvants utilisé

Produits chimiques	M (g/mol)	Marque	Pureté %
CH ₂ Cl ₂	84,933	Panreac	99
DMSO	78,13	Panreac	99

2. Méthodes

2.1. Extraction de l'huile essentielle:

2.1.1. Procédé d'extraction :

Nous avons utilisé l'hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger [82] pour l'extraction de l'huile essentielle. L'extraction est effectuée durant trois heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle.

2.1.2. Principe :

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

Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Le mélange est ensuite refroidi et condensé dans un essencier. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une huile.

2.1.3. Mode opératoire

Nous avons introduit 100 g de feuilles séchées de *Lippia citriodora* après avoir été coupée en petits morceaux dans un ballon d'une capacité nominale de 2 litres contenant de l'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 3 h. Quelques grains de pierre ponce ont été rajoutés dans le ballon dans le but de réguler la température du système. Le chauffage est assuré par une chauffe ballon électrique. L'opération est conduite à pression atmosphérique. Le système de cohobation permet de maintenir constant le volume d'eau présent initialement, durant tout le processus de distillation.

Les vapeurs chargées des huiles essentielles se condensent à leur arrivée au niveau de réfrigérant, elles retombent sous forme de gouttelettes et forment avec l'eau un mélange hétérogène. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin elle

est conservée dans des flacons hermétique après d'être pesé et conservé à une température de 4 °C jusqu'à l'analyse.

Le montage de l'hydrodistillation est représenté ci-dessus :



Figure 15 : montage de l'hydrodistillation « Clevenger »

2.2. Détermination du rendement

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

2.2.1. Mode opératoire

Après un temps estimé à 3 heures d'extraction, l'huile essentielle est prélevée et récupérée par simple décantation. Elle est par la suite pesée dans une balance de précision.

Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$R_{HE} (\%) = \frac{m}{m_0} \times 100$$

Où :

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

m : masse de l'huile essentielle en gramme.

m_0 : masse de la matière végétale en gramme.

2.3. Analyses organoleptiques selon la Pharmacopée Européenne (1997).

L'huile essentielle extraite est soumise à des tests afin d'évaluer ses caractères organoleptiques, notamment l'aspect, la couleur et l'odeur.

2.4.1.2. Indice de réfraction :

➤ Principe :

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante. La température de référence est de 20°C [84].

➤ Mode opératoire :

L'indice de réfraction a été déterminé par la lecture directe de l'angle de réfraction à l'aide du réfractomètre, en employant la lumière diffuse.

L'indice de réfraction à la température de référence $T=20^{\circ}\text{C}$ (η_D^{20}), est déterminée par la formule suivante :

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

Avec $T=20^{\circ}\text{C}$

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

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

➤ Principe

Le pouvoir rotatoire est la propriété que présente certaines substances de dévier la lumière polarisée. L'angle de rotation optique d'un liquide et l'angle de rotation (α) exprimé en degré ($^{\circ}$) du plan de polarisation à la longueur d'onde de la raie D du sodium (avec $\lambda = 589.3 \text{ nm}$) mesurée à 20°C , sous une épaisseur de 1 décimètre [85].

➤ Mode opératoire

Amener l'échantillon à une température spécifique et introduire dans le tube en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée.

Placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation dextrogyre (+) ou lévogyre (-) de l'échantillon sur l'échelle de l'appareil.

Le pouvoir rotatoire est calculé selon la formule suivante :

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

Avec :

A : rotation en degré ($^{\circ}$).

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

2.4.2. Chromatographie sur couche mince CCM

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

2.4.2.1. Principe :

La chromatographie sur couche mince repose sur les phénomènes d'adsorption, d'interaction et de polarité.

Un mélange de composés est placé sur un support solide (phase stationnaire) qui est plongé dans un solvant (phase mobile) qui, par capillarité, se déplace le long de la phase stationnaire.

La phase mobile va entraîner les composés qui migreront à une hauteur variant en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile.

2.4.2.2. Protocole expérimentale

Les échantillons sont analysés en utilisant des plaques CCM commerciale prêtes à être utiliser, de gel de silice de dimension (20/20 cm).

La cuve de migration est partiellement remplie du mélange de solvant (phase mobile) et recouverte, afin qu'elle soit saturée en vapeur d'éluant, ce qui facilite et améliore la migration.

Une ligne de dépôt est tracée à 1,5 cm du bord, l'huile essentielle est solubilisés dans le solvant approprié et déposés, puis la plaque est mise en contact avec la phase mobile dans la cuve jusqu'à migration de la phase mobile à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque.

2.4.2.3. Calcul du rapport frontal R_f

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

$$R_f = \frac{D_c}{D_s}$$

Ou :

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

D_s : La distance parcourue par le front du solvant.

2.5. Thionation de l'huile essentielle

2.5.1. Mode opératoire

L'huile essentielle préalablement séchée est dissout dans 30ml de CH_2Cl_2 . Ensuite 0,7 g de P_2S_5 et 0,146g de bicarbonate de sodium sont additionnées. La réaction est portée à reflux dans un bain marie à 45 jusqu'à 50°C. Après filtration, on évapore le solvant par évaporateur rotative.

2.6. Activité antibactérienne

2.6.1. Introduction

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques. Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou des plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles.

En particulier, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'application, y compris, pharmaceutiques, médicales et agroalimentaires.

L'activité des huiles essentielles et des extraits aromatiques est souvent réduit à l'activité de leurs composés majoritaires, ou ceux susceptible d'être actifs. Evalués séparément sous la forme des composés synthétiques, ils confirment l'activité des huiles essentielles de compositions semblables. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tiennent à l'intégrité de ses composés majoritaires.

Les tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés au sein de laboratoire d'hygiène de wilaya de Blida.

2.6.2. Préparation des solutions test

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

2.6.3. Techniques d'étude du pouvoir antibactérien

Lors de cette étude, nous avons testé l'action de l'huile essentielle native et modifiée des différentes espèces vis-à-vis des souches bactériennes par la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) [86]. L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée « antibiogramme » ou « méthode par diffusion en milieu gélosé » ou encore « méthode des disques ».

2.6.3.1. Principe

La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbants stériles (de 9 mm de diamètre) imprégnés d'une quantité d'huile essentielle pure et déposés à la surface d'une gélose inoculée et uniformémentensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'HE à partir du disque au sein de la gélose détermine un gradient de concentration. Les micro-organismes poussent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles

rencontrent une concentration d'huile essentielle suffisante pour inhiber leur croissance dont on observe après incubation tout autour des disques une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée « zone d'inhibition ». Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [87].

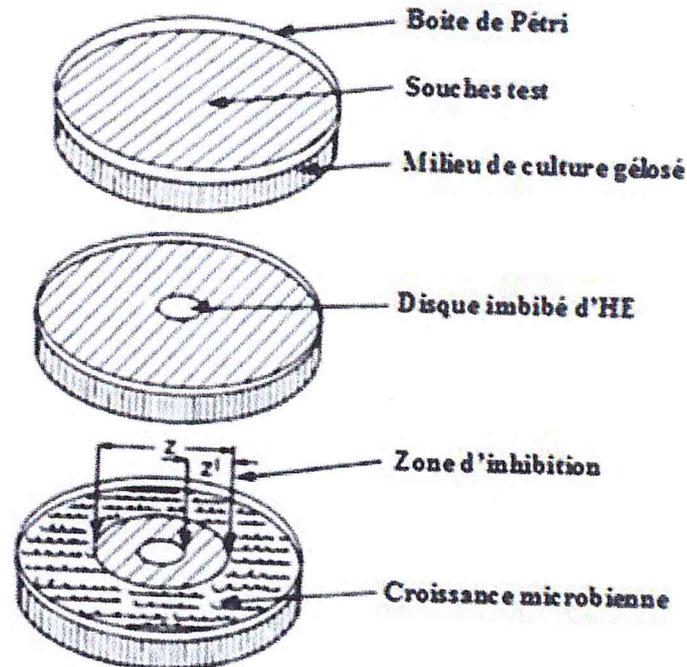


Figure 16: Principe de la méthode de diffusion par disque.

2.6.3.2. Protocole expérimental

➤ Préparation de l'inoculum

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

➤ Préparation des milieux de culture

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

➤ Préparation de la deuxième couche du milieu

- Remplir des flacons stériles avec 50 ml de Muller-Hinton pour les bactéries, et avec 50 ml de Sabouraud pour les levures, ceci pour chacune des souches.

- Ensemencer les milieux de culture avec 200 μ L de chaque suspension

- Transvaser rapidement 4 ml de chaque milieu inoculé en deuxième couche sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche de gélose.

- Etaler rapidement la seconde couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et laisser solidifier sur la paille.

➤ Dépôt des disques

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

2.6.3.3. Lecture

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du puits, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle [88].

D'après Ponce *et al.* (2003) [86-89], la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

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

La sensibilité des souches microbiennes a été testée vis-à-vis d'un antibiotique.

2.7. Etude de l'activité insecticide:

2.7.1 Méthode d'application de l'huile essentielle

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

2.7.1.1 Méthode d'application des huiles essentielles par fumigation sur les adultes de *Sitophilus oryzae*

La fumigation avec l'huile essentielle a été effectuée dans des boîtes en verre, hermétiques et transparentes, de capacité de 0,25L comme chambre d'exposition pour tester la toxicité de l'huile essentielle contre les adultes du *S. oryzae*. La charge d'huile essentielle est déposée sur une rondelle de papier filtre puis placée dans le couvercle qui est ensuite vissée sur le flacon. Chaque flacon contient 30 insectes, un témoin est réalisé dans les mêmes conditions avec une rondelle du papier filtre non chargée. Le contrôle de mortalité s'est fait par dénombrement

d'insectes morts chaque 1h du premier jour de traitement jusqu'à la mort de tous les individus sans ouvrir les flacons.



Figure 17 : Boite pour l'application insecticide

2.7.1.2 Correction de la mortalité

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

$$Mc \% = \frac{M - Mt}{100 - Mt}$$

Mc : le pourcentage de mortalité corrigé.

M : le pourcentage de morts dans la population traitée.

