

En choisissant le sujet sur les huiles essentielles, on s'intéresse au domaine de la parfumerie, de la santé et de la cosmétique, mais aussi a des domaines moins évidents tels que la biologie et la physiologie végétale. En effet à la base des huiles on trouve les plantes.

Les agrumes occupent une place de premier plan non seulement pour la production des fruits destinés à la table, mais aussi comme riche source de matières odorantes élaborées dans les diverses parties de la plante groupées en différentes association selon l'espèce et l'organe de provenance, pour donner naissance aux huiles essentielles.

La 8^{ème} édition de la pharmacopée française (1965) a défini une huile essentielle comme étant un produit de composition généralement assez complexe, renferment les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de l'extraction. Depuis la 9^{ème} édition en 1972, la pharmacopée n'utilise plus que le terme : huile essentielle [1]. En 1986, la norme AFNOR définit une huile essentielle comme étant l'extrait volatil obtenu par hydrodistillations ou par expression à froid de la plante [2,3].

On connaît plus de 200 sortes d'huiles essentielles elles sont généralement utilisées en cosmétiques, en pharmacie, en savonnerie, en industrie alimentaire [4] et en biologie (entomologie, microbiologie...) [5].

Parmi les différents moyens à disposition pour empêcher un développement microbien, on peut citer les huiles essentielles. Ces extraits de végétaux odorants sont l'objet de nombreuses recherches scientifiques dans le domaine médical et ils ont démontré leur efficacité pour le traitement de nombreuses pathologies. Au contraire de la grande majorité des agents antimicrobiens utilisés pour la désinfection de l'air, ces substances ne sont pas ou sont peu toxiques[6].

Par ailleurs, les plantes aromatiques productrices d'huiles essentielles, ont fait l'objet de diverses recherches en particulier dans le domaine de la parfumerie. Les travaux de J.Q. CU et col. [7], reprennent ceux de TEDDER et BRUNECHON

[8-9], où il apparaît clairement comment les molécules très volatiles sont synthétisées à partir d'unités 2-méthylbutadiène (isoprène). Les diverses combinaisons de ces unités, par réaction d'addition, conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, diterpènes, mais aussi à leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers, et esters terpéniques. L'ensemble de ces composés est produit dans les cellules sécrétrices, conférant à la plante une odeur caractéristique. Celle-ci peut alors être libérée de la plante et récupérée par diverses méthodes allant de l'enfleurage, pour les odeurs les plus délicates (fleur), à l'extraction à l'aide de solvants organiques [7].

Une gamme de produits à odeur plus ou moins prononcée selon la concentration en composés et en composés volatils recueillis, est alors obtenue. Les huiles essentielles produites par hydrodistillation, entraînement à la vapeur ou expression de l'écorce des fruits, sont les produits les plus concentrés en composés olfactifs [8].

Chacun de ces composés de part leur volatilité dégage une odeur propre. Ainsi certaines plantes peuvent avoir une odeur similaire due à une molécule commune présente en quantité notable dans l'huile essentielle. Dans ces conditions, une fois le ou les composés responsables d'une odeur identifiés, si le caractère olfactif de ces composés s'avère intéressant, il serait alors rentable, selon le contexte économique, de produire des espèces végétales susceptibles de fournir une huile essentielle à haute teneur moléculaire en composés recherchés, et donc généralement de meilleure qualité [8].

Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes: fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines. La synthèse est l'accumulation des huiles essentielles, classées parmi les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante [10].

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et infusions mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres.

Une relation entre la structure chimique et l'activité biologique est alors tentante, aussi la production de molécules naturelles pourrait entrer dans la composition de médicaments moins agressifs vis-à-vis de l'organisme. [11].

Parmi les composants majoritaires des huiles essentielles, nous trouvons les terpenoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les insectes . Ils interviennent également , par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs [12].

Une centaine d'entre elles sont d'un usage courant et une dizaine servent de matières premières pour d'importantes synthèses[13]. Cependant, la diversité des HE et leurs domaines d'utilisation exacts, étaient respectivement limités et inconnus.

Les H.E extraites à partir de plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité par leurs propriétés biologiques, antibactériennes, antifongiques [14-19]

et cosmétiques [20]. Par la présence de leurs nombreux constituants oxygénés (cétones, aldéhydes, alcools, phénols, ester etc...), les H.E manifestent d'une façon générale des propriétés pharmaceutiques :elles sont soit antiseptiques, soit digestives, stimulantes ou excitantes antispasmodiques ou neuro-sédatives[21].

Les odeurs que dégagent les plantes sont généralement appréciées de tous. L'on a qu'à penser à la rose et on comprend tout de suite. À l'époque médiévale, les différentes odeurs des herbes ont été déterminantes quant à l'utilisation que les gens en faisaient. Ainsi, lorsqu'une plante était reconnue pour éloigner les insectes ils supposaient qu'elle devait être bonne pour éloigner les insectes à l'intérieur de la maison. À cette époque, les gens se doutaient que les insectes pouvaient transporter des maladies, souvent très graves. Ou encore certaines herbes étaient utilisées pour purifier l'air ambiant que l'on croyait capable de transmettre certaines maladies. Elles avaient pour objet de protéger les souverains et leurs familles de maladies, comme la peste.

Les huiles essentielles contenues dans les herbes aromatiques sont responsables des différentes senteurs que dégagent les plantes. Elles sont très utilisées dans l'industrie des cosmétiques, de la parfumerie et aussi de l'aromathérapie. Cette dernière se veut une technique thérapeutique par le massage, les inhalations ou les bains tout en utilisant les huiles essentielles des plantes.

C'est au Moyen Orient ainsi qu'en Extrême Orient que les huiles essentielles ont d'abord été utilisées. La médecine Ayurveda originaire de l'Inde en fait un usage important. C'est en Arabie que les techniques de distillation ont commencé et qu'elles ont aussi été perfectionnées. Il semble que les méthodes d'extraction par vapeur sont encore les meilleurs procédés pour conserver les parfums des plantes aromatiques et leurs capacités thérapeutiques. Il semble que ce sont les gens qui participaient aux croisades qui ont rapportées ces techniques en Occident, voici maintenant plusieurs siècles.

Le terme aromathérapie vient du professeur français René-Maurice Gattefosse, chimiste, qui a utilisé l'huile essentielle de lavande pendant la Première Guerre Mondiale pour soigner des blessures et les infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque [22]..

Il semble que les huiles essentielles sont transportées par le système circulatoire dans tous les organes du corps humain, pour ensuite se diriger vers les systèmes d'élimination, le processus prenant de 30 minutes à 12 heures. Une expérience à faire est de se frotter le dessous d'un pied avec une tranche d'ail et de sentir son haleine quelques heures après. (Je dois avouer que je ne l'ai pas encore essayé, mais il semble que s'est concluant.)

Les huiles essentielles sont la plupart du temps appliquées par massage mais elles sont aussi prises par inhalation ou encore en prenant un bain. Généralement, elles ne doivent pas être prises par voie interne (par la bouche) car elles peuvent être toxiques.

L'extraction semble assez complexe et coûteuse d'où le prix élevé des huiles essentielles. La plupart des huiles sont produites par distillation ou par enfleurage

(méthode par contact avec une matière grasse). Une grande quantité de plantes est nécessaire pour extraire une quantité infime d'huile. Par exemple, ça prend environ 115 kg de pétales de rose pour produire 25 ml d'huile essentielle de rose [23]..

Si de nos jours quelques centaines de plantes aromatiques, parmi d'innombrables espèces recensées dans la nature, sont exploitées à l'échelle commerciale, c'est en partie parce que les facteurs agronomiques, climatiques, botaniques et olfactifs sont limitatifs mais d'autres critères sont aussi à prendre en compte.

En chimie alimentaire, elles ont de multiple application : boissons , conserves confiseries, glaces, produits laitiers et les industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des HE) comme matière première pour la synthèse de principes actifs médicamenteux , de vitamines , de substances odorantes ...etc.[24-25] Plus délicates encore sont les modifications apportées par les chémotypes ou formes physiologiques une même variété et celles dues aux modifications génétiques Une race chimique nouvelle peut apparaître par mutation cette mutation peut être à peine perceptible de provoquer des modifications profondes dans la composition de l'H.E.

La prise de conscience par les chercheurs et les industriels de l'importance de ce champ d'investigation s'affirme chaque jour d'avantage .Par exemple, connaître le ou les responsables de la saveur caractéristique d'une plante ou d'un fruit est une des raisons de l'étude qualitative et quantitative des HE.

L'analyse poussée d'une HE permet d'identifier à côté des constituants majeurs déjà connus bien d'autres qui apportent leurs contributions à la formation du bouquet spécifique même s'ils existent en très petites proportions.

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à l'extraction de six huiles essentielles à l'échelle du laboratoire ainsi qu'à d'autres commerciale dans le but d'une comparaison (essence de ; citron, lavandin et la menthe) . Elles sont parmi les essences les plus utilisées pour leur propriété biologique, antibactérienne, antifongique et cosmétique.

De ce fait SAIDAL les utilisent pour la préparation de certains produits pharmaceutiques par exemple dans les pommades.

ORIGINE ET PRESENTATION BOTANIQUES

Parmi les plantes à parfum à caractère industriel, le citron, la menthe et le lavandin, camomille, marjoram et persil occupent une place de choix et leur huile essentielle est plus appréciée.

Ces essences sont à l'origine de nombreuses préparations, ainsi que pour leur propriétés odorantes sont mises à profit sous des formes très diverses [26]. A ces propriétés organoleptiques il faut rajouter aussi des propriétés pharmacologiques et thérapeutiques intéressantes.

Nous représentons dans le tableau -1- ; le nom botanique, la famille ainsi que la partie de la plante utilisée.

Tableau 1- La nomenclature botanique des plantes

Nom botanique des plantes	Famille	Partie de la plante utilisée
<i>Mentha piperita</i> (menthe)	<i>Lamiacée</i>	Partie aérienne (feuilles)
<i>Origanum majorana</i> (marjoram)	<i>Lamiacée</i>	Sommité fleurie
<i>Lavandula angustifolia</i> <i>Grosso</i> (lavandin)	<i>Lamiacée</i>	Fleur
<i>Petroselinum crispum .M</i> (persil)	<i>Apiacée</i>	Fruit
<i>Citrus limonum</i> (citron)	<i>Rutacée</i>	Péricarpe
<i>Matricaria Chamomilla</i> (Camomille)	<i>Asteracée</i>	Fleur

Les plantes ont été nommées par le Professeur botaniste Egyptien Sayed Faraj Khalifa Enseignant chercheur a l'Université Ain Chams. Egypt.

Cependant il est très délicat de définir une espèce botanique , car il existe de nombreux problèmes dans l'identification d'une espèce végétale [27,2]

- Multiples combinaisons génétiques.
- Hybridation interspécifiques.
- Influences géographiques et écologiques.

****Origanum majorana***

la marjolaine plante aromatique annuelle est cultivée dans les jardins ; plante vivace, elle pousse en touffes avec des tiges souvent carrées mais qui peuvent aussi être rondes, de couleur verte, marquée de rouge et velues. Les feuilles sont vert



foncé à grisâtre, les petites fleurs blanches et roses, réunies en bouquets, sont entourées de bractées vertes disposées en écailles. Son odeur rappelle le basilic ; sa saveur est dite âcre et amère. La marjolaine est connue et appréciée depuis l'Antiquité en Grèce où elle était considérée comme la plante favorite de la déesse Aphrodite qui en fit le symbole du bonheur.

Au Moyen-âge, elle était utilisée contre les spasmes, les névralgies. On utilise toujours la marjolaine pour ces nombreuses vertus:

- *Agit sur les douleurs rhumatismales et les règles douloureuses.
- *Calme les palpitations d'origine nerveuses et fait baisser la tension.
- *Efficace contre les rhinites allergiques, les sinusites.
- *Action calmante sur de nombreux troubles d'origine nerveuse : colites, spasmes intestinaux, céphalées, migraines. [28]

*** *Matricaria Chamomilla***

:La camomille est le nom vulgaire de la matricaire et de l'anthémis noble. C'est une plante vivace qui pousse en Europe sur tous les terrains et particulièrement les terrains secs. Elle est haute de 60 centimètres environ.

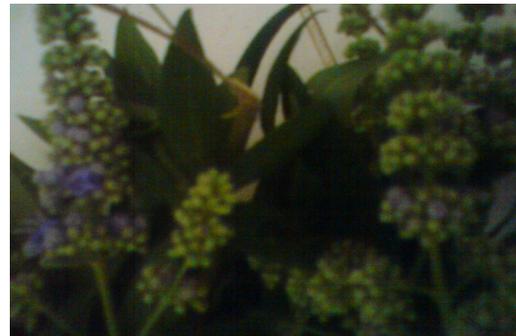


Sa fleur ressemble à une petite marguerite. On cueille les fleurs de camomille, de préférence aux 3/4 ouvertes, durant tout l'été, dans les champs et sur le bord des chemins.

La camomille a été très recherchée pour ses vertus médicinales depuis les temps les plus anciens. Les médecins du XVIIIe siècle tenaient la camomille pour un médicament très précieux contre les digestions difficiles et la prescrivait aussi comme fortifiant. On emploie encore de nos jours ses fleurs séchées, en tisane, pour lutter contre le manque de sommeil. [29]

****Lavandula angustifolia* Grosso**

Les usages de la lavande sont multiples : parfumerie, pharmacie, cosmétique, bouquets, miel... Il faut distinguer la lavande du lavandin. La lavande est une plante sauvage, qui pousse à partir de 600 mètres d'altitude. Le lavandin est un hybride créé par l'homme, un croisement entre l'aspic et la lavande. Il



pousse en basse altitude et est plus facile à exploiter. Son usage est essentiellement industriel : détergent, cosmétiques...

Recommandations : Angoisses, insomnies. Crampes, douleurs musculosquelettiques, arthrite, plaies, brûlures, prurit, ulcères variqueux.

Usages : Le lavandin est le résultat de l'hybridation de lavandes. Le lavandin est moins cher que la lavande. En friction ou en onction, on l'utilise sur les douleurs musculosquelettiques. Appliquer en compresse sur les plaies. [30]

*** *Citrus limonum* ou limon**

Arbuste à grosses feuilles persistantes vert-foncé, ovales, luisantes (sur le dessus) orné de fleurs blanches délicieusement parfumées (odeur de miel). La fleur donne un petit fruit vert sombre allongé qui grossit et devient vert de plus en plus pâle pour finir jaune vif ; pendant ce temps, l'écorce boursouflée et granuleuse devient de plus en plus lisse au fur et à mesure que le citron atteint sa maturité.