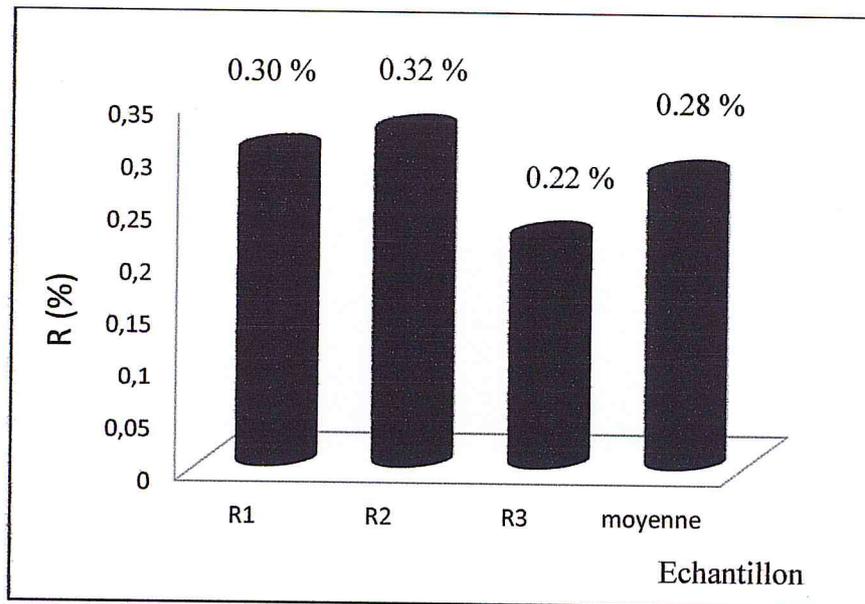
Mt : le pourcentage de morts dans la population témoin

Partie
Résultats et Discussions

1. Extraction de L'huile essentielle

1.1. Rendement en huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle, qui est calculé en fonction de la masse du matériel végétal sèche, pour l'espèce *Lippia citriodora* est représenté dans la figure suivante :



Graphique N° 1 : Représentation des différents rendements en huile essentielle de *Lippia citriodora*.

L'extraction de l'HE de *Lippia citriodora* effectué par l'hydrodistillation de type Clevenger a fourni un rendement moyen de 0.28%.

Notre rendement en huile essentielle est comparable à celui de *Lippia citriodora* provenant de la région de Kabylie (Algérie) 0.29% [13], et de nord de l'Algérie (Blida) 0.36 % [14], mais faible comparativement à celui de *Lippia citriodora* provenant de l'Argentine 3.8 % [90].

Les feuilles de *Lippia citriodora* ont montré un rendement moyen de 0,28 % valeur bien inférieure à celle trouvée par (Agah et Najafian, 2012) [91], à partir des feuilles de *Lippia citriodora* distillées à shirazen Iran et qui est de 1,03 %.

Des autres travaux ont été réalisés par Adilson et al. (2004) [92], et Gomes et al. (2006) [93] sur *Lippia citriodora* qu'ont trouvé de 0.22 % et 1.2 % respectivement.

1.2. Caractérisation de L'huile essentielle de *Lippia citriodora*

1.2.1. Détermination des caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* obtenue par hydro distillation sont représentées dans le tableau 5.

D'après le tableau 5, l'huile essentielle de *Lippia citriodora*. Présent un aspect liquide, limpide, jaune foncé et elle est caractérisée par une forte odeur citronnée.

Tableau N°5 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

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

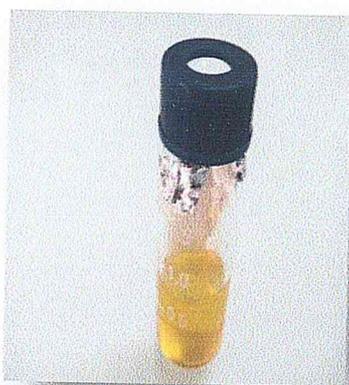


Figure 18 : L'huile essentielle de *Lippia citriodora*

1.2.2. Détermination des Indices physiques

Les résultats des analyses physiques sont regroupés dans le tableau 6.

Tableau N° 6 : Caractéristiques physiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

Caractéristiques physiques	d^{20}	η_D^{20}	$[\alpha]_D^{20}$
Valeurs	0.902	1.491	-21.6
Normes AFNOR	0.890-0.920	1.475-1.495	-22 à 12

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

1.3. Caractérisation de L'huile essentielle de *Lippia citriodora* par IRTF

La figure 19 représente le Spectre d'absorption IRTF de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

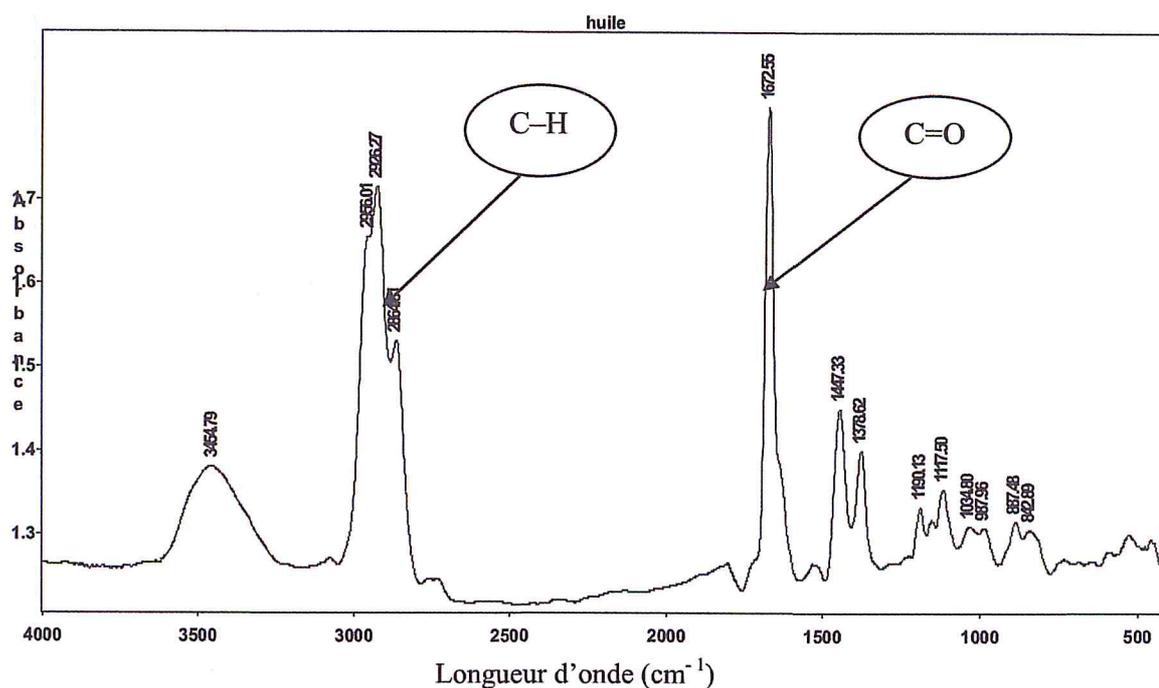


Figure19 : Spectre IRTF de l'HE de *Lippia citriodora*.

Le spectre IRTF de l'HE de *Lippia citriodora* est caractérisé par deux pics situés à 2956 cm^{-1} et 2926 cm^{-1} responsable de la vibration de la liaison C-H relatif aux groupements $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$, suivi d'une bande moins prononcée vers 2864 cm^{-1} du groupement ($-\text{C}-\text{H}$), un faible pic est localisé à 3050 cm^{-1} montre la présence d'une double liaison alcène dans l'huile. Un autre pic localisé à 3454 cm^{-1} spécifique à la vibration du groupement O-H d'un alcool, un pic de forte intensité, très pointue correspondant à l'absorption du groupement carbonyle (C=O) présent dans les aldéhydes est située à 1672 cm^{-1} .

2. Résultat de la Thionation

2.1. Thionation de L'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Aspect : liquide orange.

2.1.1. Caractérisation par CCM

La chromatographie sur couche mince des huiles essentielles (native et modifiée) de *Lippia citriodora* après révélation sous UV est représentée ci-dessous :

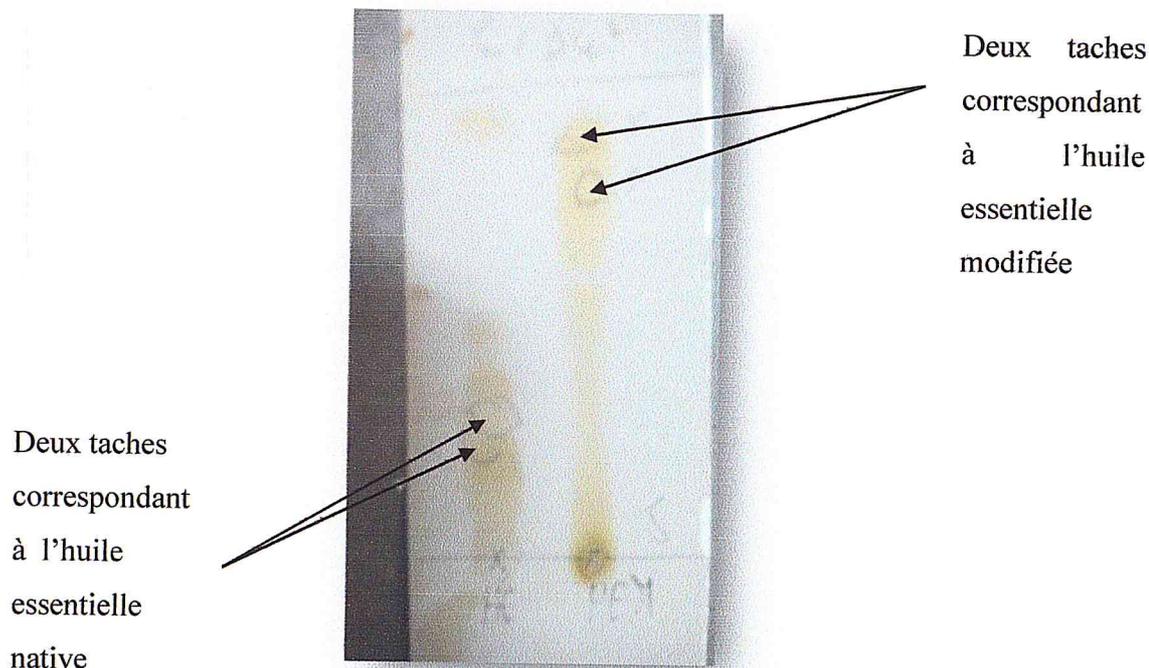


Figure 20 : La chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

Les résultats obtenus de la chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle (native et modifiée) de *Lippia citriodora* sont représentés dans le tableau 7.

Tableau N°7 : Résultats de la chromatographie sur couche mince de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

Huile étudiée	Système de solvant v /v (ml)	N° de spot	Rf
HE	Hexane/Acétate d'éthyle (9.5/0.5)	1	0.31
		2	0.25
HEM		1	0.89
		2	0.81

On a suivie la cinétique de la réaction de thionation de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*. Après 1 heure, on a observé la disparition des deux taches correspondant à l'huile essentielle et l'apparition de nouvelles deux taches responsables à la formation de thiocarbonyle C=S, Cela montre la fin de la réaction chimique.