Grâce à son goût très puissant et à ses effets bénéfiques sur la digestion le citron a de multiples usages en cuisine : le jus frais est utilisé pour les assaisonnements, il peut remplacer avantageusement le vinaigre, on l'utilise sur le poisson, les salades, avec le yaourt, comme boisson rafraîchissante additionné d'eau et de sucre, pour la pâtisserie etc. Les écorces de citrons non traités, peuvent être confites, ou servir à confectionner de délicieuses confitures. Riche en vitamines, oligoéléments, sels minéraux, le citron serait très efficace contre les infections, les acidités gastriques, les rhumatismes, l'arthrite, les lésions de la peau. Désinfectant, anti-inflammatoire, antiseptique, vitaminique, antirhumatismal, astringent... [31]

Petroselinum crispum.M

Est une plante herbacée odorante de la famille des Apiacée, (Umbellifères) , couramment utilisée en cuisine pour ses feuilles très divisées. C'est généralement une plante médicinale . Une plante bisannuelle de 25 à 80 cm de haut, très aromatique au



froissement , à odeur caractéristique. Les tiges, striées, et les feuilles sont glabres. Les feuilles vert luisant, sont doublement divisées surtout celle de la base, les feuilles supérieures ayant souvent seulement trois lobes étroits et allongés.

Les fleurs, d'une couleur jaune verdâtre tirant sur le blanc en pleine floraison, sont groupées en ombelles composées comprenant 8 à 20 rayant . les Ombellules sont munies d'un involucelle à nombreuses bractées. La racine allongée de type pivotant est assez développée. Elle est jaunâtre, d'odeur forte et aromatique. C'est une plante à cycle de développement bisannuel.

Le persil à feuille plate peut être confondu avec la petite ciguë (*Aethusa cynapium*), plante toxique de la même famille. La petite ciguë ressemble beaucoup au persil par ses feuilles, mais s'en distingue par des traces rougeâtre à la base des tiges et par son odeur peu agréable [32].

Menthe poivrée (feuilles):

La menthe poivrée est un hybride de la menthe aquatique et de la menthe verte, qui ont des vertus médicinales semblables, mais moins prononcées. On la cultive en Europe, depuis 1750 dans la région londonienne, et actuellement en Asie et en Amérique du Nord. Ses feuilles sont utilisées depuis fort longtemps, surtout pour traiter les troubles de la digestion et les ballonnements. Les principaux constituants de la menthe poivrée sont des huiles essentielles, dont le menthol et la menthone, des flavonoïdes (la lutéoline et de la menthoside), des acides phénoliques et des triterpènes. Elle possède un fort pouvoir antibactérien et l'un de ses principaux constituants, le menthol, est un puissant antiseptique, fongicide et anesthésiant sur la peau. Lorsque utilisée entière la plante possède un effet antispasmodique sur le système digestif. Des recherches ont démontré son efficacité dans le traitement des inflammations du côlon. Elle détend les muscles du tube digestif et stimule le flux de la bile. Elle est donc très efficace dans les indigestions, les flatulences, les coliques. Son action antispasmodique la rend utile dans les cas de diarrhée de même que dans les cas de constipation. Elle réduit le mal de transport, est sudorifique dans les cas de fièvres dues aux refroidissements. Sous forme de tisane la menthe poivrée est parfaitement sécuritaire chez l'adulte. Elle ne devrait cependant pas être consommée par les enfants, pour lesquels la Camomille représente un meilleur choix. [33]



Dont le but est de tirer certain nombre d'enseignements relatifs aussi bien à leur intérêt, leur qualité commerciale, qu'à leur composition chimique.

Le présent travail sera divisé en quatre (04) chapitres répartis de la manière suivante.

- Une introduction .

-le premier chapitre est divisé en deux parties :dans la première partie nous parlons de l'extraction des six huiles essentielles naturelles moyennant le procédé classique de l'extraction , et dans la deuxième partie on traitera la caractérisation par les indices physico-chimiques des six HE naturelles et des trois HE commerciales et par leur spectres UV, FT-IR

-Le chapitre II sera consacré aux analyses fines GC et GC-MS des six essences extraites ainsi que les trois essences commerciales .

-Le chapitre III : comparaison de deux méthodes de calcul d'indice de rétention application sur les deux essences naturelles de citron et du lavandin .

-Le chapitre IV fera l'objet d'une étude antibactérienne et antifongique des HE vis-à-vis de six bactéries, une levure et un champignon dans un premier temps , la synergie vis-à-vis des mêmes micro-organismes de même origine en deuxième temps et enfin de leur composés majoritaires .

- Conclusion générale.

I-1-EXTRACTION

I-1-1- INTRODUCTION

La qualité et la valeur commerciale d'une huile essentielle dépendent de plusieurs facteurs qui sont :

- l'espèce botanique : origine de la plante, son âge,...
- les conditions climatiques et géologiques : nature du sol, ensoleillement, situation géographique,...
- l'extraction : temps d'extraction ...

Le procédé d'obtention de l'huile essentielle intervient de façon déterminante dans sa composition.

L'extraction peut se faire soit par hydrodistillation ou par extraction à l'aide de solvant, mais seule la première méthode répond à la définition de l'huile essentielle. Elle est la plus répandue. Toutefois des phénomènes physiques et chimiques se produisent et modifient sensiblement le contenu du matériel végétal et par conséquent l'huile essentielle qui en est libérée.

L'essence récupérée n'est pas exactement la même que celle qui se trouve dans la plante vu que chaque partie du dispositif d'extraction peut être le siège de transformation au cours de la distillation : parmi lesquelles les hydrolyses sont les plus importantes [34]. L'apparition des produits de dégradation dits artefacts est aussi possible.

Pour remédier à ce problème, ou du moins en atténuer les effets, de nombreux auteurs ont étudié les facteurs intervenant sur les moyens de l'améliorer [35].

Notre travail a été effectué sur six essences obtenues par extraction au laboratoire et sur trois autres essences fournies gracieusement par Saidal, ces dernières sont des essences commerciales synthétiques, elles offrent d'autres avantages à savoir leur stabilité et leur emploi moins coûteux et plus variés.

I-1-2 Résultats et discussion

I-1-3-Récolte des plantes et extraction des huiles essentielles

Les plantes; *citrus limonum*, *Mentha. piperita*, *Origanum majorana* ont été récoltées séparément entre mars, avril et juillet 2005 à la région d'El Oued, la camomille (*Matricaria recutita*) et *Lavandula angustifolia* Grosso de la région de Collo, les fruits de persil proviennent du commerce provenant de la région d'El-Oued, et ont été sélectionnées pour leurs propriétés biologiques.

Les plantes récoltées ont été séchées à l'air libre et à l'ombre pendant 10 jours, les feuilles et les fleurs ont été ensuite isolées du reste de l'échantillon (la partie aérienne de la plante), ensuite elles ont été acheminées aux laboratoires de Saidal (laboratoire des HE), centre de formation professionnel EL OUED et au laboratoire de chimie à l'université de Biskra où l'extraction a eu lieu.

Les conditions opératoires sont données dans le tableau -2. Ce dernier regroupe seulement les plantes qui ont subi une hydrodistillation.

Tableau-2: Conditions opératoires pour l'hydrodistillation des cinq plantes

Matière végétale	Fruits de persil	Feuilles de marjoram	Les fleurs de camomille	Fleurs de lavandin	Feuilles de menthe
Quantité de la matière végétale fraîche (g)	200	400	400	400	400
Quantité d'eau (litres)	4	3	3	3	3
Température(c°)	100	100	100	100	100
Temps d'hydrodistillation(h)	4	3	2,5	3	2,5

Deux méthodes de distillation sont principalement utilisées : l'hydrodistillation pour toutes les plantes à part l'essence citron est obtenue par expression.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au procédé d'hydrodistillation (lavandin, camomille, menthe, persil et marjoram) puisque c'est une méthode de mise en œuvre facile et peut donner des rendements très élevés.

L'hydrodistillation est sans aucun doute le procédé le plus ancien, en effet il fut importé en Europe de la civilisation islamique entre le VIIIème et le Xème siècle mais le principe était déjà connu et utilisé par les Egyptiens dès le IVème siècle.

L'hydrodistillation peut facilement être reproduite au laboratoire et elle ne nécessite pas beaucoup de matériel. Elle consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec recyclage communément appelé cohabage.

Le montage de type CLEVANGER(Figure -1). est composé de quatre parties principales:

1. le réacteur : un ballon dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau.
2. la colonne : un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur;
3. le réfrigérant, dans lequel se condensent les vapeurs;
4. vase florentin (erlenmeyer) où vont se séparer la phase organique (huile essentielle) et la phase aqueuse (eau florale).

Ce système peut être équipé d'un recyclage ou cohabage: Un simple robinet au bas du vase permet de recueillir l'huile essentielle à la fin de la réaction. (Figure -2).

Le milieu réactionnel constitué par la matière végétale et l'eau est porté à ébullition grâce à un chauffe ballon. La température est limitée par celle d'ébullition de l'eau.

La composition chimique des huiles essentielles dépend largement de l'influence des conditions d'hydrodistillation sur l'essence contenue dans la plante.

Le protocole expérimental de l'hydrodistillation au laboratoire est le même pour une extraction à grande échelle, le ballon et le chauffe-ballon dans ce cas sont remplacés par un alambic et l'erlenmayer par un vase florentin (Saidal).

Le distillat obtenu dans l'erlenmayer qui contient les deux phases pour chacune des plantes est introduit dans une ampoule à décanter on ajoute de l'éther, après avoir laisser reposer le contenu de l'ampoule quelques secondes, il est possible de récupérer la phase organique (relargage).

L'hydrodistillation d'HE est réalisée dans une ampoule à décanter dans laquelle le mélange précédent se sépare en deux phases non miscibles. Une phase aqueuse, généralement la plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible, contenant l'huile essentielle, se situe au dessus, contrairement à l'huile essentielle des fruits de persil qui se situe au dessous (Figure -3) cette constatation est confirmée ultérieurement.

Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on ajoute un déshydratant tel que le sulfate de magnésium ou de sodium anhydre. C'est l'opération de séchage. On filtre ensuite pour recueillir que la phase organique exempte d'eau afin de pouvoir déterminer le rendement après évaporation du solvant organique.

L'expression est utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes de la famille des Rutacées (citron). C'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement les poches à essence souvent au niveau de l'écorce pour en recueillir les essences. Le produit obtenu se nomme " essence" et non " huile essentielle".

On frottait les fruits avec des gants de cuir recouverts de pierre ponce pour récupérer l'essence qui était ensuite filtrée, soit on presse le fruit puis on récupère l'essence par centrifugation.

Les premiers procédés d'extraction consistaient à presser l'écorce des Citrus pour faire éclater les tissus contenant l'huile essentielle en les frottant sur des récipients dont les parois étaient recouvertes de pics en fer.

Finalement par simple décantation, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse qui contient aussi des débris produits par la lacération des tissus de l'écorce.

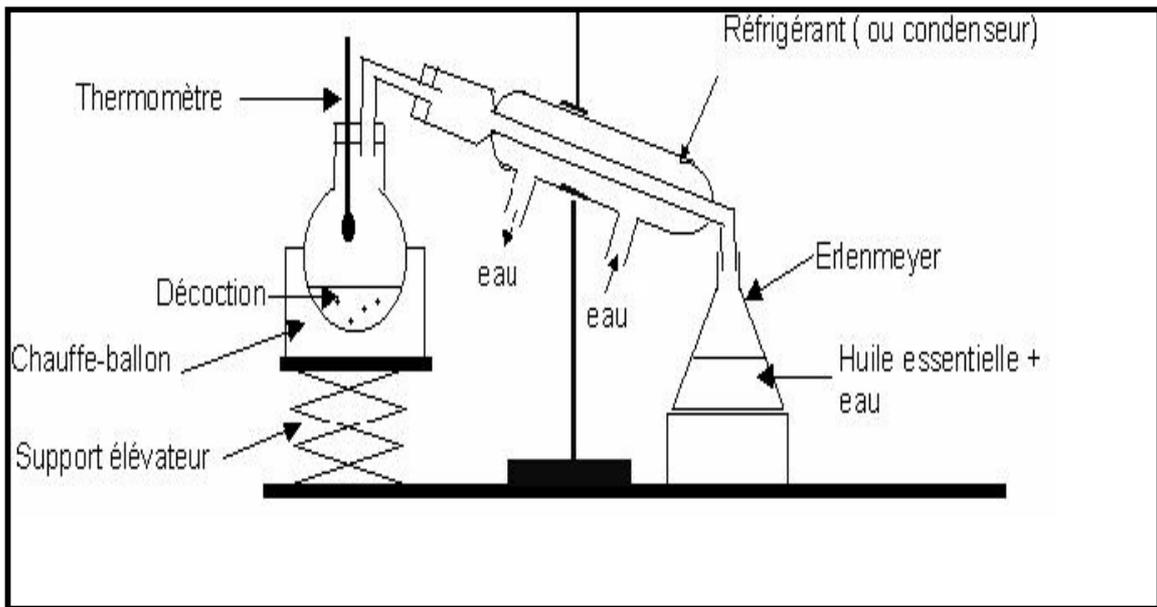


Figure 1: Schéma de montage d'une extraction par hydro distillation

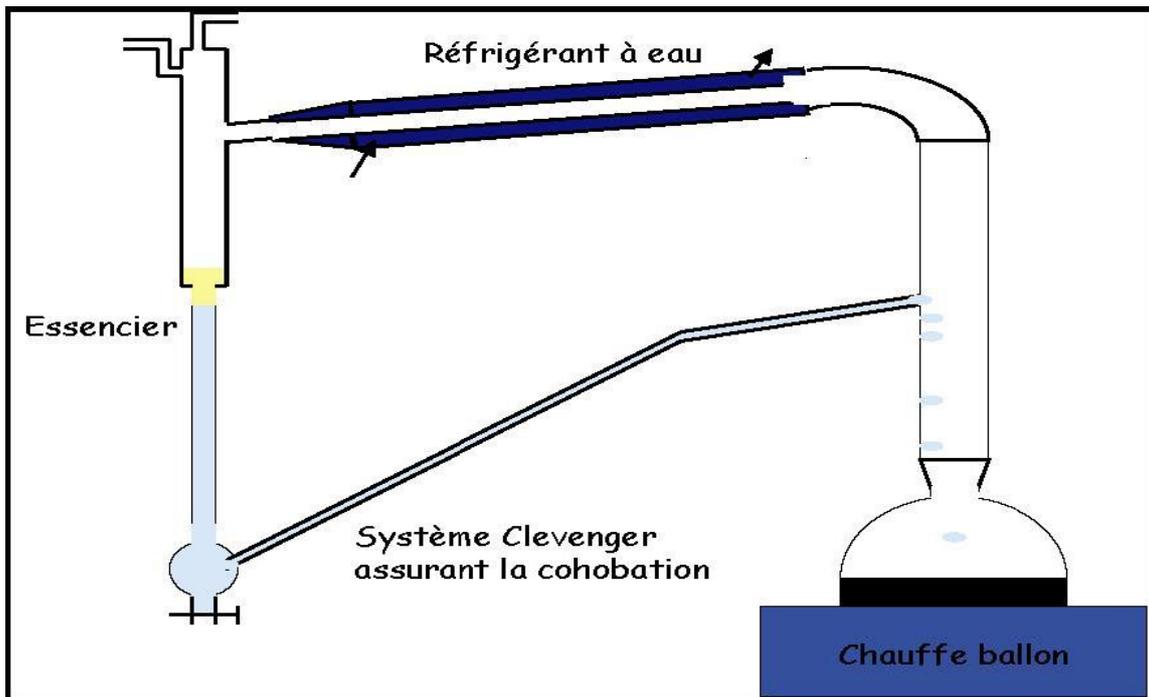


Figure 2 : Schéma du montage d'hydrodistillation assurant la cohobation



Figure 3: la phase de décantation de l'HE de persil

L'avantage de cette méthode est sans aucun doute son faible coût de production le fait que l'essence obtenue après l'écrasement des fruits ne nécessite seulement qu'une filtration pour obtenir un produit commercialisable. Néanmoins elle nécessite une énergie mécanique et est limitée aux agrumes.