2.1.2. Caractérisation de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* modifiée par IRTF

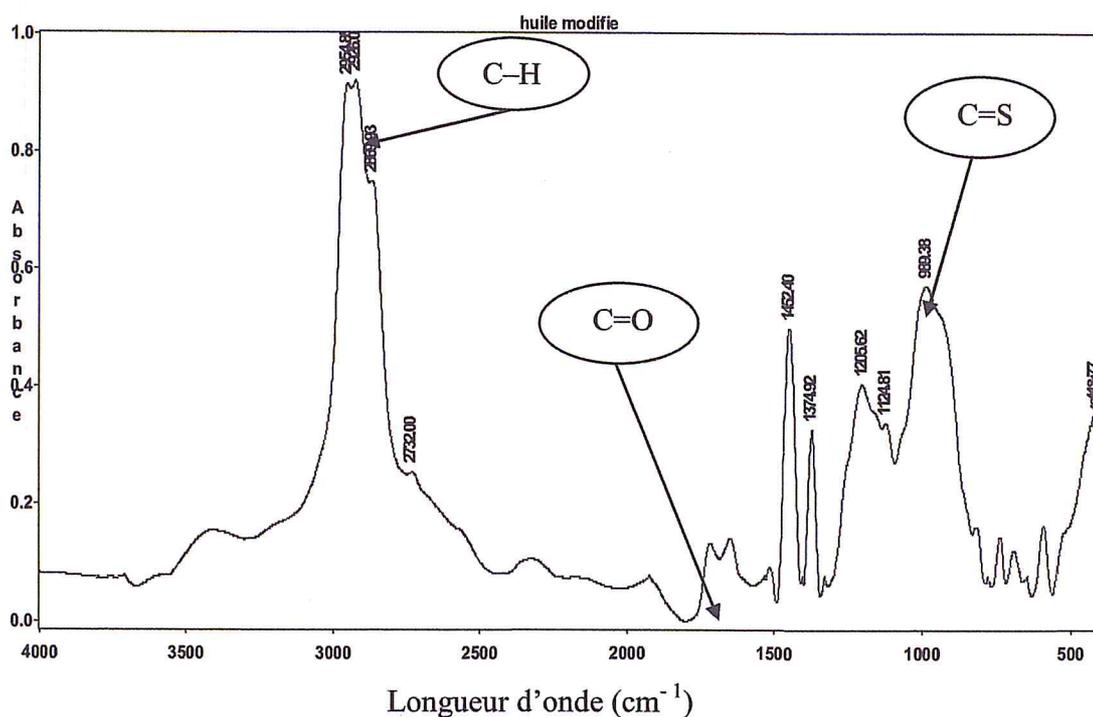


Figure 21: Spectre IRTF de l'HE de *Lippia citriodora* modifiée.

Sur le spectre IRTF de l'HE de *Lippia citriodora* modifiée, on observe respectivement les mêmes bandes de l'HE de *Lippia citriodora* native (figure19), on remarque l'apparition d'un nouveau pic à 989 cm^{-1} après thionation, ce dernier correspond à l'absorption du groupement C=S, cette bande est absente sur le spectre de l'HE *Lippia citriodora*, par conséquent on observe la disparition presque totale du pic responsable de la vibration de la fonction C=O situé à 1672 cm^{-1} .

2.1.3. Caractérisation de l'HE de *Lippia citriodora* native et modifiée par UV-visible

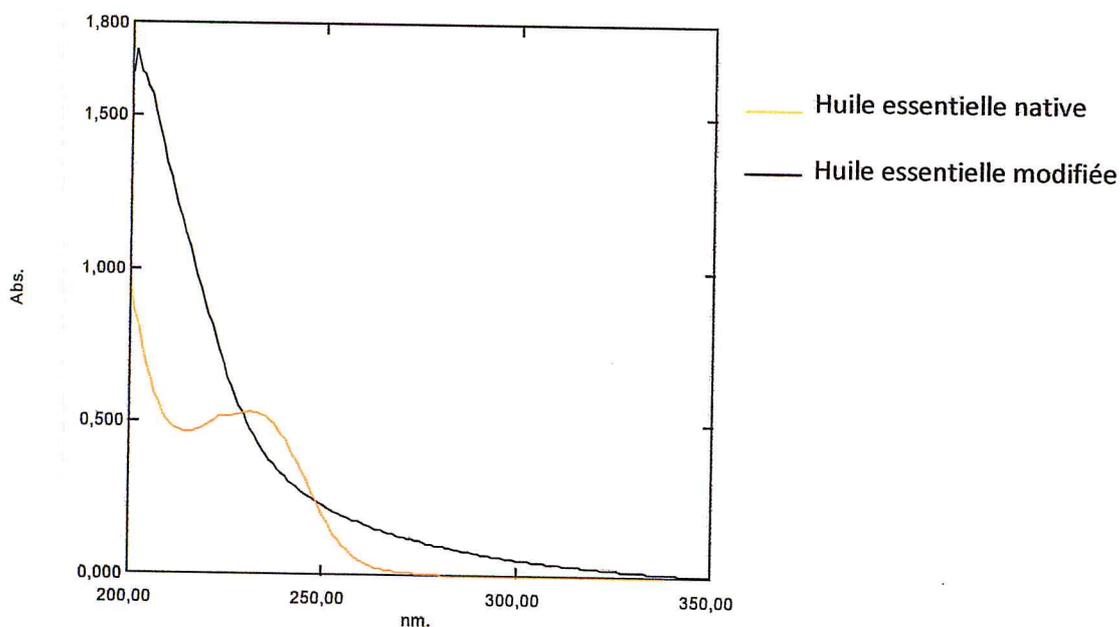


Figure 22 : Spectre UV-visible de l'HE de *Lippia citriodora* native et modifiée.

Le spectre UV-visible de l'HE de *Lippia citriodora* montre la présence de deux bandes situées à 232 nm et 223 nm.

La 1^{ère} bande localisée à 232 nm est attribuée à la fonction carbonyle C=O d'un Aldéhyde caractéristique à la transition électronique $n \rightarrow \pi^*$. Cependant la 2^{ème} bande possédant une longueur d'onde à 223 nm est spécifique à la transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ de la double liaison des terpènes. Par contre le spectre UV-visible de l'HE modifiée ne possède aucune bande d'absorption dans les zones de l'HE native, mais l'HE modifiée présente un déplacement ipsochrome caractérisé à la présence de plusieurs transitions électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ relatives aux nouvelles molécules et à la tautomérie.

2.1.4. Etude analytique de l'huile essentielle de l'espèce *Lippia citriodora* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

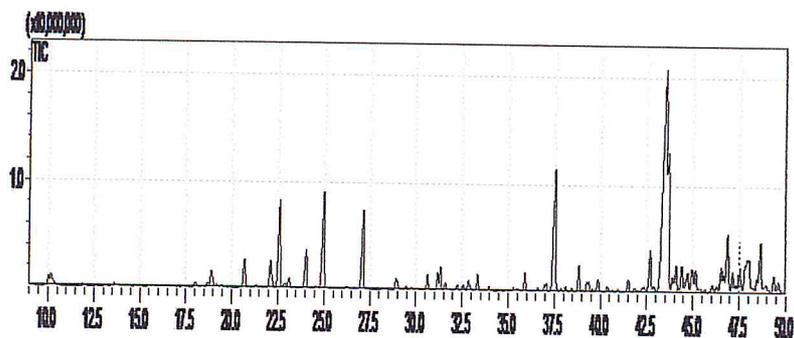


Figure 23 : Chromatogramme de l'HE de *Lippia citriodora* modifiée

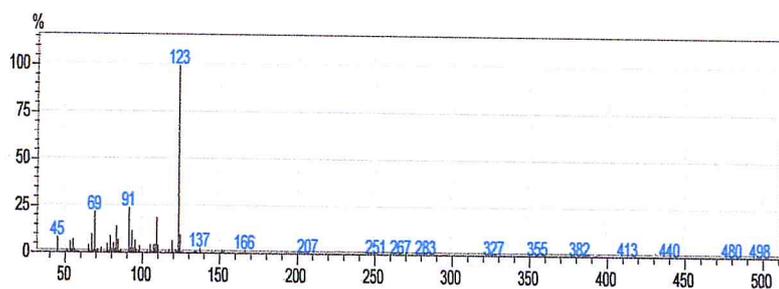


Figure 24 : Spectre de masse de (1E,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7-tétra éne-1-thiol.

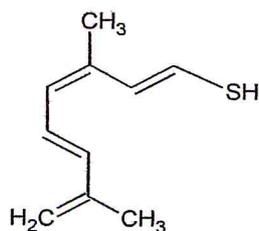


Figure 25 : Structure de (1E,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7-tétra éne-1-thiol.

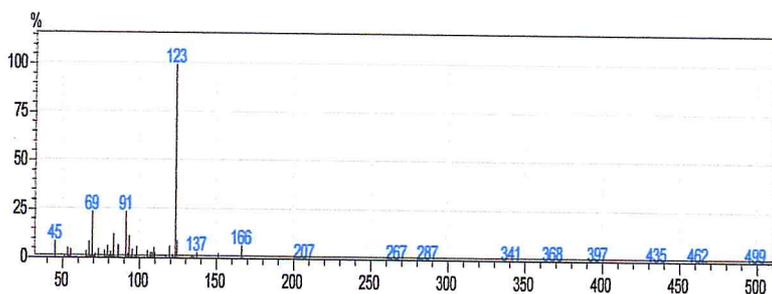


Figure 26 : Spectre de masse de (1Z,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7-tétra éne-1-thiol

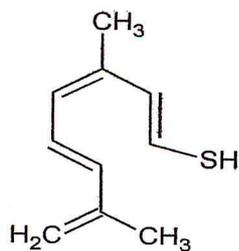
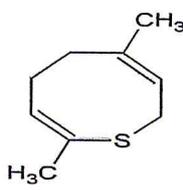
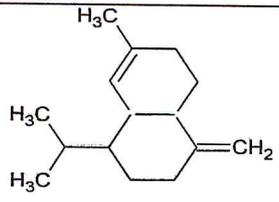
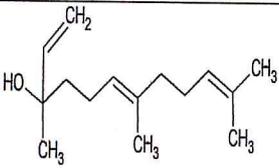
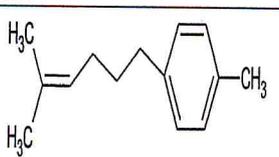
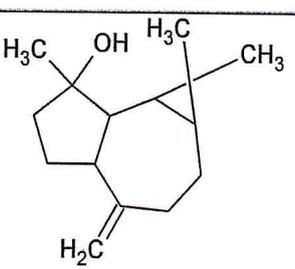
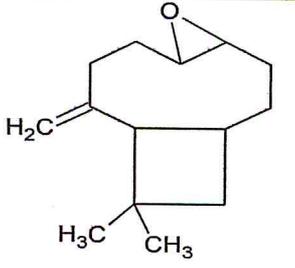
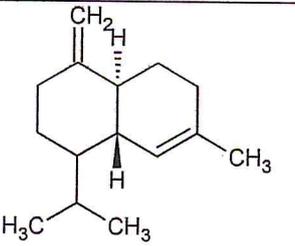


Figure 27 : Structure de (1Z,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7-tetra éne-1-thiol

L'analyse par GC-MS dans les conditions citées auparavant a permis l'identification des composés regroupés dans le tableau 8.