Après une centrifugation on récupère une quantité de 3.2 g en essence.

Les résultats obtenus des rendements en huiles essentielles à l'échelle laboratoire sur les cinq plantes fraîches (F) et sèches (S) sont représentés dans le tableau -3 ci-après.

Tableau 3 : Rendement d'extraction des HE

Matière végétale	Huile essentielle(g)*	Rendement (%)**	Rendement (%)***	Rendement(%) [36]
Persil F	4	2	3	2-6
Camomille F	1	0,25	0,5	0,13-0,30
Marjoram F	1,6	0,4	0,90	0,70-0,90
Lavandin F	3,2	0,8	1,9	0,8-2,8[37]
Menthe poivrée F	3,7	0,925	2,7	2,2 [38]

* g d'HE obtenue par hydrodistillation moyenne de trois extractions, **rendement en% d'HE obtenue à partir de la matière fraîche extraite, *** rendement en % d' HE obtenue à partir de 200 g la matière sèche extraite.

Dans ce cas l'extraction des plantes fraîches permet l'obtention des HE avec des rendements obtenus par hydrodistillation.

Nous regroupons ainsi les valeurs des rendements des mêmes espèces séchées données dans la littérature sur le tableau 3.

A partir des valeurs présentées dans le tableau 3 , on constate que :

*Les rendements en huiles essentielles sont très variables suivant les plantes.

*Les plantes (feuilles et fleurs) séchées donnent des rendements encore meilleurs par rapport aux plantes fraîches.

Les résultats des rendements sur l'huile essentielle de camomille sont en accord avec les travaux de [36]qui mentionnent que la plante de camomille matricaire peut contenir 0.30% d'huile essentielle.

*Les auteurs ont obtenus un rendement entre 0.8% à 2.8% en huile essentielle de lavandin lors de la distillation des fleurs sèches cultivées en France, dans notre étude nous avons observé un rendement moyen de 1.9% à partir des fleurs de lavandin

cultivées à Colo, le rendement varie avec les conditions d'extraction, la période de récolte et les variations dans la culture exemple : Type de sol, climat, etc....

*nous pouvons observer les rendements d'extraction variant considérablement entre les essais d'extraction de la matière sèche et de la matière fraîche. La marjoram fraîche donne un rendement de 0.4% alors qu'il est près de 1% à partir de la matière sèche, ces variations ont été observées de la même manière par OTTO [36].

Selon des travaux antérieurs [37] les feuilles de marjoram présentent un rendement de 1%.

La partie utilisée du persil est constituée par les fruits secs du persil. Il convient environ 4% d'huile essentielle, cette dernière possède une odeur spéciale. Selon [37] les feuilles de persil cultivées en France renferment entre 0.225% à 0.50% d'huile essentielle

A l'aide du même tableau 3 nous pouvons observer que la variation au niveau du rendement d'hydrodistillation n'est pas significative pour la plante sèche ou fraîche de la camomille, le rendement est voisin de 0.30%.

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation des fleurs de camomille matricaire se solidifie à température ambiante (entre 25°C et 28°C).

Le persil est la plante qui fournit une quantité d'HE de 4 g avec un rendement de 2%. Elle est de 6 g pour des fruits secs avec un rendement de 3 %.

La menthe fournit une grande quantité en HE proche de la quantité d'HE du lavandin.

Le rendement est de 0.5% pour la camomille.

Les plantes (feuilles et fleurs) séchées donnent des rendements encore meilleurs par rapport aux plantes fraîches. La menthe séchée arrive à donner un rendement deux fois plus de celui de la menthe fraîche. Le lavandin séché donne un rendement de 1.9%.

Les rendements en huiles essentielles sont très variables suivant les plantes.

Les rendements des huiles essentielles étaient calculés par rapport au poids du matériel végétal.

Les paramètres intervenant lors de l'extraction (chauffage, contrôle de la température, agitation,...) doivent être contrôlés le long de l'extraction.

La distillation est conduite pendant quatre heures, durée nécessaire au épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle du fruits de persil, elle est de deux

heures et demi pour les feuilles de menthe et les fleurs de camomille, elle arrive à trois heures de temps pour le lavandin et la marjoram.

A part les fruits de persil, toutes les plantes possèdent une odeur agréable.

L'expression est une méthode qui nécessite une énergie mécanique donc on a essayé seulement de prendre les zestes de citron ou on a obtenu une quantité de 3,2 g en essence de citron.

L'extraction s'effectue en deux étapes de durée inégale. L'étape de chauffage, traduit l'augmentation de la température au sein du réacteur jusqu'à la température de distillation sensiblement égale à la température d'ébullition de l'eau.

Cette période de chauffage est de l'ordre quatre heures pour le persil, trois heures pour la marjoram et le lavandin elle est de deux heures et demi pour la camomille et la menthe. En revanche, l'étape d'extraction proprement dite durant laquelle les molécules aromatiques sont effectivement distillées est longue et se traduit par un palier de température situé au niveau de la température de distillation (100°C). (Figure-4)

Au cours de l'hydrodistillation, le milieu aqueux de pH compris entre 4 et 7, résultant de l'immersion du matériel végétal atteint occasionnellement des valeurs inférieures à 4 pour certains fruits [39].

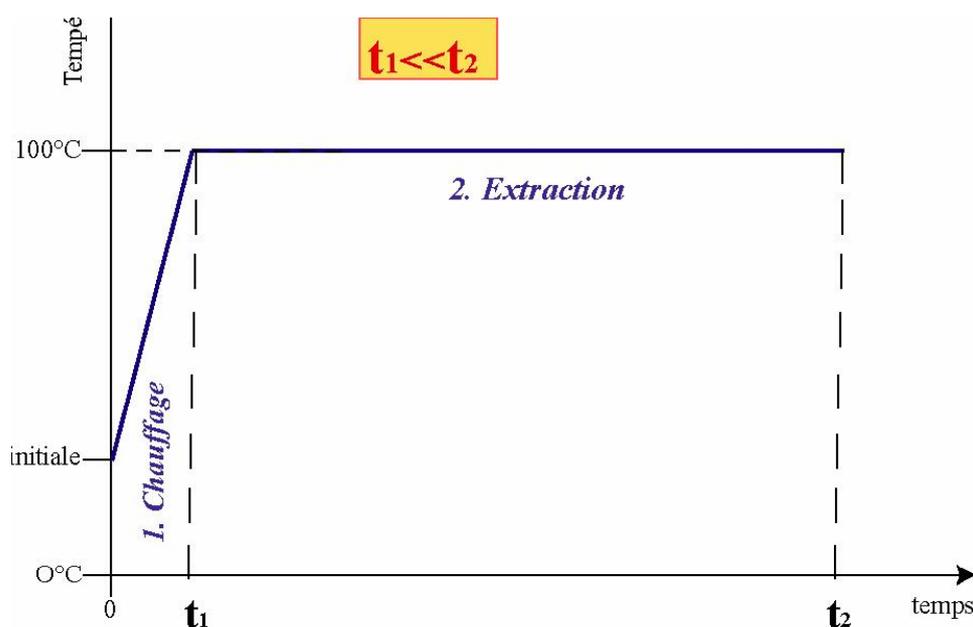


Figure 4 : Principe de l'hydrodistillation

Les constituants de l'essence native sont soumis aux effets combinés de l'acidité et de la chaleur, et peuvent subir des modifications chimiques. L'huile essentielle récupérée est un produit qui diffère sensiblement de l'essence originelle, d'autant plus que l'ébullition est longue et le pH faible [40].

La matière chimique fait l'objet de réactions chimiques diverses : hydrolyses, déprotonations, hydratations et cyclisations [41] pouvant être catalysées par des métaux présents à l'état de traces dans la plante, provoquant des transformations chimiques des constituants.

L'hydrolyse d'esters est souvent la première réaction qui se produit. Elle conduit à la formation d'acides organiques qui à leur tour catalysent les réactions de cyclisation et de déshydratation [42].

I-2 Caractéristiques physico-chimiques

I-2-1 Introduction

La valeur commerciale d'une huile essentielle est la plus part du temps estimée d'après ses qualités organoleptiques, (odeur, goût, couleur, état.) auxquelles s'ajoutent un certain nombre de constantes appelées " indices " qui ont fait l'objet d'étude statistique très importante. Ces constantes ont été normalisées au sein d'organismes nationaux exemple en France : l'AFNOR (Association Française de Normalisation) ou encore l'ISO (International Standard Organisation) et généralement dans tous les pharmacopées existantes.

Elles consistent à mettre au point les méthodes de détermination des constantes physico-chimiques en fixant les conditions opératoires et les facteurs pouvant influencer la mesure, et en mettant au point des monographies pour les huiles essentielles les plus courantes avec indication détaillée de leurs caractéristiques. Outre leur facilité de mise en œuvre, ces méthodes permettent donc d'évaluer la qualité d'une essence, de procéder à une analyse de routine, d'étudier l'évaluation dans le temps, et de comparer les échantillons.

Chacun de ces composés de part leur volatilité dégage une odeur propre. Ainsi certaines plantes peuvent avoir une odeur similaire due à une molécule commune présente en quantité notable dans l'huile essentielle. Dans ces conditions, une fois les composés responsables d'une odeur identifiés, si le caractère olfactif de ces composés s'avère intéressant, il serait alors rentable, selon le contexte économique, de produire des espèces végétales susceptibles de fournir une huile essentielle à haute teneur moléculaire en composés recherchés, et donc généralement de meilleure qualité [43-44].

Comme les propriétés organoleptiques ne donnent qu'une idée fluctuante et fragmentaire d'une huile essentielle, le besoin d'une caractérisation plus précise s'est manifesté. Celle-ci a été obtenue par l'examen des propriétés globales de l'essence les plus facilement accessibles en particulier ses propriétés physico-chimiques.

Ces indices sont constitués par des déterminations physiques et chimiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, indice d'acide, indice d'ester.....) . Depuis 1975, une nouvelle méthode de contrôle de pureté et d'authenticité des H.E utilisant la spectrométrie dans l'UV et donne lieu à l'indice CD [45].

Dans ce chapitre nous avons soumis toutes les essences :

- d'une part à une caractérisation par les indices physico-chimiques et les valeurs de CD
- d'autre part à une analyse par FT-IR.

I-2- 2 Résultats et discussion :

II-2-3 Caractères organoleptiques

les caractères organoleptiques restent importants [45-46]. Par exemple l'examen olfactif qui précède ou suit toute analyse est indispensable car, si l'odeur de l'huile essentielle n'est pas satisfaisante, il importe peu que les constantes physico-chimiques soient correctes : le produit est à rejeter.

Nous citons ici les caractères organoleptiques de nos essences

- Le citron est un liquide mobile, limpide, de couleur jaune vert, d'odeur caractéristique du zeste de citron
- Le lavandin est un liquide mobile, limpide de couleur jaune clair légèrement ambré d'odeur caractéristique lavandée et très légèrement camphrée.

-la menthe poivrée est un liquide mobile, limpide de couleur jaune ambré d'odeur caractéristique menthée.

- la menthe arvensis est un liquide mobile, limpide de couleur jaune pale de d'odeur caractéristique.

-la camomille matricaire liquide limpide de couleur bleu foncé d'odeur douce et agréable, légèrement herbacée

-le persil est un liquide limpide presque incolore d'odeur caractéristique du fruit écrasé mais différent de celle de la partie verte de la plante.

- la marjoram est un liquide mobile, limpide de couleur jaune clair d'odeur caractéristique herbacée.

Nos huiles essentielles ont été conservées à froid (congélateur) dans des flacons en verre fumé, donc à l'abri de la lumière.

I-2-4 Indices physico-chimiques

Nous avons calculé pour les six huiles essentielles extraites ainsi que pour les trois essences commerciales les indices physico-chimiques suivants :

- Densité relative à 20°C d_{20}

- Indice de réfraction à 20° C η

- Pouvoir rotatoire à 20°C $[\alpha]$

- Indice d'acide IA.

- Indice d'ester IE.

- Solubilité dans l'éthanol à 70 %.

- Ces indices sont déterminés à partir des normes AFNOR (Association Française de normalisation) et rassemblés dans les tableaux 4,5 et 6.

- Les tableaux 4 , 5 et 6 donnent aussi les indices physico-chimiques donnés dans la littérature dans un but de comparaison.

-De plus nous avons déterminé la valeur CD. La température de l'expérience est de 21°C

Les valeurs des indices physico-chimiques sont toujours proposées sous forme d'une moyenne comprise entre deux valeurs limites car de nombreux travaux ont montré que la variation qualitative des constituants d'une huile essentielle d'une même espèce botanique entraînait durant le cycle végétatif de celle-ci, des variations dans les calculs de ces indices.