Tableau N° 8 : Composition chimique de l'HE modifiée de *Lippia citriodora*.

Composés	Structure	Tr	Teneur
1,8-cinéol		10.18	1.3
Limonène		18.90	2.6
(1E,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7,tetra éne -1-thiol		20.67	4.14
(1Z,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7,tetra éne -1-thiol		22.59	3.10

(3z, 7z)-4,8-diméthyl-5,6-dihydro-2H-thiocine		24.99	10.36
δ - Muurololene		29.04	1.2
Nerolidol		31.24	2.5
Curcumene		37.53	12.95
Spathulenol		43.50	27.46
Caryophyllene oxide		43.66	15.18
δ - cadinene		46.85	6.73

La classification des composants identifiés est basée sur les groupements fonctionnels, les résultats chromatographique de l'HE modifiée montre la présence de (3z,7z)-4,8-diméthyl-5,6-dihydro-2H-thiocine (10.36%), de (1E,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7-tetra éne-1-thiol (4.14%), et de (1Z,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7-tetra éne-1-thiol (3.10%), nous constatons que la conversion n'été pas totale, par conséquence l'huile essentielle est majoritairement composés de Spathulenol (27.46%), de Caryophyllene oxide (15.18%), de curcumene (12.95 %), et de δ - cadinene (6.73%). Ils sont accompagnés d'autres composés tels que le limonène (2.6%) et le 1,8-cinéol (1.3%).

D'après l'étude effectuée sur *Lippia citriodora*, on peut conclure que les résultats obtenus de l'analyse GC-MS de notre huile essentielle sont accord avec la littérature [91] et [95]. Mais sont complètement différentes avec ceux obtenu à partir des espèces récoltées en Algérie (Kabylie) [13]. Ceci peut être dues à plusieurs paramètres qui influent la composition, tels que la partie étudiée, la période de la récolte, le sol...

3. Résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne

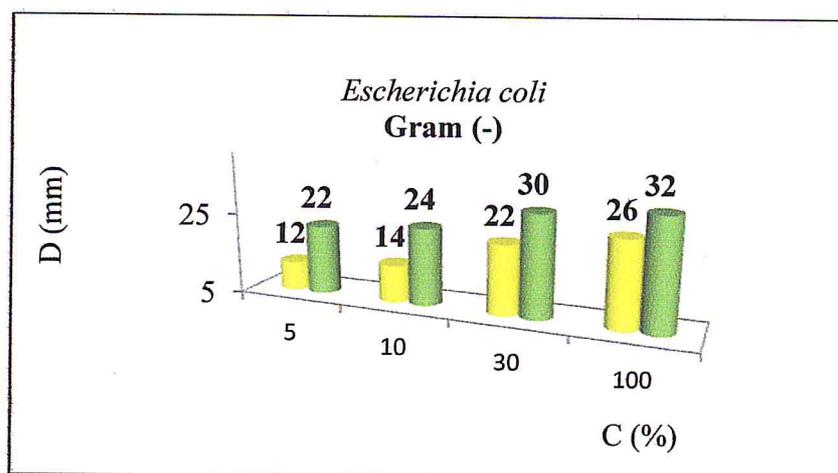
Nous avons testé l'huile essentielle avant et après modification chimique vis-à-vis des souches bactériennes et moisissures citées précédemment en appliquant la méthode de diffusion sur disque qui nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des huiles essentielles.

3.1. Détermination de l'activité antibactérienne

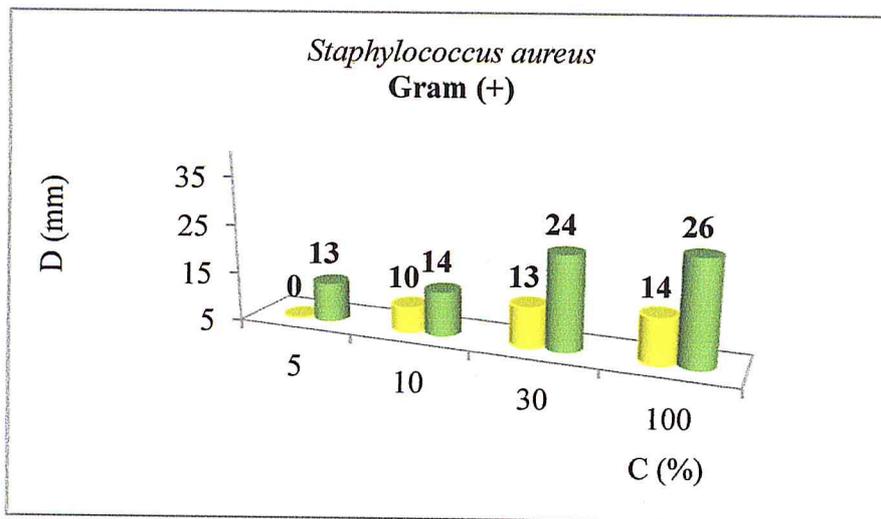
La détermination de l'activité antibactérienne se fait par la méthode de diffusion par disque (aromatogramme). Nous rapportons dans le tableau 9 les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles de *Lippia citriodora*, native puis modifiée.

Tableau N° 9 : Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) par la méthode de diffusion sur disque de l'HE native et modifiée à différentes concentrations.

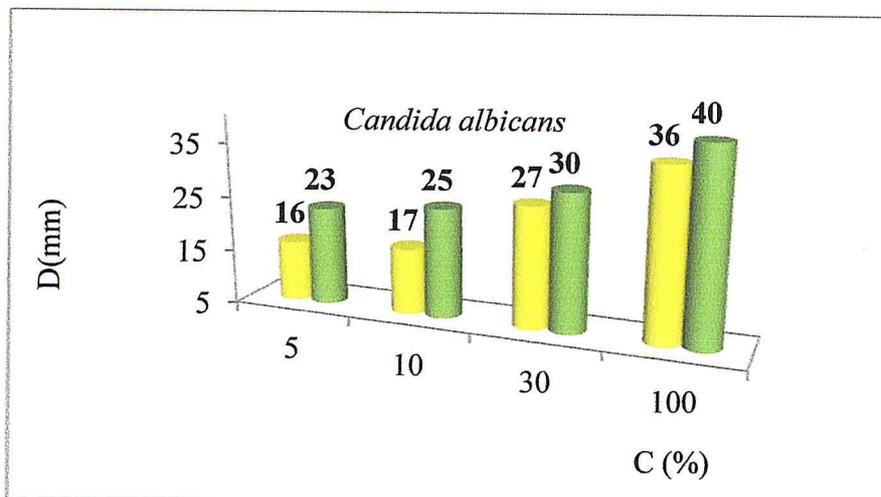
Souches microbiennes	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 G (-)		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 G (+)		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	
	HE	HEM	HE	HEM	HE	HEM
	Concentration del'huile essentielle de la verveine (%)					
5	12	22	-	13	16	23
10	14	24	10	14	17	25
30	22	30	13	24	27	30
100	26	32	14	26	36	40



Graphique N°2 : Activité antibactérienne de l'HE native et modifiée de *Lippia citriodora* sur la souche bactérienne *Escherichia coli*.



Graphique N°3 : Activité antibactérienne de l'HE native et modifiée de *Lippia citriodora* sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*



Graphique N°4 : Activité antifongique de l'HE native et modifiée de *Lippia citriodora* sur la souche fongique *Candida albicans*

Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle native de *Lippia citriodora* donne des zones d'inhibitions très importantes 14 et 26 mm avec les deux souches bactériennes.

La bactérie Gram⁻ (*Escherichia coli*) présente la plus grande activité avec une zone d'inhibition de 32 mm alors que la bactérie Gram⁺ présente une zone d'inhibition de 26 mm pour *Staphylococcus aureus*.

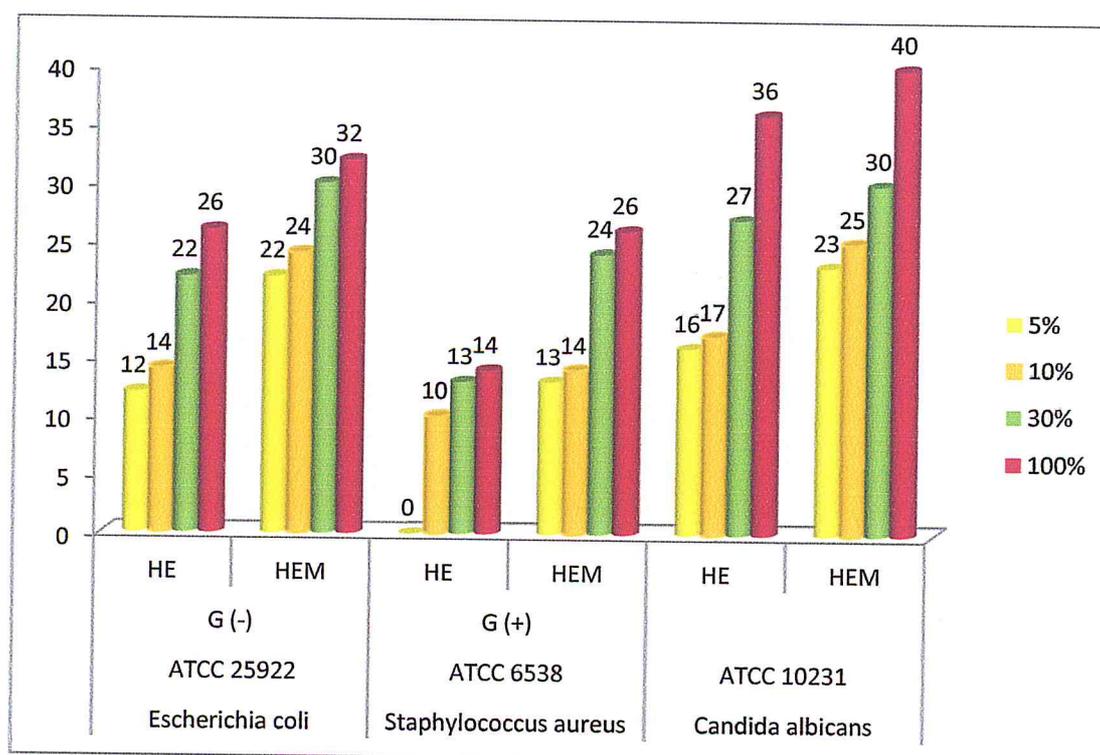
Les résultats obtenus pour la souche antifongique testée ont montré que la souche *Candida albicans* est extrêmement sensible pour l'HE native de *Lippia citriodora* avec une zone d'inhibition de 36mm.