Tableau 4: Les indices physico-chimiques des H.E de Citron (commerciales)

HE Réf.	d_{20}^{20}	η_D^{20}	α_{20}^{20}	IA	IE	CD	Sol à 70%
Citron1*	0,8478	1,4723	+64,1°	0,53	13,48	/	1:1V
Citron2(723968)*	0,8972 à 24°C	1,4827	67,05° à 25°C	0,83	15,9	/	1:1V
HE de citron d'Italie [2]	0,849 à 0,858	1,4740 à 1,4760	+ 57° à 65°	max : 3	-	0.20 à 0.96	-
Ecorce eureka [47]	0,848 (25°/25°)	1,4740	+ 64,87° à 25°	-	-	0.76	-
Citron [48]	0,849 à 0,855	1,4742 à 1,477	+ 60°,6	-	-		-
Citron [49]	0,858 à 0,859	1,474 à 1,477	-	-	-		-

* Notre travail

Tableau 5 : Les indices physico-chimiques des H.E de Lavandin (commerciales)

HE Réf.	d_{20}^{20}	η_D^{20}	α_{20}^{20}	IA	IE	CD (21°C)	Solubilité à 70%
Lavandin* (1)	0,8854	1,4598	-2	0,923	78,178	0,487	1:3V
Lavandin* (2)	()	1,4656	()	()	79,886	0,257	Rien avec 4V d'EtOH à 70%
HE de lavandin abrialis [2]	0,885 à 0,897	1,4590 à 1,4660	-5° à -2°	max :1	77 à 106	-	Pas nécessaire d'utiliser plus de 4V (70%)
HE de lavandin grosso [2]	0,890 à 0,898	1,4580 à 1,4640	-7° à -4°	max :1	100 à 137	-	Pas nécessaire d'utiliser plus de 3V (70%)
Lavandin [50]	0,891	1,4646	-4°,425'	-	-	-	-
Lavandin [48]	0,886 à 0,896 (15°/15°)	1,4616 à 1,4640	- 2,53' à - 5°,26'	-	-	-	-
Lavandin [49]	0,882 à 0,893	1,461 à 1,466	- 2° à - 8°	-	-	-	-

* notre travail () non effectué

Tableau 6 : Les indices physico-chimiques des six H.E

HE Réf.	d₂₀^D	η₂₀	α₂₀	IA	IE	CD (21°C)	Solubilité à 70%
Lavandin	0,8894	1,4620	-5	0,940	88,96	0,392	1:3V
Citron	0,8520	1,4740	+65,8	0,99	14,4	0,35	Rien avec 4V d'EtOH à 70%
Menthe poivrée	0,900	1,4633	-14	0.57	17	()	Pas nécessaire d'utiliser plus de 4V (70%)
Menthe poivrée[2]	0,901	1,4600	-29°	/	14	/	Pas nécessaire d'utiliser plus de 4V
France	0,916	1,4670	-10°		19		
camomille	0,912	1,446	-1	6	300	()	Pas nécessaire d'utiliser plus de 3V (70%)
camomille [2]	0,900	1,4380	-2	max8	250	/	Pas nécessaire d'utiliser plus de 0.6V (90%)
	0,920	1,4460	+3		340		
Persil	1,040	1,5200	-7°	0,99	1,83	()	Pas nécessaire d'utiliser plus de 5V d'EtOH (70%)
persil[2]	1,043	1,5130	-10	max 4	1	/	Pas nécessaire d'utiliser plus de 6V d'EtOH (85%)
	1,083	1,5220	-4		10		
marjoram	0,853	1,4660	+16	1	17,9	0,27	Pas nécessaire d'utiliser plus de 3V d'EtOH (70%)

() non effectué

En comparant les deux H.E de même genre :

1-de citron : nous remarquons que le citron 2 donne les valeurs les plus élevées de η , α_d , I.E. et IA, cela peut- être du à son âge ou à son mode de conservation, alors qu'elles sont proches du citron(extrait au laboratoire) qui une valeur $CD=0,35$

2-de lavandin : les valeurs trouvées de η et I.E pour les trois HE sont proches. Le lavandin présente une valeur de $CD=0,392$ supérieur a celle du lavandin2 ainsi avec un pouvoir rotatoire de -5°

Nous n'avons pas déterminé les valeurs de CD du persil, camomille ainsi que de tous les indices de l'HE de lavandin 2 à cause de la faible quantité des huiles misent à notre disposition.

En ce qui concerne l'UV : l'allure obtenue pour calculer la valeur CD de l'huile essentielle de citron1 et citron2 ne correspond pas à celle donnée par la norme AFNOR.

*Selon [2] $CD=0.20$ à 0.96

*selon [50] $CD=0.76$

Alors quelle est de $0,35$ pour l'essence de citron naturelle

Ce qui laisserait penser que cette essence (citron 1 et citron 2) ne serait pas une essence naturelle. Cette dernière observation pourrait être confirmée ou infirmée ultérieurement.

En ce qui concerne la valeur CD de l'huile essentielle de lavandin 1 est supérieure à celle de l'huile essentielle de lavandin 2, et cela peut être expliqué par leur différence des dates de conservation, ainsi que les conditions expérimentales (température,...).

En faisant maintenant la comparaison de nos indices avec ceux donnés en littérature nous remarquons que :

-Nos résultats sont dans les normes imposées ou, du moins, se rapprochent des limites minimales ou maximales.

-L'huile essentielle de citron 2 donne les valeurs les plus élevées de l'indice d'ester, le pouvoir rotatoire et l'indice de réfraction, ce qui confirmerait que celle-ci est une essence artificielle.

Notamment la valeur d'indice de réfraction est de 1.4827 , supérieure aux valeurs données en littérature, et sachant que cette dernière caractérise généralement une espèce bien déterminée exemple le citron donne une valeur aux décimales près de 1.47 .

On peut noter aussi que les valeurs trouvées du pouvoir rotatoire des HE du lavandin, persil, menthe, camomille et marjoram tendent vers les valeurs négatives, alors celles trouvées pour les essences de citron tendent vers les valeurs positives.

Alors que pour l'HE du lavandin, menthe, camomille, persil et marjoram nous n'observons pas de grands écarts entre les huiles, les densités relatives sont du même ordre que celles des autres essences.

I-2-5 Analyse par FT-IR.

Suite à la caractérisation de nos essences, nous avons utilisé la spectrométrie IR à transformée de Fourier dont le but est de récolter plus de renseignements sur nos huiles essentielles.

Avantages de la spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier

Parmi les avantages de la FT-IR par rapport à la spectrométrie infrarouge classique [51-52] nous citons:

- une grande rapidité d'acquisition des données spectrales (en moyenne un enregistrement/ second (scan) simultanée sur toutes les fréquences.
 - un meilleur rapport signal/ bruit en raison de la mesure simultanée sur toutes les fréquences.
 - une très grande précision de mesure des longueurs d'onde grâce au contrôle de la position du miroir mobile par un laser.
-
- les figures 5-10, représentent les spectres FT-IR des HE extraites naturellement de : citron, lavandin, camomille, marjoram, persil et la menthe poivrée respectivement
 - le tableau 7 regroupe les principales bandes des HE du : lavandin 1 et lavandin2.
 - le tableau 8 donne les principales bandes des HE de : citron 1 et citron2
 - le tableau 9 donne les principales bandes d'HE de menthe arvensis.
 - les tableaux 10-15 donnent les principales bandes des HE de : lavandin, citron, persil, menthe et camomille respectivement.

Vu les avantages que présente la spectrométrie FT-IR, ainsi que son caractère non destructif et sa nature informative, l'identification a été effectuée comme suit:

- l'assignation des bandes [53-55].

La comparaison de ces dernières avec ceux données en littérature permettent ainsi de faire une analyse fonctionnelle en proposant des fonctions organiques.

En faisant une comparaison entre les spectres IR de nos H.E extraites au laboratoire on conclue que le spectre de l'essence de citron possède une bande très faible située à 3450 cm^{-1} correspondant au groupement O-H des alcools, elle est plus intense pour les autres

HE avec des transmission de 21%, 23%, 21%, 16%, 21% pour les HE de la *menthe poivrée*, le *lavandin*, le *persil*, la *camomille* et la *marjoram* respectivement.

A $1710,7\text{ cm}^{-1}$ l'HE de menthe présente une bande intense, elle est moins intense pour l' HE de camomille située à $1718,9\text{ cm}^{-1}$ correspondant au (C=O) cétones non conjuguées. L'essence de citron présente une bande à $1681,8\text{ cm}^{-1}$. mais elle est plus intense pour l'HE de lavandin avec une transmission de 40%.

On remarque aussi que nos HE présentent des bandes aux environs de 1643 cm^{-1} (C=C).

En faisant une comparaison entre les deux spectres IR des deux H.E (citron1 et lavandin1) on constate que le spectre de l'essence de lavandin1 possède une bande large et intense située à 3436.19 cm^{-1} alors que celle du citron est à 3468.22 cm^{-1} , mais très faible, correspondant au groupement O-H des alcools.

L'essence de lavandin1 donne aussi une bande intense à 1736.67 cm^{-1} correspondant au (C=O) cétones non conjuguées. L'essence de citron présente une bande à 1679.45 cm^{-1} .

Ainsi les deux HE de citron (citron1 et citron 2) et du lavandin 1 donnent une bande aux environs de 1643 cm^{-1} (C=C) mais elle est plus intense pour l'HE de lavandin2.

Toutes les essences présentent des bandes intenses aux environ de 2963 cm^{-1} correspondant aux C-H des alcanes et cycloalcanes.

Tableau-7- principales bandes des HE de lavandin1 et lavandin 2

T% (1)	$\nu \text{ cm}^{-1}$ Lavandin (1)	$\nu \text{ cm}^{-1}$ Lavandin (2)	T% (2)	Type de vibration	Liaison
22%	3436,19	3411,91	47%	-O-H (associée)	Alcools, phenols, acides
41%	2965,98 2940	2965,75 2930 2359,91	69%	-C-H valence	Alcanes, cycloalcanes.
25%	1736,67	1735,60	49%	-C=O valence	Aldéhydes et cétones saturés éthers non saturés et aromates.
8%	1643,25	1643,16	26%	C=C valence	Aromates, alcènes.
9%	1450,22	1449,80	15%	-CH ₃ et CH ₂ déform	Ethers, hydrocarbures
14%	1246,12	1245,73	24%	-C-O valence	Esters saturés
20%	1372,64	1372,74	39%	-CH ₃ déform	Hydrocarbures
8%	1170,16	1169,36	10%	-C-O valence	Ethers, alcools
10%	996,88	996,38	19%	=C-H déform	Alcanes (trans) 1.2 disubstitués
19%	920,06	920,19	42%		
7%	834,70	834,93	13%	=C-H déform	Benzènes 1.4 disubstitués

Tableau-8- Principales bandes des HE de citron1 et citron 2

T% (1)	$\nu \text{ cm}^{-1}$ Citron (1)	$\nu \text{ cm}^{-1}$ Citron (2)	T% (2)	Type de vibration	Liaison
5%	2963,14	2963,62	52%	-CH ₃ valence	Aromates, alcènes.
53%	2950	2950	70%		Alcanes.
8%	2726,55	2750	11%	-	-
8%	1679,45	1676,61	34%	C=O valence	Cétones α,β insaturés et aromatiques.
26%	1643,52	1643,76	50%	-C = C-	Double liaison monosubstitué
27%	1443,08	1443,66	47%	-CH ₃ et CH ₂ déform	Esters, hydrocarbures
15%	1375,81	1376,09	37%	-CH ₃ déform	Hydrocarbures
6%	1151,62	1151,47	17%	-C-O valence	Ethers, alcools
37%	887,39	887,25	64%	=C-H déform	Alcènes 1.1 disubstitués
13%	796,93	796,92	32%	=C-H déform	Alcanes avec plus de 4 groupe -CH ₂

Tableau-9- Principales bandes de menthe arvensis

T%	ν cm ⁻¹ Citron	Type de vibration	Liaison
24	3433,1	-O-H valences (associée)	Alcools, phenols, acides
45	2925,8 2869,9	-C-H valences	Alcanes , cycloalcanes
28	1710,7	C=O valence	Aldéhydes et cétones saturés
22	1456,2	-CH ₃ et CH ₂ déform	Esters, hydrocarbures
16	1369,4	-CH ₃ déform	Hydrocarbures
14	1245,9	-C-O valence	Esters saturés
10	1045,3	-C-O valence	Alcools primaires
21	1026,1	-C-O valence	Alcools primaires
9	993,3	-C-O valence	Ethers, alcools
8	920	-C-O valence	Alcools primaires

Tableau-10- Principales bandes du citron

T%	ν cm ⁻¹ Citron	Type de vibration	Liaison
44	2962,5 2922	-CH ₃ valence	Aromates, alcènes. Alcanes.
17	1681,8	C=O valence	Cétones α,β insaturés et aromatiques.
18	1643, 2	-C = C-	Double liaison monosubstitué
27	1436,9	-CH ₃ et CH ₂ déform	Esters, hydrocarbures
22	1377,1	-CH ₃ déform	Hydrocarbures
8	1155,3	-C-O valence	Ethers, alcools
8	1016,4	-C-O valence	Alcools primaires
38	887,2	=C-H déform	Alcènes 1.1 disubstitués
20	796,5	=C-H déform	Alcanes avec plus de 4 groupe – CH ₂

T%	ν cm ⁻¹ Lavandin	Type de vibration	Liaison
----	---------------------------------	-------------------	---------

12	3462	-O-H (associée)	Alcools, phenols, acides
40	1739,7	-C=O valence	Aldéhydes et cétones saturés éthers non saturés et aromates.
8	1643,2	C=C valence	Aromates, alcènes.
14	1450,4	-CH ₃ et CH ₂ déform	Ethers, hydrocarbures
10	1411,8	-OH déform	Alcools, phenols, acides
27	1373,2	-CH ₃ déform	Hydrocarbures
20	1247,9	-C-O valence	Esters saturés
10	1172,6	-C-O valence	Ethers, alcools
30	995,2 920,00	=C-H déform	Alcanes (trans) 1.2 disubstitués
7	835,1	=C-H déform	Benzènes 1.4 disubstitués

Tableau-11- principales bandes du lavandin

Tableau-12- principales bandes de camomille

T%	ν cm ⁻¹ Lavandin	Type de vibration	<i>Liaison</i>
15	3446,6	-O-H (associée)	Alcools, phenols, acides
	3087,8	-CH ₂ valence	Aromates, alcènes.
36	2925,8	-C-H valence	Alcanes, cycloalcanes.
31	2856,4		
3	2725,2		
10	1718,5	-C=O valence	Aldéhydes et cétones saturés éthers non saturés et aromates.
9	1629,7	C=C valence	Aromates, alcènes.
7	1595	Vibration du cycle	aromates
16	1450,4	-CH ₃ et CH ₂ déform	Esters, hydrocarbures
21	1375,2	-CH ₃ déform	Hydrocarbures
9	1016,4	-C-O valence	Alcools primaires
17	987,5	C=C déform	Aldéhydes di substitués en position trans
16	898,8	C=C déform	Aldéhydes di substitués en position exo