La différence des diamètres d'inhibition pourrait être due principalement à la composition chimique de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* et l'activité antibactérienne de ces dernières pourrait principalement être due aux composés majoritaires : Citral (géraniol, néral) et limonène. D'après (Cushnie T *et al.* 2011) [94] il y a plusieurs paramètres peuvent influencer la détermination de l'activité antimicrobienne comme : le type des micro-organismes ciblés, la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, la concentration, le type de l'extrait et particulièrement la nature et la structure moléculaire des molécules bioactives des métabolites secondaires.

Pour l'HE modifiée de *Lippia citriodora*, le tableau 9 montre une activité fortement inhibitrice. Des diamètres d'inhibition plus élevés que l'HE native surtout pour les souches antifongiques.

L'HE modifiée de *Lippia citriodora* montre une activité extrêmement sensible vis-à-vis les deux souches bactériennes testées *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition de 32 mm et 26 mm.

Selon le tableau 9 l'HE modifiée de *Lippia citriodora* présente aussi une très forte activité antifongique vis-à-vis *Candida albicans* avec une zone d'inhibition de 40 mm. Donc dans ce cas l'HE modifiée est fortement inhibitrice.



Graphique N°5: Activité antibactérienne de l'HE native et modifiée de *Lippia citriodora*.

D'après les résultats obtenus dans le tableau 9, Il faut noter que tous les dérivés thioné testés ont montré des diamètres d'inhibition supérieure devant celle de l'huile essentielle native.

Nous remarquons que la souche antifongique *Candida albicans* est la plus sensible à toutes les huiles essentielles (native et modifiée) elle révèle des résultats assez modérés, les meilleurs zones d'inhibition sont observées pour l'huile essentielle modifiée de *Lippia citriodora*.

Les composés thionés possèdent une activité très intéressante surtout contre la souche antifongique *candidat albicans*, malgré le non solubilité totale du produit, il révèle des résultats assez modérés.

En conclusion, l'HE native et modifiée a réagit positivement sur toute les souches microbiennes testées ce qui confirme que l'HE native et modifiée de la plante *Lippia citriodora* est douée des propriétés antimicrobiennes.

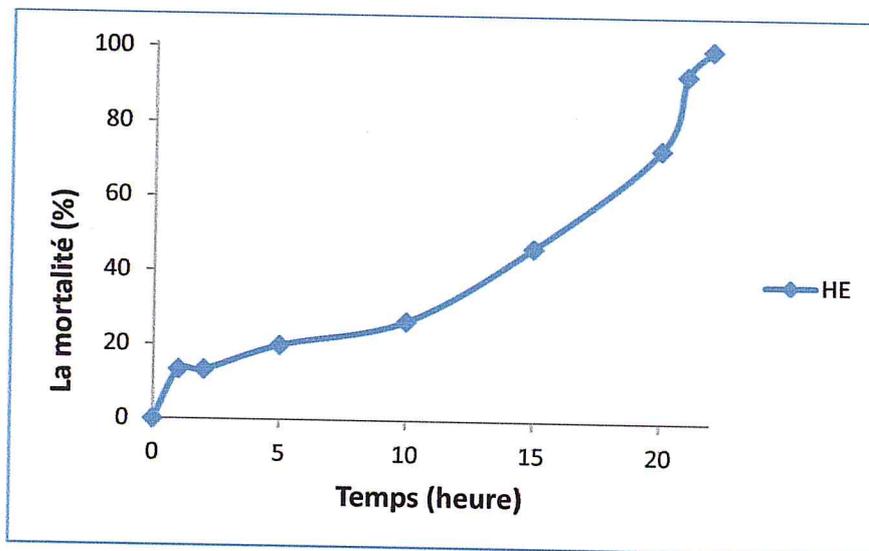
4. Résultats de l'évaluation de l'activité insecticide

L'application de l'huile essentielle (native et modifiée) de *Lippia citriodora* comme insecticide contre à donner les résultats suivants :

Tableau N° 10 : Le taux de mortalité des insectes traité par l'HE de *Lippia citriodora* native et modifiée.

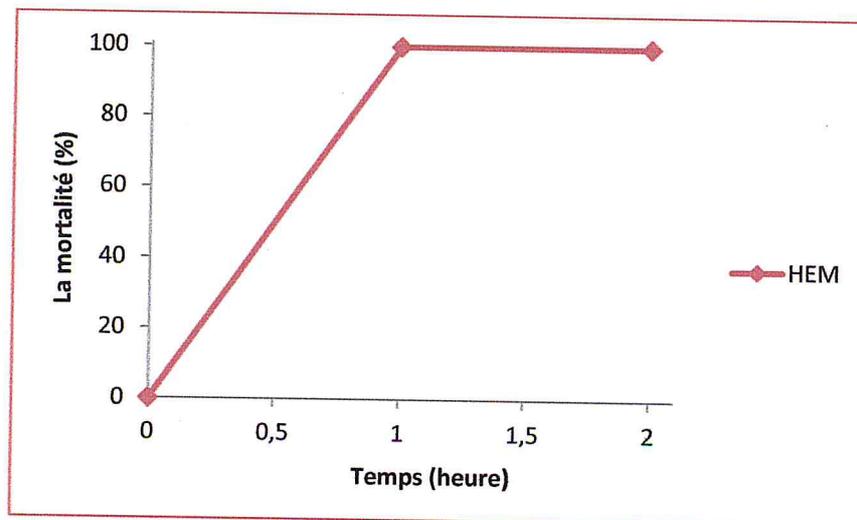
Temps (h)	1	2	5	10	15	20	21	22
La mortalité des Témoins%	0	0	0	0	0	0	0	0
La mortalité de l'HE %	13.33	13.33	20	26.27	46.66	73.33	93.33	100
La mortalité de l'HE M %	100	100	100	100	100	100	100	100

4.1. Huile essentielle de *Lippia citriodora* native



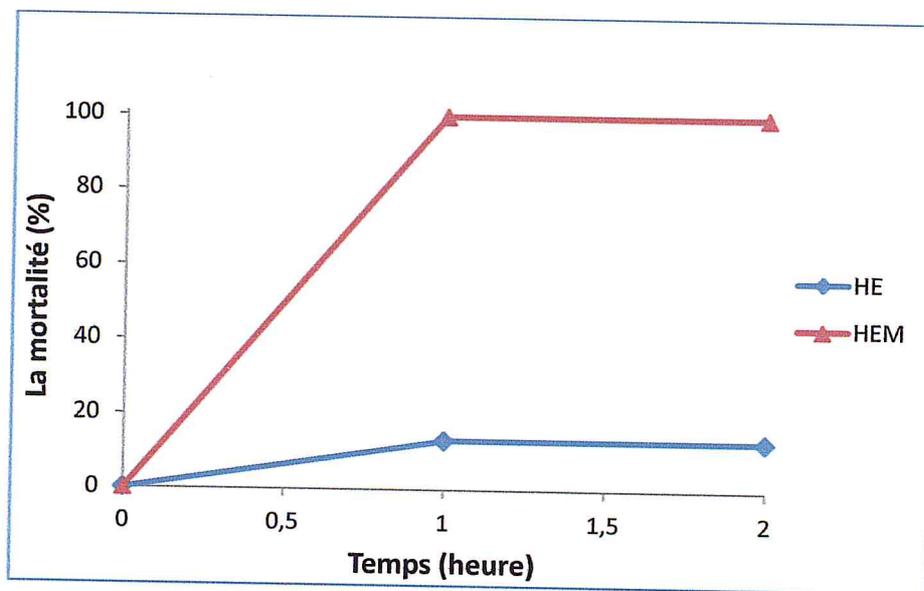
Graphique N°6 : Variation du taux de mortalité des insectes traité par l'HE de *Lippia citriodora* native en fonction du temps

4.2. Huile essentielle de *Lippia citriodora* modifiée



Graphique N°7 : Variation du taux de mortalité des insectes traité par l'HE de *Lippia citriodora* modifiée en fonction du temps.

4.3. Huile essentielle de *Lippia citriodora* native et modifiée



Graphique N°8 : Variation du taux de mortalité des insectes traité par l'HE de *Lippia citriodora* native et modifiée en fonction du temps.

L'ensemble des figures montrent l'action de l'HE de *Lippia citriodora* avant et après thionation vis-à-vis des charançons de blé.

La 1^{ère} courbe représente l'effet de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* contre la *Sitophilus oryzae* par fumigation, les *Sitophilus oryzae* ont été éliminés totalement après 22 h.

La 2^{ème} courbe montre que l'HE de *Lippia citriodora* modifiée manifeste une activité insecticide vis-à-vis la *Sitophilus oryzae* après 1h d'exposition avec un taux de mortalité de 100 %.

Les résultats consignés dans le tableau 10, montrent que l'HE de *Lippia citriodora* manifeste une activité insecticide vis-à-vis la *Stophilus oryzae* après 1h d'exposition avec un taux de mortalité de 13,33 %, par contre le taux de mortalité de l'HE modifiée après la même durée atteint son maximum 100 %.

Conclusion générale

Ce travail a été mené dans le cadre d'étudier la thionation de l'huile essentielle de l'espèce *Lippia citriodora*, plante médicinale et aromatique de la famille des Verbenaceae, endémique de l'Ouest de l'Algérie (récoltée à Khemis Miliana). Cette plante est utilisée dans la pharmacopée traditionnelle Algérienne pour le traitement d'asthme, des spasme, le froid, la fièvre, la flatulence, la colique, la diarrée, l'indigestion, l'insomnie et l'anxiété, et administrée exclusivement par voie orale (Tisane).

En premier lieu, nous avons procédé à l'extraction de l'huile essentielle à partir de la plante sèche par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. Cette opération a conduit à l'obtention de bon rendement moyen de 0.28 %.

Les résultats obtenus indiquent que le remplacement du groupe carbonyle par un autre thiocarbonyle par action du P_2S_5 sur les aldéhydes contenus dans l'huile essentielle de *Lippia citriodora* est responsable de nouvelles propriétés physiologiques et biologiques de cette huile essentielle.