Tableau-13- principales bandes du marjoram

T%	ν cm⁻¹ Citron	Type de vibration	Liaison
21	3178,5	-O-H valences (associée)	Alcools, phenols, acides
11	1654,8	C=C valence	Aromates, alcènes.
-	1419,5	-CH ₃ et CH ₂ déform	Esters, hydrocarbures
7	1110,9	-C-O valence	Ethers, alcools
6	981,7	-CH valence	Certain éthyléniques

Tableau-14- principales bandes du persil

T%	ν cm⁻¹ Citron	Type de vibration	Liaison
22	3421,5	-O-H valences (associée)	Alcools, phenols, acides
3	2918,1	-C-H	Alcanes, cycloalcanes
13	1629,7	C=C valence	Aromates, alcènes.
2	1419,5	-CH ₃ et CH ₂ déform	Esters, hydrocarbures
5	1118,6	-C-O valence	Ethers, alcools

Tableau-15-Principales bandes de menthe poivrée

T%	ν cm⁻¹ Citron	Type de vibration	Liaison
21	3409,9	-O-H valences (associée)	Alcools, phenols, acides
35	2925,8 2869,9	-C-H valences	Alcanes , cycloalcanes
4 30	1735,8 1710,7	C=O valence	Aldéhydes et cétones saturés
17	1456,2	-CH ₃ et CH ₂ déform	Esters, hydrocarbures
16	1369,4	-CH ₃ déform	Hydrocarbures
10	1245,9	-C-O valence	Esters saturés
13 24	1045,3 1026,1	-C-O valence	Alcools primaires
10	920	-C-O valence	Alcools primaires
14	875,6 844,8	C=C déform	Aldéhydes di substitués en position exo

-Les mêmes remarques peuvent être citées pour les H.E de lavandin, la seule différence c'est la présence d'une bande intense à 2359.91 cm^{-1} (C-H des alcanes) avec une transmission de 22%, pour l'essence du lavandin 2 et qui est absente sur le spectre de l'essence de lavandin 1, elle est très faible pour l'HE de lavandin naturelle située à $2360,7\text{ cm}^{-1}$ avec une transmission de 5% , absente aussi sur le spectre de l'essences de citron1 presque absente pour les autres HE.

-En comparant les trois spectres des essences de citron nous remarquons qu'elles présentent les mêmes fonctions organiques mais avec des transmissions différentes, de même que pour les huiles essentielles de lavandin et de menthe.

Le spectre IR de l'essence de citron 1 donne une bande à 3350.26 cm^{-1} (O-H) plus large ainsi qu'à 1643.76 cm^{-1} (C=C) qui est plus intense par rapport à la seconde (citron 2) cela peut être expliqué par une oxydation de la double liaison (auto-oxydation). Le spectre IR de l'essence de citron (extrait naturel) est plus proche de celui de l'essence de citron 2.

Les deux spectres IR de l'huile essentielle de menthe présentent les mêmes pics donc les mêmes fonctions organiques ainsi on remarque que leurs transmission est presque la même seulement une petite différence est remarquée sur l'HE de menthe arvensis qui présente un pic situé à 1670 cm^{-1} qui est absent sur le spectre de l' HE de menthe poivrée.

L'oxygène de l'air, la température et la lumière sont les facteurs qui altèrent de plus une huile essentielle car les mécanismes radicalaires de type thermiques et ou photochimiques [56] prennent naissance. La technique d'extraction a aussi son importance vu que chaque partie du dispositif d'extraction peut être siège de transformation au cours de la distillation : parmi lesquelles les hydrolyses sont les plus importantes [57].

Les phénomènes d'auto-oxydation des HE riches en hydrocarbures insaturés constituent un fait non négligeable.

La connaissance de vieillissement d'une essence implique la détermination des substances oxygénés qui prennent naissance au cours de ce vieillissement et leur mécanisme de fonction [58] est donné à titre d'exemple de l'auto-oxydation du limonène, produit majoritaire de l'essence de citron.

Sur les trois spectres des essences commerciales le lavandin et la menthe arvensis présentent une bande intense aux environs de 1730 cm^{-1} qui est absente sur le spectre de l'essence de citron 1 et citron 2.

I-3 —CONCLUSION

Le choix du mode d'extraction, du matériel végétal, le calcul du rendement ainsi que la détermination des indices physico-chimiques permet de donner une première caractérisation de nos essences, les valeurs trouvées restent globalement proches des normes.

En ce qui concerne la valeur CD de l'essence de citron 2(commerciale) qui n'a pas eu lieu nous a mené à penser que ce n'est pas une huile naturelle.

Des travaux sur le matériel botanique ont montré que l'âge du végétal, les traumatismes provoqués par les agents exogènes la création d'une race chimique nouvelle par mutation étaient susceptibles de provoquer les modifications profondes dans la composition de l'huile essentielle

De manière générale, il est assez aléatoire d'évaluer la qualité olfactive d'une huile essentielle d'après la composition chimique de celle-ci, où des rapprochements heureux aussi bien que des dégradations de composés aromatiques sont induites. Seul, un examen organoleptique permettra d'évaluer ces interactions moléculaires. Les principaux atouts olfactifs d'une huile essentielle ne tiennent pas seulement compte de la composition chimique de l'essence mais aussi de son examen organoleptique, de ses constantes physiques permettant de déceler toute adultération.

De l'analyse FT-IR nous pouvons conclure:

-par rapport aux autres huiles essentielles nos essences qui contiennent des composés polaires (groupement O-H, C=O,...)

-l'FT-IR est une méthode qui nous renseignent sur le vieillissement d'une huile, toutefois cette technique doit être suivie par d'autres techniques instrumentales plus sensibles telles que la chromatographie en phase gazeuse seule ou couplée à d'autres méthodes telles que la spectrométrie de masse en mode d'ionisation par impact électronique GC/MS/EI.

I-4- Partie expérimentale

- **La densité relative d_{20}^{20}** : a été déterminée selon la norme AFNOR NF - T75 – 111 à l'aide d'un

pycnomètre de 25ml d_{20}^{20} est donnée par la relation suivante :

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

M_0 : masse du pycnomètre vide.

M_1 : masse du pycnomètre contenant l'eau distillée.

M_2 : masse du pycnomètre contenant l'H.E.

Pour chaque degré en plus ou en moins de 20°C habituels on doit ajouter ou retrancher la valeur 0,0008 [2].

* L'indice de réfraction : η_D^{20} NF T75 - 112 c'est la mesure directe de l'angle de réfraction soit l'observation de la limite de réflexion totale en maintenant l'huile dans ces conditions isotropisme et de transparence.

La mesure s'effectue à l'aide d'un réfractomètre de type de BIOBLOCK scientific polystat. coupler à un thermomètre ATAGO (digital thermomètre). η_D^{20} varie en fonction de la température.

On doit ajouter ou retrancher 0.00044 par degré en plus ou en moins de 20 °C [2]

-**Indice d'acide IA** : NF 75 - 103 : IA est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium alcoolique nécessaires pour la neutralisation des acides libérés dans un gramme d'H.E, IA est donné par la formule :

$$IA = 5,61 \frac{V}{m}$$

V : le volume en ml d'hydroxyde de potassium.

m : masse en grammes de la prise d'essai.

- Indice d'ester I.E : NF:75 - 104

I.E est le nombre de milligrammes d'hydroxydes de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'H.E.

L'indice d'ester est donné par la relation :

$$IE = 28,05 \frac{V_0 - V_1}{m} - IA$$

où V_0 : est le volume en ml de solution d'HCl utilisé pour l'essai à blanc.

V_1 : est le volume en ml de solution d'HCl utilisé pour la détermination d'I.E.

m : est la masse en gramme de la prise d'essai en général ($2g \pm 0,05g$).

IA : Indice d'acide .

-Le pouvoir rotatoire spécifique : NFT 75 - 113

C'est la mesure de la rotation du plan de polarisation de la lumière à une longueur d'onde définie, traversant une épaisseur déterminée d'H.E la longueur d'onde est généralement celle correspondant à la raie D du sodium .

- un polarimètre de type galileo.

- une lampe à raie D de sodium $\lambda = 589 \text{ nm}$.

- Température de l'expérience 21°C , il est donné par la relation :

$$[\alpha]_D^T = \frac{A \cdot V}{L \cdot m}$$

A : la valeur de l'angle de rotation exprimée en degré.

L : la longueur du Tube exprimée en décimètre.

V : le volume de la solution en millilitre.

m : la masse de la substance dissoute en gramme.

-La solubilité dans l'éthanol : NF 75 - 101

C'est l'addition graduelle d'éthanol à une prise d'essai d'H.E à la température 20°C dans un tube à essai, introduire 1 ml d'H.E et ajouter goutte à goutte de l'alcool jusqu'à l'obtention d'une solution parfaitement limpide .

-Détermination de la valeur CD par analyse spectrophotométrique dans l'UV.

La valeur CD [NFT 75 - 122] est la mesure du segment CD exprimé en unité d'absorbance pour la masse exacte de la prise d'essai précisée dans le norme relative à l'H.E considérée

.-Le segment CD : par le point du maximum d'absorption. Tracer la parallèle à l'axe des absorbances et la tangente commune aux deux parties de la courbe. (on obtient les points A et B) situés de part et d'autre du maximum, cette parallèle coupe la tangente au point C et l'axe de longueur d'onde au point E. Figure -11- [2].

- Les indices CD des H.E ont été déterminés dans les conditions suivantes :

-Spectrophotomètre : CECIL 9000 SERIE 5.

-Longueur d'onde : 240-400 nm

-Concentration des H.E près de 0,25 g /100 ml d'éthanol (95 %).

-FT-IR

Pour les HE commerciales

Spectromètre NICOLET SERIES II, appareil MAGNA-IR 550 sur une cellule KBr,

Solution pure

Pour les HE naturelles

Spectromètre TESTSCAN SHIMADZU FTIR 8000 SERIES II, sur une cellule KBr,

Solution pure

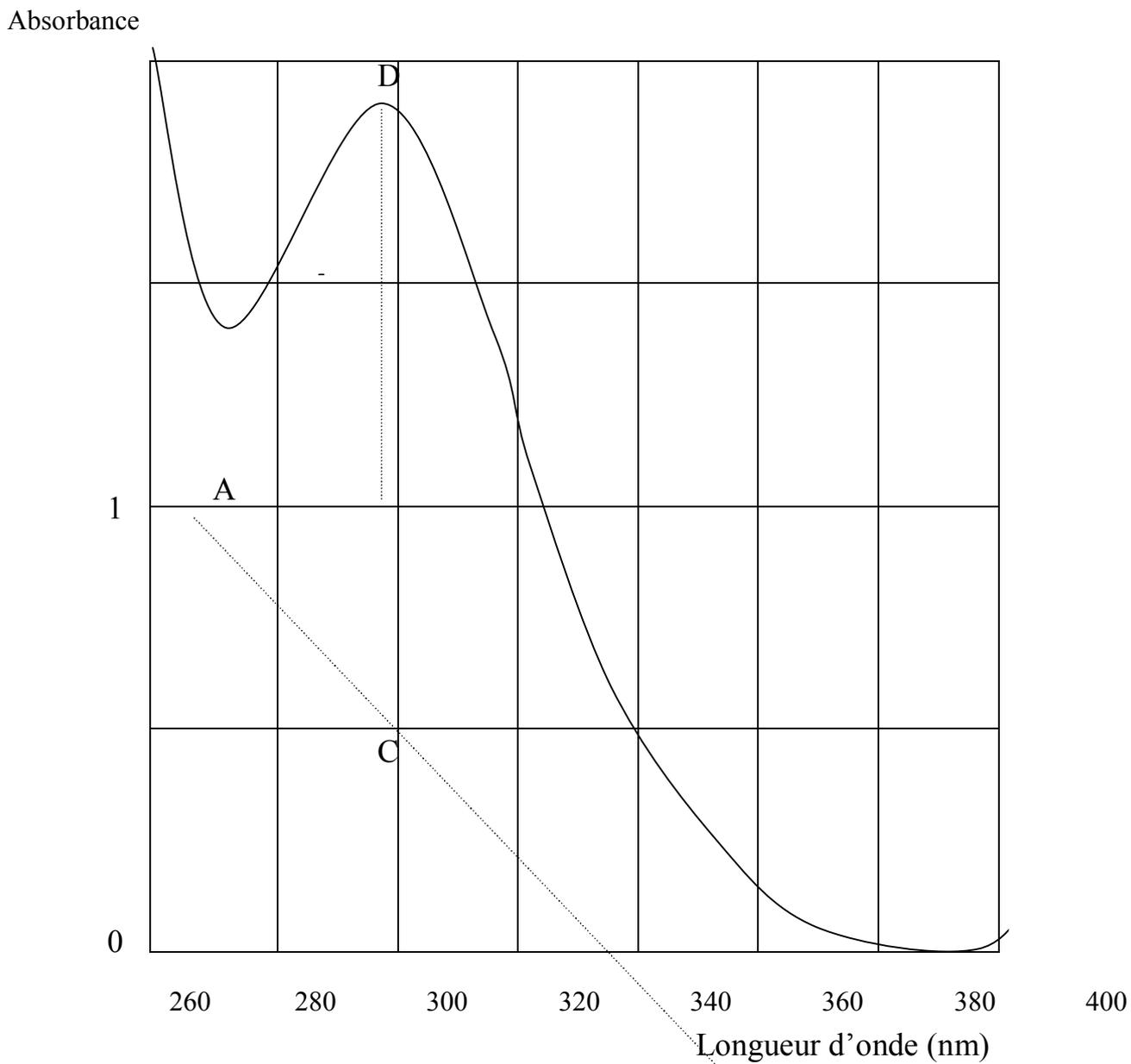


Figure -11-
Diagramme caractéristique d'une huile essentielle de lavandin

II- Analyses chimiques par Chromatographie en Phase Gazeuse munie d'un Détecteur à Ionisation de Flamme (CPG/FID) puis couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/MS)

II-1 Introduction

Selon la Pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques voire : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants. La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés.

Une huile essentielle pure et naturelle est caractérisée par sa composition strictement «végétale», contrairement aux essences synthétiques ou «identiques naturelles» intégralement reconstituées à partir de composés chimiques de synthèse.

Depuis que James et Martin ont réussi à mettre au point un prototype de chromatographie en phase gazeuse (1952) [59], cette technique n'a pas cessé de se développer jusqu'à nos jours où elle constitue un instrument analytique de base pour toute analyse de produits naturels, particulièrement pour les huiles essentielles. Ce développement a touché les parties du chromatographe et spécialement à sa partie la plus importante et la plus critique: la colonne. L'introduction des colonnes capillaires par Golay en 1958 a ouvert une nouvelle voie à la chromatographie en phase gazeuse [60]. Ainsi, elles constituent un outil analytique incomparable dont les propriétés ont été et sans cesse améliorées [3].

Leur haute efficacité est due à la présence d'un film fin de phase liquide déposé sur les parois internes du tube capillaire. Celle-ci ayant une section constante et ouverte permet le cheminement aisé du gaz vecteur le long de la colonne. Néanmoins, un problème critique se pose pour l'analyse des huiles essentielles en chromatographie en

phase gazeuse: c'est le choix de la phase stationnaire, sachant que les H.E sont des mélanges complexes constitués en grande partie des terpènes.

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane, retrouvé en tant que composé majoritaire dans quelques unes. Divers autres constituants minoritaires leurs sont associés. De nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont également considérés comme des composés terpéniques.

Les *composés terpéniques* sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonés (C₅)_n ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (isoprène), nous pouvons réaliser la classification suivante :

* Pour **n = 2**: les *monoterpènes*. Ces terpènes proprement dits sont des hydrocarbures en **C₁₀**. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales, surtout alcool et aldéhyde.

* Pour **n = 3**: les *sesquiterpènes*. Ce sont des hydrocarbures de formule **C₁₅**, soit une fois et demie (sesqui-) la molécule des terpènes (en C₁₀H₁₆). Un groupe particulier de sesquiterpènes est représenté par les azulènes, composés instables dont le nom vient de leur coloration bleue et qui sont importants en pharmacognosie en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires. Ces composés, non saturés, sont constitués par deux cycles penta et hepta carbonés. Nous retrouvons dans ce groupe le chamazulène (des essences de camomille et de matricaire).

* Pour **n = 4**: les *diterpènes* qui sont des dérivés d'hydrocarbures en **C₂₀**. Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines. Ainsi que d'autres composés organiques tels que les alcools, acides, esters, aldéhydes, cétones et éthers par exemple...

De ce fait, l'utilisation des deux colonnes de polarités différentes (l'une polaire et l'autre apolaire) s'impose pour augmenter la probabilité d'identification des composés tel qu'il a été rapporté par Jennings [61]. De toutes les phases stationnaires commercialisées la plupart des analyses des H.E par GC se sont focalisées sur deux types de phases dites phases « étalons » :

- La diméthyl polysiloxane (P.M.S) ou méthylsilicone. Apolaire sur l'échelle de Mc Reynolds [62]
- La polyéthyléneglycol (P.E.G), polaire.

De plus les comités scientifiques d'analyses de diverses sociétés savantes recommandent l'utilisation de ces deux types de phases stationnaires, dans l'analyse des produits naturels et particulièrement les huiles essentielles [63-64].

En vue d'une identification rigoureuse, les indices de rétention proposés à la base par Kovats ont été largement utilisés dans l'analyse des huiles essentielles.

Théoriquement, ces indices sont obtenus dans des conditions isothermes. Or, en pratique, c'est le mode de programmation de température qui est le plus utilisé pour les mélanges complexes présentant des constituants balayant le plus souvent un large domaine de point d'ébullition, de poids moléculaires, de polarité...etc.

Aussi, pour l'analyse des huiles essentielles en programmation de température, nous avons adopté l'équation proposée par Van Den Dool et Kratz [65-66] pour le calcul d'indice I_p et préconisé par la norme AFNOR N°T 75-401.

L'identification se fait par comparaison des indices de rétention des composés contenus dans un chromatogramme d'une huile essentielle à ceux des étalons purs soit par:

- Des données dans la littérature [67-68] sur les deux phases « étalons ».
- Ou les travaux rapportant l'analyse des H.E du citron et du lavandin en GC particulièrement ceux utilisant une phase stationnaire apolaire (OV101, SE 30) [3,12,69].

Dans tous les cas ci-dessus, l'analyse a été effectuée sur une seule phase stationnaire, et l'identification est faite par comparaison des indices de rétention.

Néanmoins, cette analyse est complétée par d'autres techniques spectrométriques telles que: la spectrométrie de masse (M.S), l'infrarouge (I.R), l'ultraviolet (U.V), la chromatographie en phase liquide ou encore la résonance magnétique nucléaire (R.M.N).

Pour notre part, la phase stationnaire retenue est la CP SIL 5CB (méthylsilicone, équivalente à l'OV101) apolaire dans le cas des deux essences de citron¹ et du lavandin¹ (commerciales).

Pour les autres huiles essentielles de citron, lavandin, marjoram, camomille, persil et de menthe (naturelles) ainsi que pour la menthe arvensis (commerciale) la phase stationnaire retenue est la DB-5 apolaire.

Afin de confirmer ou d'infirmer les composés présents dans les deux huiles essentielles par la méthode utilisée précédemment (la chromatographie en phase gazeuse) et d'en identifier d'autres, nous avons jugé utile d'avoir recours à une autre technique instrumentale plus sensible : le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation par impact électronique GC-MS-EI. Elle permet l'identification des différents constituants des essences dans notre cas et l'élucidation structurale des produits naturels.

L'usage croissant de cette technique a porté ses fruits en donnant des informations concernant la fragmentation des différentes familles des terpènes par exemple [70].

L'introduction des colonnes capillaires en GC-MS fut aussi très bénéfique ; elle simplifie l'identification des composés connus et contribue à la détermination structurale des nouveaux composés dans les mélanges complexes [71- 16].

Grâce à sa haute résolution et à sa grande sensibilité (de l'ordre de ng) [72-78], le couplage GC-MS sur colonnes capillaire constitue actuellement la méthode d'analyse préférentielle pour les mélanges complexes tels que les huiles essentielles.

Ainsi, cette technique peut nous renseigner sur la masse des ions fragmentés les plus importants ce qui constitue un indice majeur pour différencier des huiles essentielles d'une même espèce mais d'origines différentes par exemple [71].

Nous avons effectué l'analyse pour :

- Les deux huiles essentielles commerciales de citron et du lavandin sur la même phase stationnaire qu'en GC : CPSIL 5CB, dans le but d'obtenir le même profil chromatographique.
- Les huiles essentielles extraites naturellement de menthe poivrée, lavandin, citron et de camomille ainsi que l'huile essentielle de menthe arvensis sur une phase stationnaire DB-5 en GC et d'une autre phase stationnaire de type HP-5 en GC-MS.
- Les deux huiles essentielles de marjoram et de persil sur la phase stationnaire DB-5 seulement en GC et cela pour le peu d'huile qu'on a à notre disposition.

II-2- Résultat et discussion

II-2-1- Composition relative de l'huile essentielle de persil

Une injection en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG/DIF), munie d'une colonne de type DB-5 de l'huile essentielle des fruits de persil nous a permis d'identifier avec certitude les temps de rétention des composants de cette huile essentielle.

La figure 12 représente le chromatogramme de l'huile essentielle des fruits de persil injectés sur cette phase.

Nous avons essayé de détecter tout les pics figurant sur le chromatogramme de 0 min jusqu'à 60 min ; c'est-à-dire un étalement du chromatogramme FID.

Figure 12 (a) : de 5 min à 20 min du pic 1 jusqu'au pic numéro 22. De 20 min à 60 min représente la figure 12 (b) où les pics identifiés sont le pic 34 (myristicine), pic 35 (elimicine), pic 37 (apiole) et le pic 44 qu'on n'a pas pu identifier.

Nous donnons dans le tableau 16 les composés identifiés, les temps de rétention et les données bibliographiques qui ont contribué à identifier ces composés.

Tableau 16 : Composition chimique de l'huile essentielle de persil

Temps de rétention (1)	Indices de rétention (2)	Molécule identifiée (3)	% dans l'H.E.	Indices de rétention (4)
7,808	904	-	1,372	-
8,942	936	α -pinène	8,60	943
10,317	974	sabinène	0,265	981
10,450	978	β -pinène	7,99	989
12,417	1029	Limonène	3,884	1038
13,600	1059	γ -terpinène	1,003	1066
14,825	1089	p-Cymenane	0,551	1097
15,767	1111	Linalool	1,66	-
17,525	1153	Camphor	0,695	-
17,975			0,272	
18,342	1172	Terpinène-4-ol	0,970	-
19,275	1194	α -terpinéol	1,772	-
32,175	1518	Myristicine	14,39	1529
33,392	1551	Elimicine	1,084	1550
34,958	1593	1-Allyl-2,3,4,5-tétramethoxy-benzene	0,598	1591
38,00	1678	Apiole	51	1690
47,242	1972	-	0,153	
53,692	2192	-	0,143	
55,117	2245	(diterpène)	0,977	

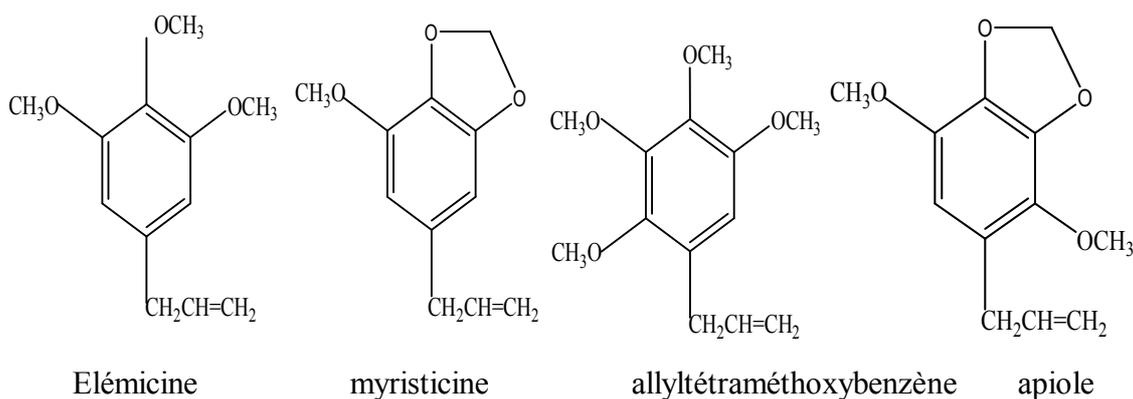
(1) Exprimé en minutes, (2) Indices de Kovalts (3) Composants identifiés parGC (4) % relative dans l'huile essentielle (5) Indices donnés par Hui Zhang [79] .

Le profil aromatique de l'huile essentielle des fruits de persil est très variable et les éthers-oxydes phénoliques sont prépondérants. Jork et Stahl [80-81] distinguent les races chimiques; myristicine, apiole et allyltétraméthoxybenzène, alors que les fruits renferment majoritairement l'un ou l'autre de ces composés.

Les monoterpènes (Tableau 16, **Figure 12**) sont monocycliques (phellendène, limonène, terpinène) ou bicycliques (α pinène et β pinène, sabinène). Les pinènes sont les monoterpènes dominants.

Les arylpropènes sont en plus grande quantité que les monoterpènes avec près de 51% en apiole, 0,6% en allyltétraméthoxybenzène, 14% en myristicine et 1,2% en élémicine. Ce sont des éthers-oxydes phénoliques à chaîne latérale insaturée. Le noyau benzénique peut présenter des groupements $-OH$, $-OCH_3$, ou des ponts méthylènedioxy $-O-CH_2-O-$. Ces résultats sont en accord avec les recherches de V. Looli [82].

Nous donnons ci-dessous les formules de ces composés.



Pour ces derniers composés, la myristicine caractérise le persil frisé (Caillard), alors que c'est l'apiole pour le persil géant d'Italie (Clause). Le persil commun (Vita) peut être considéré comme un chymotype intermédiaire, riche à la fois en myristicine, allyltétraméthoxybenzène et apiole.

Selon les recherches de Lamarati [83] les fruits de persil présentent un faible pourcentage en sesquiterpène qui a été déterminé par le trans β farnesène 0,2%. Dans notre cas, nous n'avons détecté aucun sesquiterpinène ; les mêmes résultats ont été constatés par Hui Zhang [79].

L'huile essentielle des fruits diffère de celles des feuilles. Ces dernières ne présentent jamais de grande quantité d'allyltétraméthoxybenzène [84-85] comme c'est le cas pour les fruits de persil. Elles renferment d'autres composés volatils comme le 1,3,8-*p*-menthatriène [86]. Par ailleurs, la teneur en monoterpènes est plus élevée.

II-2-2 Composition relative de l'huile essentielle de camomille

L'huile essentielle contenue dans les fleurs se caractérise en grande partie par la présence d'azulène. Elle a été obtenue par hydrodistillation des fleurs et présente un aspect de liquide mobile, d'une couleur bleue et d'une odeur caractéristique, aromatique.

La figure 13 présente le chromatogramme CG/FID de l'huile essentielle de camomille. Les principaux constituants de cette huile essentielle sont consignés dans le tableau 17

Tableau 17 Composition chimique de l'huile essentielle de camomille

Temps de rétention (1)	Indices de rétention (2)	Molécule identifiée (3)	Données spectrales (4)	% dans l'H.E.(5)
13,708	1061	γ -terpinène	25353	0,789
18,1	1166	Bornéol	40391	0,134
18,375	1173	Terpinène -4-ol	40503	0,185
26,658	1373	α -copaène	89659	tr
27,1	1384	β -bourbonène	89648	0,505
30,083	1462	Trans β farnesène	89697	26,95
30,842	1482	germacreneD	89658	3,261
31,00	1469	germacrèneB	89664	0,21
31,367	1496	Bicyclogermacrène	89653	1,484
31,742	1506	α farnesène	89675	2,256
31,95	1512	α -sinensal	103821	0,547
36,117	1625	Bisabolol oxide B	124158	0,300
37,117	1653	Bisabolone oxide	122068	6,937
38,092	1680	α bisabolol	108203	3,029
38,317	1687	Bisabolol oxide A	124227	9,465
40,567	1760	Azulène	69610	22,209
44,517	1888	1,6-dioxaspiro[4.4] non-3-ène	212923	2,871
44,767	1896	Pentacosane	85300	0,843
61,508	2498	Hexatriacontane	260486	0,764

(1) Exprimé en min, (2) Indices de Kovalts (3), (4) Banque de données Wiley 275, (5) % relative dans l'huile essentielle.

Ce tableau regroupe les temps de rétention, les indices de rétention, la molécule identifiée et la composition en % ainsi que les données spectrales.