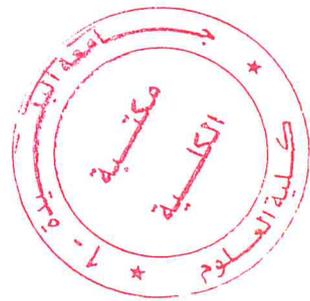
Les analyses IRTF montre la disparition de la bande C=O des aldéhydes aliphatiques et le remplacement de celle-ci par un groupe thiocarbonyle.

La même remarque est présente dans le spectre IRTF de *Lippia citriodora*, où les groupements carbonyles des aldéhydes sont remplacés par des nouveaux groupements thionés.

Ces résultats sont confirmés par l'analyse GC-MS où de nouveaux groupements thionés ont été identifiés (1E,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7-tétra éne-1-thiol, (1Z,3Z,5E)-3,7-diméthyl-octa-1,3,5,7-tétra éne-1-thiol et (3Z,7Z)-4,8-diméthyl-5,6-dihydro-2H-thiocine.

Ces modifications chimiques ont été confirmées par l'amélioration des activités microbiologique vis-à-vis des souches microbienne et fongique, et insecticide vis-à-vis de la souche *Sitophilus Oryzae*.

Référence bibliographique



- [1]. **Medi M., 2010.** « L'étude de l'influence des paramètres intrinsèques et extrinsèques sur le rendement et la composition de l'huile essentielle de *thymus vulgaris* ». Mémoire de magister.
- [2]. **Franchomme P., Jollois R., Penoel D., 2001.** L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles Editions Jollois.
- [3]. **J.-J. FILIPPI, X. Fernandez*, E. Duñach., (2007).** Les composés volatils soufrés en chimie des arômes, p.2.
- [4]. **Teuscher E., Lohstein A., Anton R., 2005.** Plantes aromatiques condiments et leurs huiles essentielles. Ed.Tec et Doc, p.522.
- [5]. **Bruneton J., 2009.** « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ».Paris, p.1269.
- [6]. **Perrot E., Paris R., 1974.** Les plantes médicinales presses universitaires de France, p. 244.
- [7]. **Cronquist A., 1981.** An integrated system of classification of flowering plants.columbia Univ.Press.New york, p.1262.
- [8]. **Fatima Bensabah., Abdeslam Lamiri., Jamal Naja., 2015.** Effect of purified waste water from the city of Settat (Morocco) on the quality of *lippia citriodora* essential oil and infusion. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences ; vol.14 ; pp.101-108.
- [9]. **Hanaa F.M Ali., Hossam S. El- Beltagi and N.F Nasr., 2008.** Assessment of volatile components, Free Radical – Scavenging capacity and Anti-Microbial Activity of Lemon Verbena Leaves.Research. Journal of phytochemistry ; vol.2 ; pp.84-92.
- [10]. **Mohammed Hudaib., Khaled Tawaha., Yasser Bustanji., 2013.** Chemical profile of the volatile oil of Lemon Verbena (*Aloysia citriodora* palau) Growing in Jordan ; vol.16 ; pp.568-574.
- [11]. **Mohammad Ghiath Naser Al-Deen., Rita Mansoor., Malak Al Joubbeh., 2015.** Fluctuations of chemical composition of essential oil and Antimicrobial of Lemon Verbena (*Lippia citriodora*) during growth stages in Syria ; vol.8(6); pp.704-710.
- [12]. **S.Kizil., O.Tonçer., 2016.** Essential oil and microelement composition of *Thymus citriodora* L and *Lippia citriodora* H.B.K ; vol.2 ; pp. 97-105.

- [13]. **Taleb Toudert K., Bellanteur K., Haddad N., Quazzoug T., Kellouche A., 2001.** Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de *Aloysia triphylla*. Evaluation in vitro de son effet sur la croissance de certains Agents pathogènes de l'Homme ; vol.70 ; pp.44-49.
- [14]. **Safia Zoubiri., Aoumeur Baaliouamer.** Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. Journal of Food chemistry ; vol.129 ; pp.179-182.
- [15]. **Ragone MI., Sella M., Conforti P., et al (2007).** The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora* Paláu (South American cedron) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. J Ethnopharmacol ; vol.113 ; pp.258-66.
- [16]. **Hellemont., J.V., (1986).** Compendium de phytothérapie. Service Scientifique de l'APB, Bruxelles, Belgium, p. 234-235.
- [17]. **Newal, C. A., Anderson, L. A., Phillipson, J. D., (1996).** Herbal medicines. A guide for health-care professionals. The pharmaceutical press, London, U.K., p.179.
- [18]. **Graça J. A. B., Henriques, J. M. L., Medina, G., Monteiro, L., Oliveira, L. C., Pereira, T.G., Ramilo, M. T., (1996).** Guia prático de remédios e tratamentos naturais. Selecções do Reader's Digest, Lisboa, Portugal, p. 150.
- [19]. **Wiart C., (2006).** Medicinal plants of Asia and the Pacific. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton (FL), p.279.
- [20]. **Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D. S., Villar, A., (2001).** Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology ; vol. 276 ; p.201-214.
- [21]. **Bruneton J., (2016).** Pharmacognosie- phytochimie- plantes médicinales, 5^{ème} éd. Tech & Doc/Lavoisier, Paris ; pp.848-860.
- [22]. **Rahaoui A., Zellou A., Faouzi My. A., et al (2007).** Effets sédatif et myorelaxant de l'extrait aqueux de *Verbena officinalis* L. Actes du congrès international des 22-24 mars, Mezraoua (Taounate) et Fès, Maroc: 345-8.
- [23]. **Bilia AR., Giomi M., Innocenti M., Gallori S., Vincieri FF., 2008.** HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol ; 46(3) ; pp.463- 470.
- [24]. **Figueiredo R.O., Stefanini M.B., Ming L.C., Maio Marques M.O & Facanali R., 2004.** Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton leaves cultivated in botucatu, Sao Paulo., Brazil. Acta Horticultura ; vol 629 ; pp.131-134.

- [25]. Kim j., Marshll M.R., 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, p.40.
- [26]. BURT S., 2004. -Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology* ; Vol.94 ; pp. 223-253.
- [27]. AFNOR., 2000 : Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323, P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles, p.66
- [28]. DURVELLE J.-P., 1930 : Fabrication des essences et des parfums. Ed. Desforges, Girardot et Cie, p.807.
- [29]. CHARABOT E., DUPONT J. & PILLET L., 1899. Les huiles essentielles et leurs principaux constituants, Ed. CH. Beranger, Paris.
- [30]. DELEVEAU P., Lorrain M., Mortier F., Rivolier C., Rivolier J., Sche Weitzer A.R., 1985. Secrets et vertus des plantes medicinales, Ed. Selection du Reader's Digest, Paris.
- [31]. BELAICHE P., 1979. L'aromatogramme, Traite de phytotherapie et d'aromatherapie, M.S.A.Editeur, Paris, Tome 1, p.204
- [32]. NYEGUE, M. A., (2005). Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de quelque plantes aromatiques et/ou médicinales du Cameroun : Evaluation de leurs activités antiradicalaires, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Thèse de doctorat en chimie organique, minérale, analytique et industrielle (p.184): Université des sciences et techniques de Languedoc, Montpellier.
- [33]. Bruneton, J., (1993). « Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales ». *Tec. & Doc.* Lavoisier, 2ème édition, Paris. P .915
- [34]. Bruneton J., (1999). « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales » (3ème édition). Paris. Ed. Techniques et documentations, Lavosier, p.575
- [35]. Brian, M., (1995). The isolation of aromatic materials from plant products. R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem(USA), p.57-148.
- [36]. Bocevska M., Sovova H., 2007. « The journal of supercritical fluids » ; Vol.40, pp.360 - 367.
- [37]. AFNOR, 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris, p. 57.

- [38]. Aghel N., Yamini Y., Hadjiakhoondi A. & Mahdi Pourmortasavi S., 2004. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium L.* essential oil. *Talanta* ; Vol. 62, p.407-411.
- [39]. Conner D.E; 1993. Naturally occurring compound: antimicrobials in foods. New York, Davidson In.P. & Branen A. L, p 468.
- [40]. Deba.F., Dang Xuan. T. Yasuda. M, Shinkichi. T; 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. *Food control* ; Vol. 19 ; Issue 4, p.346-352.
- [41]. Wilson R; 2002: Aromatherapy: Essential oils for vibrant health and beauty. Avery éd, New York, p.75-76.
- [42]. Aquino. R ; 2002 : Aromes méditerranéens pour la réalisation des lignes cosmétiques méditerranéenne, *Journal of Cosmetic Sciences*, p.53, 10-30.
- [43]. Heath H.B., 1981. *Source Book of Flavours*. Westport: Avi, pp.890.
- [44]. Boyle W., 1955. - Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review* ; Vol.66, pp.25-28.
- [45]. Burt S., 2004.- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology* ; Vol.94, pp. 223-253.
- [46]. Mohammad Ghiath Naser Al-Deen., Rita Mansoor., Malak Al joubbeh., 2015. Fluctuation of chemical composition of essential oil and Anti-microbial of lemon verbena (*Lippia citriodora*) during growth Stages in Syria ; Vol.8 ; No.6,pp.704-710.
- [47]. Ramzi A.A.Mothana., Salah A.A.Abdo., Sidgi Hasson.,Faisal M.N.Althawal.,Sama A.Z.Alaghbari and Ulrike Lindequist., 2010. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and phytochemical screening of some Yemeni Medicinal Plants ; Vol.7 ; No.3, pp. 323-330.
- [48]. Kumar NK., Kumar KS., Raman B., (2008). Antibacterial activity of *Lippia citriodora* a folklore plant. *J Pure Applied Microbiol* ; Vol.2 ; pp.249–52.
- [49]. Hanaa F.M Ali., Hossam S., El-Beltagi and N.F. Nasr., 2008. Assessment of Volatile components, Free Radical-Scavenging Capacity and Anti-Microbial Activity of Lemon Verbena leaves ; Vol.2, No2, pp.84-92.
- [50].GLITHO I.A., KETOH KG & KOUMAGLO H.K., 1997. - Effets de quelques huiles essentielles sur l'activité reproductrice de *Callosobruchus maculatus* Fab. *Annales de l'Université d'Ouagadougou Série B*, Vol. N° 5, pp. 174-185.

- [51]. GAKURU S & FOUA-BI K., 1995. - Effet comparé des huiles essentielles de quatre espèces végétales contre le bruché du niébé (*Callosobruchus maculatus* Fab.) et le charançon du riz (*Sitophilus oryzae* L). *Tropicultura* ; vol.13, N° 4, pp. 143-146.
- [52]. Veronica Benzil., Natalia Stefanazzi., Ana Paula Murray., Jorge O., Werdin Gronzalez., and Adriana Ferrero., 2014. Composition, Repellent, and Insecticidal Activities of Two South American Plants against the Stored Grain Pests *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera : Tenebrionidae), p.5
- [53]. Abbas Khani., Farzaneh Basavand and Ehsan Rakhshani., 2012. Chemical composition and insecticide activity of lemon verbena essential oil Vol. (4), pp. 313-320.
- [54]. E. Block. Reactions of organosulfur compounds, Academic Press : New York, 1978.
- [55]. R.J. Cremllyn, An introduction to organosulfur chemistry, John Wiley e sons : New York, 1996.
- [56]. Gupta R.R and Kumar M. (Heterocyclic Chemistry) tom, 1998, p.1.
- [57]. M. T. Molina, M. Yanez, O. Mo, R. Notario et J.-L. M. Abboud, The thiocarbonyl groupe, John Wiley e sons Ltd, coll...
- [58]. Laila H. WAZNEHSUR UNE NOUVELLE VOIE D'ACCES AUX DERIVES THIOCARBONYLES ET AUX OXYDES CORRESPONDANTS, 1987, P.791
- [59]. M. T. Molina, M. Yanez, O. Mo, R. Notario et J.L. M. Abboud., 1997. *The thiocarbonyl groupe*, John Wiley & Sons Ltd, coll. « The functional group chemistry / The chemistry of double-bonded functional group ».
- [60]. Henry, L. Ueber eine neue Bildungs-und Darstellungweise der Nitrile. *Ann. Chem. Pharm.* 1869; Vol.152, pp.148-152.
- [61]. Wislicenus, J. Vorlaufige Mittheilungen. *Z. Chem.* 1869 ; Vol.12, pp.324-326.
- [62]. T. Murai., Thio- Seleno, Telluro-Amides., *Top Curr Chem.*, 2005. Vol. 251, pp. 247–272.
- [63]. T.J Curphey, *J. Org. Chem.*, 2002 ; Vol.67, pp.6461.
- [64]. T.J Curphey *Tetrahedron Lett.*, 2002 Vol.43, pp. 371.
- [65]. THOMAS J., 2002. Curphey Thionation with the Reagent Combination of Phosphorus Pentasulfide and Hexamethyldisiloxane .

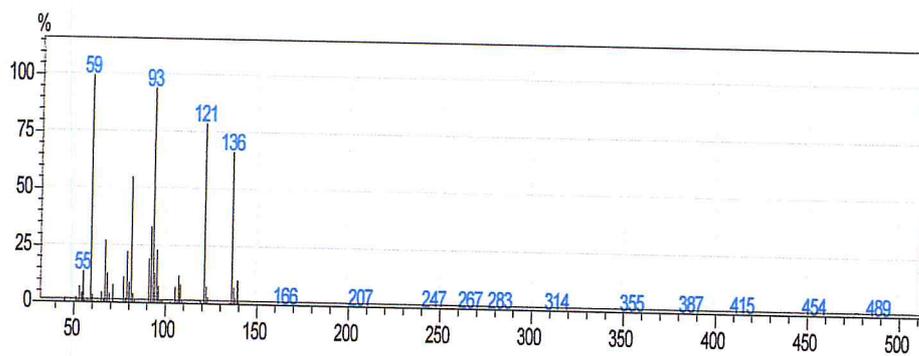
- [66]. **A. Sudalai, S. Kanagasabapathy., B.C. Benicewicz., Phosphorus Pentasulfide: A Mild and Versatile Catalyst/Reagent for the Preparation of Dithiocarboxylic Esters., Organic letters. Vol. 2, pp. 3213-3216, 2000.**
- [67]. **J. Bergman, B. Pettersson, V. Hasimbegovic, P.H. Svensson., Thionations using a P4S10-pyridine complex in solvents such as acetonitrile and dimethyl sulfone., Journal of Organic Chemistry. Vol. 76, pp. 1546-1553, 2011.**
- [68]. **Blass, B. E. Tetrahedron 2002, 58, 9301–9320.**
- [69]. **D. Braytonet., A novel heterocyclic atom exchange reaction with Lawesson's reagent: a one-pot synthesis of dithiomaltol., Chemical Communications. Vol. 251, pp. 206-208, 2006.**
- [70]. **C. Levinson ., Thionation reactions of Lawesson's reagents., Tetrahedron. Vol. 25, pp. 5061-5087, 1985.**
- [71]. **J. Li., Name Reactions: A Collection of Detailed Reaction Mechanisms., Springer, Heidelberg, 2006.**
- [72]. **Z. Kaleta., B.T. Makowski., T. Soós., R. Dembinski., Thionation Using Fluorous Lawesson's Reagent., Org. Lett. Vol. 8, pp. 1625–1628, 2006.**
- [73]. **Donald C. Dittmer, Eric S. Whitman, Addition of thiobenzophenone to benzendiazonium-2-carboxylate, J. Org. Chem. 1969, vol. 34(6), pp 2004-2006. DOI : 10.1021/jo01258a118 [archive].**
- [74]. **E. Airiau., Synthèse d'hétérocycles azotés par réaction multi-composantes et domino basées sur l'hydroformulation, Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, 2009.**
- [75]. **B.Pettersson., Synthetic studies towards 7-and 8-membered N-heterocycles, particularly 1,4- Pyrrolobenzodiazepines Total synthesis of Fuligocandin A and B, Karolinska Institute, Stockholm, 2011.**
- [76]. **C.B. Philip., Organosulfur chemistry. Springer, Heidelberg, 1999. J. Andraos., Named organic reagents., John Wiley & Sons, England, 2005.**
- [77]. **T.J. Curphey., Thionation with the Reagent Combination of Phosphorus Pentasulfide and Hexamethyldisiloxane., J. Org. Chem. Vol. 67, pp. 66, 2002.**

- [78]. **L. Dastychova et al.** Reactions of P_4S_{10} with N,N-diphenylurea and N,N-diphenylthiourea., Polyhedron. Vol. 26, pp. 4250–4256, 2007.
- [79]. **A.A. El-Barbary.**, Reaction of Esters, Ortho Esters, Acetals, Thioacetals and Epoxides with 2,4-Bis (4-methoxyphenyl)-1,3,2,4-dithiadiphosphetane 2,4-disulfide (Lawesson Reagent). Monatshefte für Chemie. Vol. 115, pp. 769-777, 1984.
- [80]. **Mojab F., Javidnia, Zarghi A., Yamouhammadi M.,**(2002).Essentiel oil of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). J Med Plant 4:45–41.
- [81]. **Manenzhe N.J., Potgieter N., Vanree T.,** (2004).Composition and antimicrobial activities of volatile compounds of *L. Javanica*. Phytochemistry 65:2333–6.
- [82]. **Afnor.**2000. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthode d'analyse. Tome I, paris, 93.
- [83]. **Elenkova N,** 1983. Chimie analytique et méthodes physiques d'analyse. Ed.Technika sofia. Bulgarie.,Evaluation protocols : foods quality or health effects. Food Research and Technology, 219,123-128.
- [84]. **Afnor,** 1982.Association Française de normalisation, détermination physico-chimiques des huiles essentielles, pp.45-60.
- [85]. **Pharmacopée européenne.**2007. Direction de la qualité du médicament du conseil d'Europe (DEQM), tome1, sixième édition, Série des traités européens N° 50, Strasbourg France.
- [86]. **Djemoui Djamilia,** 2012. Contribution a l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées, Mémoire Master Académique, Université Kasdi Merbah Ouargla.
- [87]. **Fauchère J.-L., Avril J.-L.,** Bactériologie générale et médicale, Ed. Ellipses, 365 pages, (2002).
- [88]. **Ponce AG,Fritz R, dell Valle C, Roura SI.** 2003. Antimicrobial Activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Society of foof Sience and Technology, 36(7), 679-684.
- [89]. **BABA IASSA F.,** 1999. Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ; Ed : LIBRAIRIE MODERNE – ROUIBA ; p : 243 – 244.

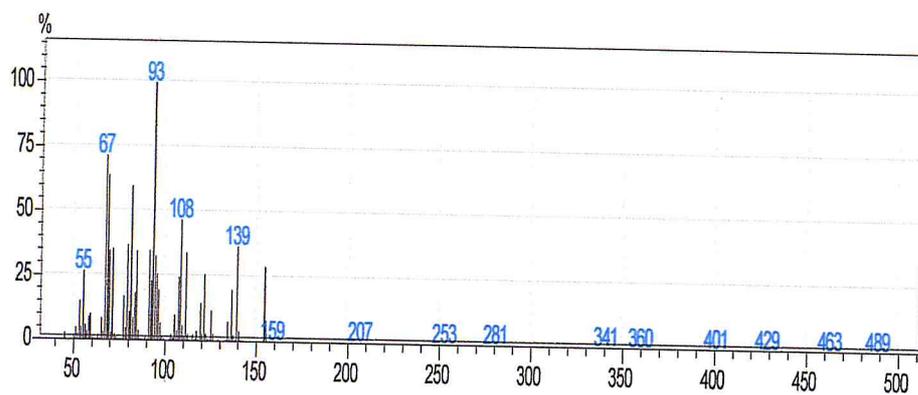
- [90]. **Claudia B Duschatzley., Mirta L Posseto., Laura B Talarico., Cybele C Garcia., Fabiana Michis., Norma V Almeida., Minina P de Lampasona., Carola Schiff and Elsa B Damonte., 2005.** Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South America plants *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*. Vol (16), p.247-251.
- [91]. **Agah M., Najafian S., 2012.** Essential oil content and composition of *Lippia citriodora* as affected by drying method in full flowering stages. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* ; Vol. 3, N° 2 ; p.371-377.
- [92]. **Adilson Sartoratto ; Analucia M ; Machado ; Camila Melarmelina ; Glyn Mara Figueira ; Marta Cristina T ; Durate Vera Lucia G Rehder., 2004.** Composition and antimicrobial Activity of Essential oils From Aromatic Plants Used in Brazil. *Brazilla. Journal of Microbiology*. Vol(35), pp 275-280.
- [93]. **Gomes, P.C.S ; Oliveira, H.R.C ; Vicente, A.M.S ; Ferreira. M.F., 2006.** Production, transformation and essential oils composition of leaves and stems of lemon verbena [*Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton]. *Crown in Portugal* : Vol 8,p.130-135.
- [94]. **Cushnie TPT et al. (2011).** Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* ; Vol.38, pp.99-107.
- [95]. **Meshkatalasadat M.H., Papzan A.H.& Abdollahi A., 2010.** Determination of bioactive volatile organic ultrasonic assisted with headspace solid phase microextraction coupled with GC-MS *Biostructure*. Vol.6(1), pp.319-323.