On peut conclure que les composés identifiés en CPG sont confirmés par la CPG/MS. Les principaux composants de l'huile essentielle de camomille sont : le *trans* β -farnesène, l'azulène et le bisabolol oxide A. Leurs relatifs pourcentages dans les fleurs sont 26,95%, 22,209%, 9,465% respectivement.

Le pourcentage en *trans* β -farnesène est le plus important en terpénoïdes et celui de l'azulène vient en second après le *trans* β -farnesène et cela par rapport aux quantités des autres constituants de l'huile essentielle.

Les recherches de Piccaglia et Marotti [87] ont montré les différentes compositions de l'huile essentielle de camomille sur les différentes sources cultivées en Egypte. Ils ont trouvé que le bisabolol-oxide A présente 53,6% alors que la quantité en bisabolol-oxide B est près de 9,5% en HE. Nos résultats montrent que le bisabolol oxide A présente un pourcentage près de 9,465% et celui du bisabolol oxide B est d'environ de 0,3%. Alors que, le biabolone oxide est classé parmi les composants majoritaires de l'HE puisqu'il est présent en quantité égale à 7%. Ces résultats sont en accord avec les recherches de Petra.K [88].

Salamon [89], mentionne que l' α -bisabolol, l'azulène, le farnesène et les bisabolol-oxides sont les terpénoïdes les plus importants dans l'huile essentielle de camomille.

Le même auteur ajoute que la présence de l' α -bisabolol et l'azulène en plus grande quantité dans HE de camomille, constitue un biotype thérapeutique actif.

La présente data indique que *trans* β -farnesène est relativement en plus grande quantité que l'azulène.

Les études de Assan Salem [90] montrent que le bisabolo-oxide A et l'azulène sont les composés majoritaires avec une composition de 68% et 14% respectivement en huiles essentielles de camomille cultivé en Egypte

Selon Povh et al [91], les composés majoritaires de l'huile essentielle de camomille sont le β - farnesène (9,42%), l'azulène (20,9%) et le bisabolol oxide A (7,8%). Alors que selon les recherches de S. Scalia [92], le bisabolol oxide A renferme 36% en HE, le β -farnesène (12,8%) et l'azulène près de 0,5%.

II-2-3 Composition relative de l'huile essentielle de marjoram

Les composés identifiés ainsi que leurs indices de rétention, temps de rétention et leurs relatives proportions dans l'ordre d'éluion sur la colonne apolaire (DB-5) sont regroupés dans le **Tableau 18**. A partir des 50 composés séparés par la CPG, 29 composés sont identifiés. L'identification des composés est basée sur l'utilisation des données de rétention (ordre d'éluion et indices) calculés en programmation de température.

La figure 14 représente le chromatogramme (CPG) de l'huile essentielle du marjoram.

Injecté sur la colonne DB-5, nous avons essayé de détecter tout les pics figurant sur le chromatogramme de 0 min jusqu'à 60 min c'est-à-dire un étalement du chromatogramme FID.

Tableau 18 : Composition chimique de l'huile essentielle de marjoram

Composants (1)	Temps de rétention (2)	Indices de rétention	% HE(3)	Bibliographie (4)
α -Thujène	4,800	937	0,065	1,19
Sabinène	7,858	976	41,5	5,11
B-pinène	10,508	980	0,573	0,35
Myrcène	11,150	998	0,143	-
A-phellandrène	11,300	1002	0,182	-
Cis ocimène	12,267	1026	0,103	-
Limonène	12,458	1030	1,315	-
Trans –ocimène	12,267	1033	0,103	-
Γ-terpinène	13,650	1060	0,153	13,94
Terpinolène	14,025	1069	0,110	2,94
Cis sabinène hydrate	15,325	1101	0,475	9,64
Linalool	16,033	1118	0,194	2,8
Cis-p-menth-2-en-1-ol	16,983	1140	0,145	-
Camphor	17,250	1146	0,575	-
Isobornéol	17,608	1155	15,945	-
Bornéol	18,033	1165	5,555	-
Terpinène-4-ol	18,458	1175	18,083	30,41
Trans piperitol	18,600	1178	0,319	0,55
p-cymène-8-ol	18,842	1184	0,183	-
Cis piperitol	19,142	1191	0,197	0,62
A-terpinéol	19,500	1199	0,672	4,47
Nerol	20,117	1214	0,294	0,95
Géranol	21,133	1238	0,564	0,95
Bornyl acétate	21,75	1252	0,784	-
Thymol	23,425	1291	2,456	-
Carvacrol	23,658	1297	1,14	-
β –élémente	27,833	1403	0,743	-
B-caryophellène	28,683	1425	0,204	2,17
Bicyclogermacrène	31,95	1512	0,421	-
Spathulenol	35,933	1620	2,42	0,51
Benzyl benzoate	39,725	1732	0,781	-

(1) Composants majoritaires identifiés, (2) Exprimé en minutes,

(3) % relative dans l'huile essentielle (4)% en HE donné par C.Busatta [93].

Les composés prédominants sont sabinène (41%), terpinène-4-ol (18%), bornéol (5%), isobornéol (**15%**), *cis*-sabinène hydraté (0,4%), thymol (2,4%), spathulenol (2,42%), β -élémente (0,743%), benzyl benzoate (0,781%), bornyl acétate (0,784%), α -terpinéol (0,197%) et le limonène(1,315%) qui constituent 87% de l'huile essentielle de marjoram obtenue par hydrodistillation.

Selon les travaux de R .R Vera [94], le terpinène 4-ol présente une composition de 38%. Elle est d'environ 15% pour le *cis*- sabinène hydrate.

Les recherches d'E.Vàgi [95] sur l'huile essentielle du marjoram montrent qu'en plus du terpinène4-ol (composé majoritaire 30%), le γ -terpinène qui présente 14% en l'huile essentielle et que le *cis*- sabinène hydraté est en faible quantité. Ces résultats sont en accord avec les recherches de Baratta et al. [96], Novak et al [97] et ceux des travaux de Daferea et al. [98]. Par contre l'analyse par CPG de l'huile essentielle du marjoram effectuée par C. Busatta [93] montre que le *cis*-sabinène hydraté est un des composés majoritaires (10%) ainsi que le sabinène qui est de 6% de la quantité en huile essentielle

La recherche d'huile essentielle de marjolaine a prouvé que la composition volatile change avec l'origine de la plante [99] donc, il convient de noter que la dégradation du sabinène donne un exemple des transformations chimiques de l'huile essentielle lors de l'hydrodistillation. Les fréquentes modifications chimiques du sabinène ont été étudiées par KOEDAM et al [100]. Ils constatent qu'en milieu acide dilué, ce composé se transforme en terpinèn-4-ol, réaction déjà signalée par O. WALLACH [101]. Divers auteurs ont confirmé ce résultat et montré que le réarrangement du sabinène produit en plus du terpinèn-4-ol, de l' α -terpinène, du γ -terpinène et du terpinolène représentés à la **figure 15**

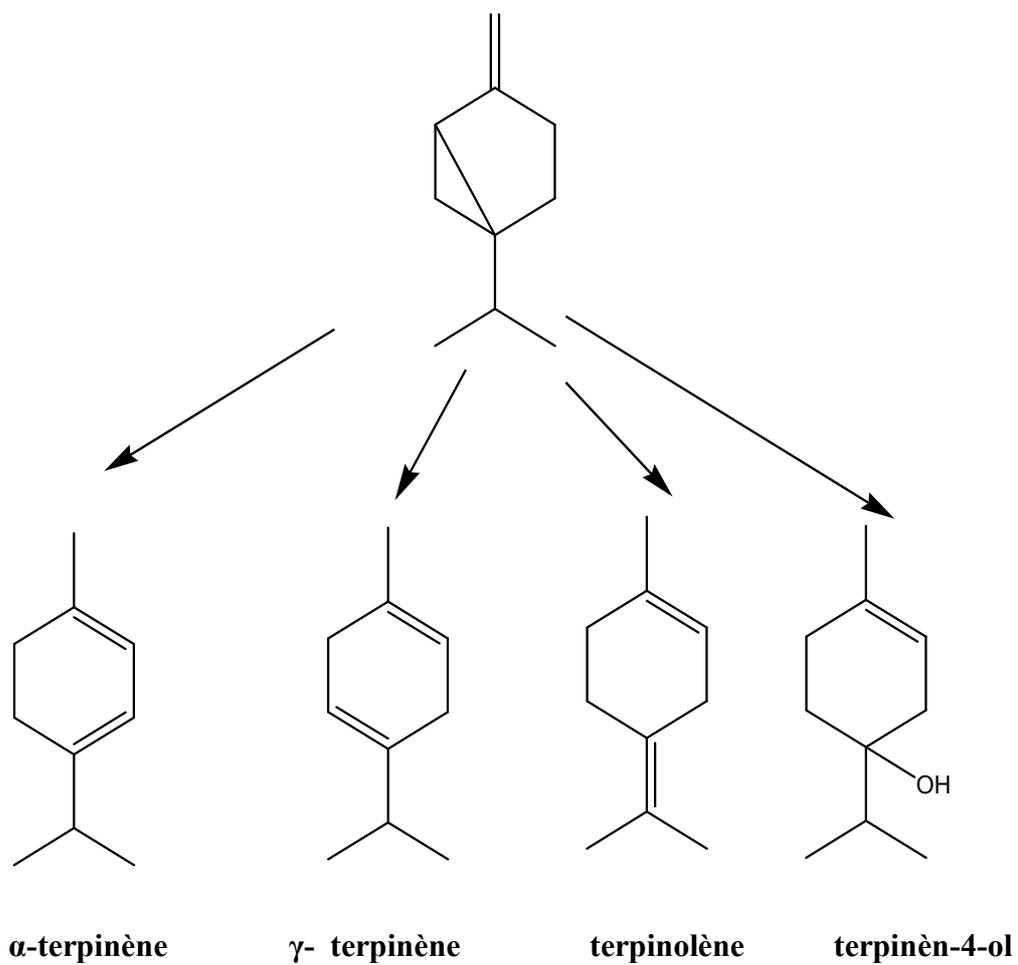


Figure 15 Principales transformations chimiques du sabinène lors de l'hydrodistillation.

II-2-4 Composition relative de l'huile essentielle de menthe poivrée

L'analyse de l'huile essentielle de menthe poivrée a été conduite dans un premier temps à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG/DIF), munie d'une colonne de type (DB-5) afin d'étudier les chromatogrammes par corrélation des indices de KOVATS et de la bibliographie. Le tableau 19 et la **figure** 16 montrent les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Tableau 19 : Résultats d'analyse par GC sur la DB-5 de l'HE de menthe poivrée

Temps de rétention ⁽¹⁾	Indices de rétention	Composants ⁽²⁾	Bibliographies ⁽³⁾
8,958	936	α -pinène	935
10,475	979	β -pinène	978
12,458	1030	Limonène	1031
12,617	1034	1,8 cinéole	-
17,850	1160	Menthone	-
18,158	1168	Néomenthol	-
18,900	1185	Menthol	-
19,250	1193	Néoisomenthol	1193
21,183	1239	Pulegone	-
21,758	1252	Piperitone	-
23,483	1293	Menthyl acétylate	-
28,375	1417	β -caryophyllène	1418
30,683	1478	β -selinène	-

(1) Exprimé en minutes, (2) Composants majoritaires identifiés par GC

(3) Indices de rétention donné par [102].

Dans un deuxième temps, nous avons injecté l'huile essentielle en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-MS), afin d'optimiser la séparation des molécules constituant l'huile, aussi bien les composés majoritaires que minoritaires.

La méthodologie ainsi que les caractéristiques des appareils ont été décrites dans la partie expérimentale. Les résultats sont portés *tableau 20*. Ce tableau rassemble les données expérimentales à savoir le temps de rétention, les pourcentages des différentes molécules, les données spectrales de CPG/MS, ainsi que le nom de la molécule identifiée et les données bibliographiques qui ont contribué à identifier ces molécules. Ce tableau présente également les composants majoritaires identifiés.

les résultats montrent que les composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de *menthe poivrée* sont des monoterpénoïdes dont le: menthone, pulégone, menthol, pipéritone, menthyl acétate et le 1,8-cinéole. Trois monoterpènes sont identifiés α -pinène, β -pinène et le limonène, trois sesquiterpènes ont été identifiés comme des composés minoritaires : β -boubonène, β -selinène et le *D*-germacrène, le globulol,

caryophyllène oxide et le spathulénol sont des sesquiterpènes oxygénés. Ainsi qu'un composé volatil non-terpénique a été identifié ; c'est le 3-Octanol.

Tableau 20 : Résultats d'analyse par GC-MS sur la DB-5 de l'HE de menthe poivrée

Tr (1)	Composants identifiés	% HE
3,96	α -pinène	t
4,49	3-Octanol	t
6,04	β -pinène	t
6,23	Limonène	1,6
7,10	1,8 cinéole	7,15
9,20	Globulol	10,2
10,27	Menthone	25,34
10,65	Néomenthol	t
13,18	Menthol	51,17
16,97	Néoisomenthol	t
17,09	Pulegone	t
17,46	Piperitone	t
18,12	Menthyl acétyate	5,9
18,55	Néomenthyl acétate	t
19,83	β -Boubonene	0,42
20,00	β -caryophyllène	t
20,18	D- Germacrène	0,50
20,45	β -selinène	0,20
20,83	Spathulénol	t
21,10	Caryophyllène oxide	0,30

Tr ; temps de rétention ; t = trace (< 0,05%)

Les composés majoritaires identifiés sont le menthol 51%, menthone 25%, 1,8-cinéole 7% et le menthyl acétate a 6%.

La concentration en huiles essentielle des composants volatils peut être classée en trois catégories ; les composants se trouvant à l'état de trace sont <1%, les minoritaires < 10% et les composants majoritaires sont > 10%.

Les résultats obtenus indiquent que les monoterpénoïdes ; monthone, menthol, menthyl acétate et le 1,8-cinéole sont les composés volatils caractéristiques à l'huile essentielle de *mentha pipérta*. Les résultats de l'analyse qualitative et quantitative de cette huile essentielle sont en accord avec ceux trouvés par Piccaglia et Marotti [103] et d'autres chercheurs [104-106].

II-2-5 Composition relative de l'huile essentielle de lavandin

Pour notre part nous avons complété notre analyse par la GC de l'huile essentielle du lavandin, par les couplages de la GC à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation par impact électronique.

La figure 17 présente le chromatogramme GC/FID de l'huile essentielle du lavandin.

Le tableau 21 regroupe les résultats obtenus par la GC et la GC-MS.