Annexe

Annexe 1 : Spectre de masse



Spectre de masse de Limonène.

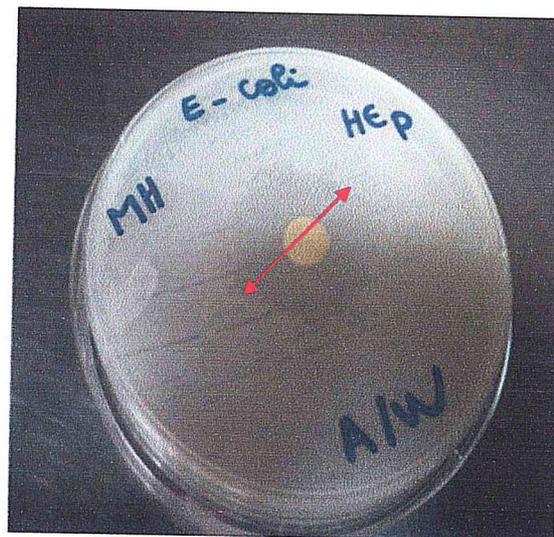


Spectre de masse de 1,8-cinéol.

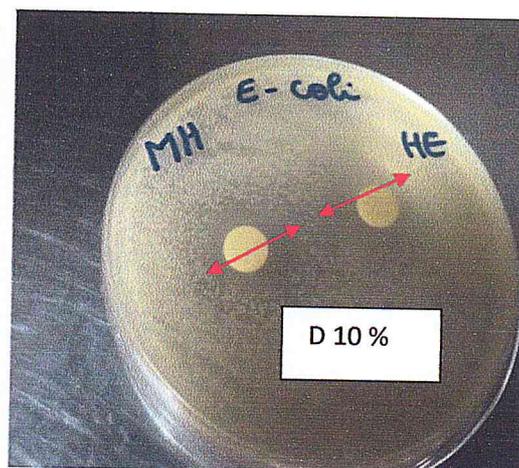
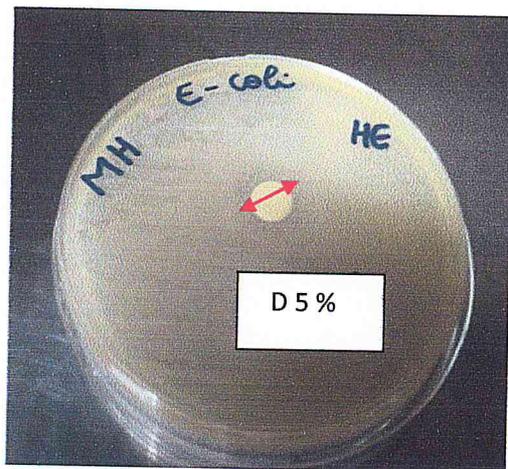
Annexe 2 : résultats des testes microbiologiques

Escherichia coli ATCC 25922

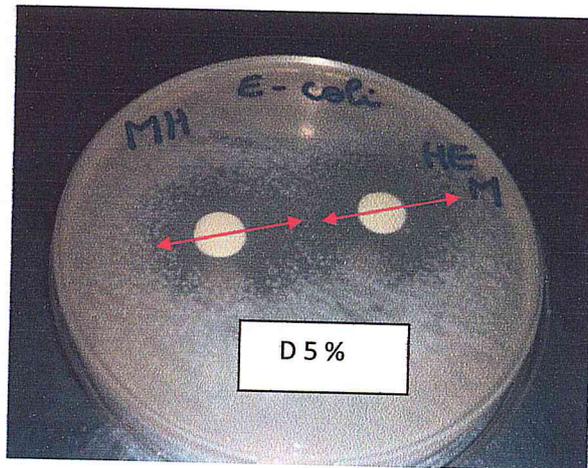
Verveine non modifiée 100 %



Verveine non modifiée avec des dilutions

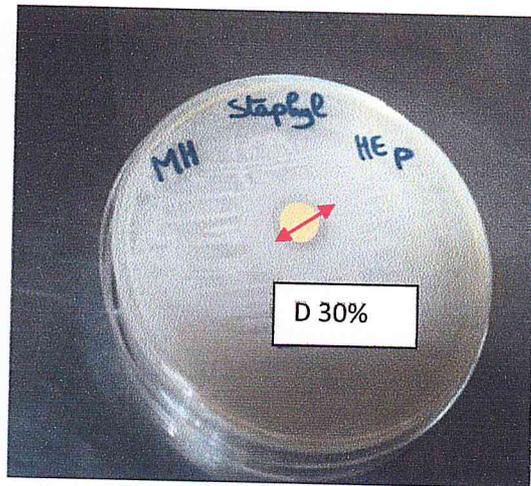
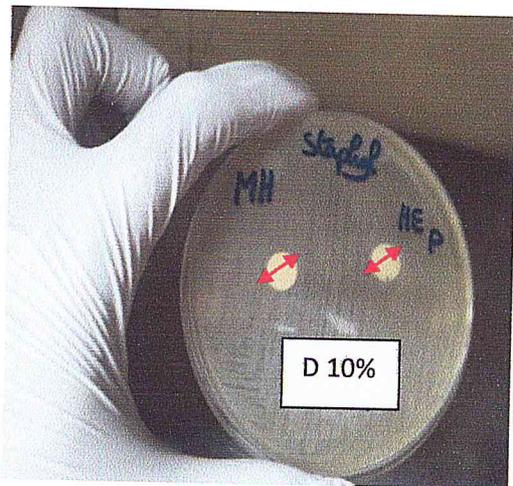


Verveine modifiée avec des dilutions

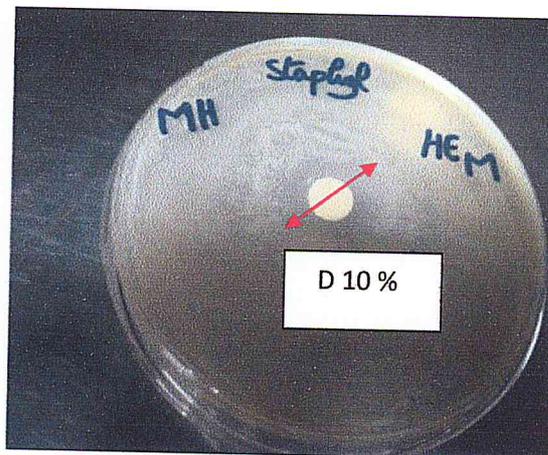
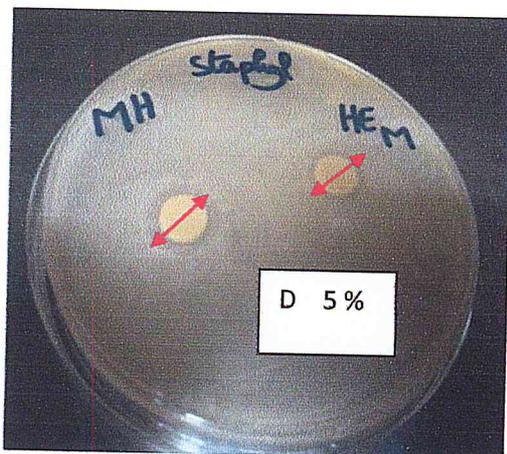


Staphylococcus aureus ATCC 6538

Verveine non modifiée avec des dilutions

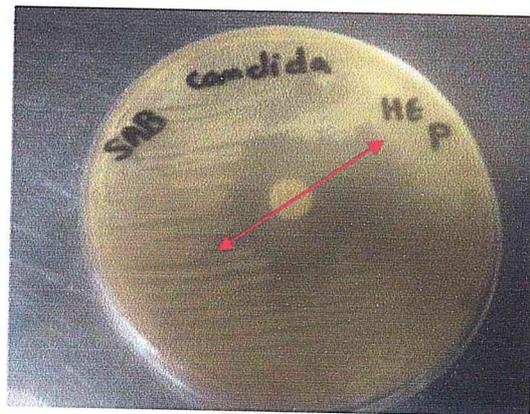


Verveine modifiée avec des dilutions

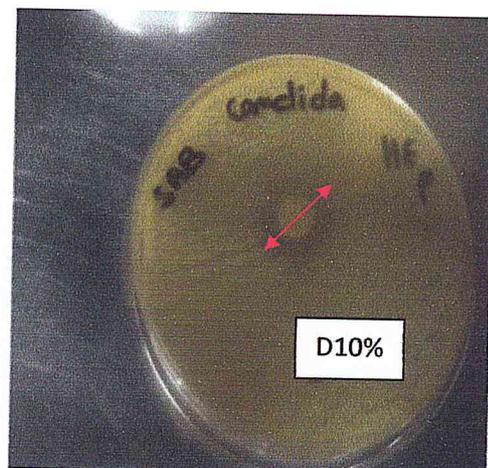
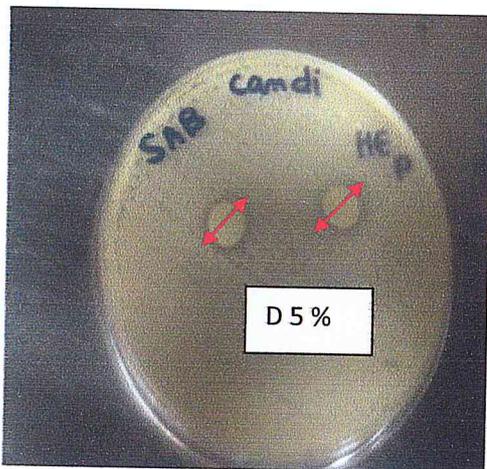


Candida albicans ATCC 10231

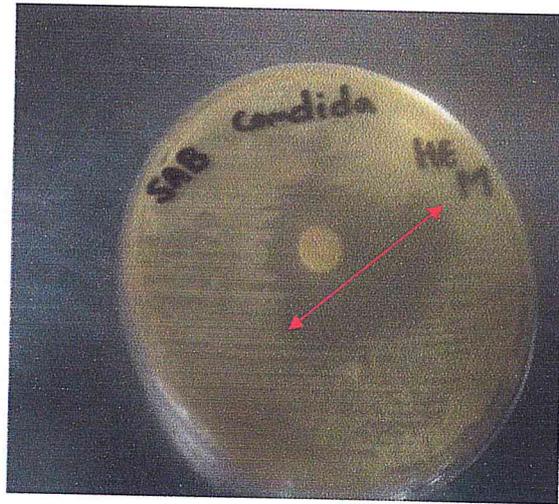
Verveine non modifiée 100%



Verveine non modifiée avec des dilutions



Verveine modifiée 100%



Verveine modifiée avec des dilutions