- Par comparaison des résultats obtenus en GC, nous constatons que globalement l'ordre d'élution de constituants des huiles essentielles n'a pas changé à l'exception de quelques uns. Cette inversion serait due principalement à :
- La différence de la longueur de la colonne en GC et en GC-MS-EI.
- Au vide du spectromètre de masse $P_{\text{sortie}} = 10^{-4}$ Pa. Ceci peut changer le débit de colonne.
- L'épaisseur du film de la phase stationnaire qui peut être différent.

Tableau 21: Composition chimique de l'huile essentielle de lavandin

Temps de rétention (1)	Indices de rétention (2)	Molécule identifiée (3)	Données spectrales (4)	% dans l'H.E.	% dans l'H.E. (5)
8,958	936	α -pinène	25202	3,914	-
9,458	950	camphène	25160	1,313	-
10,458	978	β -pinène	25224	0404	-
10,733	986	Octen-3-ol	25276	0,270	-
10,942	992	β -myrcène	25355	2,038	-
11,717	1012	delta -3-carène	25363	1,310	-
12,258	1025	p-cymène	23459	2,058	-
12,433	1030	limonene	25371	0,214	0,3
12,558	1033	1,8 cinéole	40619	0,886	0,6
15,833	1113	linalool	40593	39,747	32,4
17,425	1150	camphor	37916	0,801	0,5
18,017	1164	borneol	40594	0,523	0,8
18,558	1177	terpinène-4-ol	40552	4,131	-
19,108	1190	α -terpinéol	40614	0,427	-
19,700	1204	nérol	40019	0,863	-
23,267	1287	linalyl acetate	80871	16,126	43,1
23,358	1290	lavandulyl acetate	80888	4,276	-
24,782	1370	géranyl acétate	80884	0,066	
27,917	1405	neryl acétate	80895	4,065	-
28,667	1425	β -caryophyllene	89657	0,897	4,9
28,992	1460	<i>trans</i> - β -farnesene	89697	0,097	
30,375	1470	d-germacrène	89579	4,685	-
31,717	1506	gamma-Cadinène	89347	1,419	-

(1) Exprimé en min, (2) Indices de Kovalts, (3), (4) Banque de données Wiley 275, (5) % relative dans l'huile essentielle, (6) % en HE donné par [107].

L'identification chimique et l'estimation quantitative de l'huile essentielle de lavandin montre que cette huile contient comme composés majoritaires ; le linalool (39,7 %), le Linalyl acétate (16%), le α -pinène (3,9 %), le p-cymène (2%), le terpinène-4-ol (4%) , le lavandulyl acétate (4,2%), le néryl acétate (4%), le nérol (0.8%), le camphor (0,8%) et le *d*-germacrène (4,6%).

Linalool et linalyl acétate constituent près de 55% de l'huile essentielle considérés comme des composés majoritaires (> 10%).

Des résultats similaires ont été obtenus par différents auteurs [107-109]. Dans tous les cas, la molécule de linalool et de linalyl acétate semble être le composé majoritaire et dans certains cas être le plus actif biologiquement [110].

Selon M .G Evandri (2005), la plante du lavandin renferme 43% du linalyl acétate et 32% du linalool.

Selon [111], l'eucalyptol et le camphor sont les composés majoritaires et qui constituent 76% en huile essentielle du lavandin

Les recherches effectuées sur la composition chimique de l'huile essentielle du lavandin ont montré que cette huile contient majoritairement des monoterpénoides et des sesquiterpénoides [112-117].

II-2-6 Composition relative de l'essence de citron

L'essence contenue dans les fruits se caractérise en grande partie par la présence de limonène. Elle a été obtenue par expression des fruits et présente un aspect de liquide mobile, d'une couleur incolore à jaune claire et d'une odeur caractéristique, aromatique.

Les principaux constituants (figure 18) de l'essence sont des monoterpènes (le limonène (53 %), le β -pinène (15%), le γ -terpinène (11%), α -pinène (3,1%), myrcène (2,4%)), le linalool (0,9%), alcool monoterpénique et le géraniol (3,6%) comme aldéhyde monoterpénique, le linalyl acétate 2,2% comme acétate d'ester. Ces résultats sont consignés dans le tableau suivant ; à savoir leurs temps de rétention, indices de rétention, les données spectrales ainsi que le pourcentage en essence.

Tableau 22 : Composition chimique de l'huile essentielle de citron

Temps de rétention (1)	Indices de rétention (2)	Molécule identifiée (3)	Données spectrales (4)	% dans l'H.E.(5)
9,000	937	α -pinène	25202	3,185
10,600	982	β -pinène	25224	15,169
10,983	993	Myrcène	24955	2,411
12,792	1038	limonène	25367	53,088
13,767	1063	γ -Terpinène	25032	10,802
19,150	1191	α -Terpinéol	40614	1,001
21,217	1240	Linalyl acétate	80902	2,209
22,467	1269	Geranial	37928	3,652

(1) Exprimé en min, (2) Indices de Kovats, (3) et (4), banque de données Wiley 275, (5) % de composés dans l'huile essentielle par rapport à la composition chimique totale.

Le spectre GC du citron présente 15 pics, nous avons pu identifier 11 pics dont les composés majoritaires sont le β -pinène (15%), le limonène (53%) et γ -terpinène (11%).

Des résultats similaires ont été obtenus par différents auteurs [118-120]. Dans tous les cas le limonène est le produit majoritaire avec des pourcentages différents, dont le β -pinène constitue 12.8%, le γ -terpinène 8% alors que le limonène, qui caractérise l'essence de citron, renferme près de 68%.

L'analyse complémentaire GC-MS de cette essence a confirmé les composés proposés par la GC et nous a permis d'identifier d'autres composés, ces derniers se trouvant à l'état de trace ; on peut citer l'isoterpinolène, le camphène, le terpinolène et le citral avec des coefficients de sûreté de l'identification (Banque de données Wiley 275) de 91%, 90%, 87% et 96% respectivement.

II-2-7 Composition relative des huiles essentielles commerciales de citron, lavandin et de menthe arvensis

Les chromatogrammes (GC-MS) des deux essences de citron et de lavandin injectées sur la phase CP SIL 5 CB sont représentés sur les figures 19 et 20.

L'injection des alcanes et des huiles essentielles a été faite suivant une programmation de température choisie, sur la phase CP SIL 5 CB.

La tentative d'identification des constituants de l'H.E de citron et de l'H.E de lavandin a été effectuée par le calcul d'indices de rétention selon l'équation de Van Den Dool pour cela un mélange d'alcane de $C_5 - C_{26}$ est injecté deux fois par jour dans les mêmes conditions que les essences.

Le chromatogramme de l'huile essentielle de citron obtenu présente 23 pics, alors que celui de l'huile essentielle de lavandin présente 30 pics. Certains sont élus à très haute sensibilité (composés en traces), d'autres comme les hydrocarbures terpéniques sortent par contre à faible sensibilité.

Le chromatogramme de l'huile essentielle de citron présente peu de pics. Ceci peut s'expliquer aussi par une dégradation possible de certains constituants conduisant à la formation de nouveaux composés au sein de l'huile (hydrolyse des esters, oxydation des hydrocarbures et aldéhydes). Ce fait est lié surtout aux conditions de stockage, ainsi que la durée de conservation qui sont des facteurs pouvant jouer sur l'augmentation ou la diminution du nombre de constituants de l'essence.

Pour notre part, nous avons complété notre analyse par la GC des deux huiles essentielles du citron et du lavandin par les couplages de la GC à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation par impact électronique.

Notre analyse a été effectuée sur la même phase stationnaire qu'en GC : CPSIL 5CB, dans le but d'obtenir le même profil chromatographique.

L'identification d'un composé est fait par :

- Comparaison des spectres de masse obtenus à ceux des produits purs donnés en littérature [121-129].
- Une recherche informatisée en bibliothèque 'Library Search'.
- Utilisation des données de rétention (ordre d'élution et indices) [130-135].
- Etude des fragmentations.

II-2-7-1 Composition relative de l'huile essentielle de citron

Les constituants majoritaires de l'huiles essentielle de citron sont assignés dans le tableaux 23.

Tableau 23: Composition relative de l'huile essentielle de citron

Temps de rétention (1)	Indices de rétention (2)	Composants ⁽³⁾	% dans l'H.E.	Fragments GC/MS (4)	I _P ⁽⁵⁾
13,629	960	camphène	5,00	93.121.91.107.136.79.55.77	953
14,058	972	sabinène	1,3	93.91.77.136.79.94.80.92	976
15,058	998	myrcène	1,1	93.69.91.79.136.77.121.94	992
15,837	1019	limonène	80	93.68.136.121.67.79.91.119	1032
17,012	1050	γ -terpinène	3,2	93.91.136.121.77.92.79.105	1062
24,596	1368	geranial	2,00	69.84.94.152.53.123.83.109	1252

(1) Exprimé en min, (2) Indices de Kovalts, (3), (4) Banque de données Wiley 275, (5) Indices de Kovalts donné par [136].

Le tableau 23 montre que le limonène est le composé majoritaire (80%). Se rapprochant ainsi de sa composition dans l'huile essentielle de lime, de Mexique type B [2].

En accord avec les observations de M.Tiziana [6] sur l'huile essentielle commerciale de citron, le limonène est le composé majoritaire dont son pourcentage est de 69% .

II-2-7-2 Composition relative de l'huile essentielle de lavandin

Les constituants majoritaires de l'huiles essentielle de lavandin sont assignés dans le tableaux 24.

Tableau 24 : Composition relative de l'huile essentielle de lavandin

Temps de rétention (1)	Indices de rétention (2)	Composants ⁽³⁾	% dans l'HE	GC-MS ⁽⁴⁾	I _P ⁽⁵⁾
15,679	1015	1,8cinéole	13,95	93.136.68.121.154.108.91.81	1035
16,171	1028	limonène	4,37	93.91.77.136.7994.80.92	1032
18,386	1113	linalool	45,68	71.70.55.97.69.93.83.57	1101
21,862	1174	terpinène-4-ol	1,98	136.111.93.86.69.43.41	1180
24,517	1242	linalyl acétate	14,43	93.69.121.136.68.79.107.91	1246

(1) Exprimé en min, (2) Indices de Kovalts, (3), (4) banque de données Wiley 275, (5) Indices de Kovalts donné par [136].

Les principaux composés de l'HE de lavandin identifiés sont le linalool (45%), linalyl acétate (14%) et le 1,8 cinéole (14%) correspondant aux pics numérotés 7, 17 et 4 respectivement. Cette essence se rapproche beaucoup de sa composition dans le lavandin abrial [50].

L'ordre de constituants identifiés sur la CPSIL 5 CB des deux essences devient : monoterpènes hydrocarbonés, monoterpènes oxygénés (alcools, aldéhydes, esters), sesquiterpènes hydrocarbonés.

A la lumière des résultats obtenus dans les tableaux 6 et 7, nous pouvons remarquer que la différence d'indices de rétention ΔI_p entre ceux des constituants des huiles essentielles et ceux publiés est élevée. Ceci pourrait être du à plusieurs facteurs :

- Le changement des conditions expérimentales d'un laboratoire à un autre (débit, température de la colonne, vitesse de programmation,...)
- La différence de polarité entre des phases stationnaires dites équivalentes (SE 30, OV 101, CPSIL 5 CB,...)

Cette équivalence, du point de vue de la polarité sur l'échelle de Mc Reynolds, n'entraîne pas forcément les mêmes valeurs, des constantes de Rohrshneider - Mc Reynolds, ce qui explique en partie, les légères différences des indices. Pour une même phase stationnaire, le degré de polymérisation peut varier.

- De plus la proportion relative de chaque constituant peut influencer la valeur d'indice, notamment les composés majoritaires. En effet, cette valeur peut varier puisqu'elle est estimée à partir du temps de rétention pris au sommet du pic chromatographique et non au début de ce dernier.

- Enfin, le vieillissement des colonnes capillaires est un facteur à ne pas négliger.

II-2-7-3 Composition chimique de l'huile essentielle de menthe arvensis

Le tableau 25 regroupe les principaux constituants de l'huile essentielle de menthe arvensis.

Tableau 25: Composition chimique de l'huile essentielle de menthe arvensis

Temps de rétention (1)	Indices de rétention (2)	Molécule identifiée (3)	Fragments GC/MS (4)	% dans l'H.E.(5)
8,967	937	α -pinène	96%	0,354
10,475	982	β -pinène	97%	0,400
12,433	1030	limonène	98%	1,840
17,300	1140	isopulegol	99%	0,889
17,750	1158	menthone	98%	27,803
18,108	1167	néomenthol	91%	11,165
18,700	1180	menthol	91%	38,758
20,142	1214	pulegone	96%	0,919
21,792	1253	Piperitone	97%	3,698
23,442	1292	isomenthyl acétate	91%	6,821
27,017	1400	β -bourbounène	98%	0,501
34,417	1579	caryophyllène oxide	99%	0,960

(1) Exprimé en minutes, (2) Indices de Kovalts, (3) Composants majoritaires identifiés, (4) Coefficient de sûreté de l'identification (Banque de données Wiley 275), (5) % relative dans l'huile essentielle

Complémentairement aux analyses CPG-FID, nous avons injecté l'huile essentielle commerciale de menthe arvensis en Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectromètre de Masse. Les analyses CPG/MS ont permis d'acquérir les spectres de masse des différents composés constituant les huiles essentielles. Les

identifications chimiques ont été réalisées sur la base de la comparaison de nos spectres de masse avec ceux de la banque de données Wiley275.

Les injections sont manuelles avec une micro seringue de 1 μ L munie d'un répéteur. Par ailleurs, nous avons également calculé les indices de rétention de chaque composé que nous avons pu ensuite comparer avec les données de la littérature [137]. La méthode est donnée dans la partie expérimentale.

Les résultats (tableau 25, figure 21) montrent que les composés identifiés de l'huile essentielle de menthe arvensis sont des monoterpènes ; α -pinène (0,3%), β -pinène (0,4%), limonène (1,8%), des monoterpénols ; le menthol (38%), l'isopulegol (0,8%) et le néomenthol (11%). Le menthone (27%), la pèpéritone (5%) sont des monoterpénones. Comme ester terpénique, nous avons détecté l'isomenthyl acétate (6,8%).

β -bourbounène (0,5%) et le caryophyllène oxydé (0,9%) sont des sesquiterpènes. Deux composés volatils non-terpéniques sont identifiés : le 2,5 hexadione et le 3,7-diméthyl-1,6-octadiène et qui n'ont pas été cités dans la littérature ainsi que le (+) *trans* carane. Ces derniers ont été détectés par GC/MS dont leurs numéros de référence (banque de données Wiley275) sont 11908, 26886 et 26826 avec un pourcentage de pureté de 38%, 55% et 93% respectivement.

Dans l'huile essentielle de menthe arvensis les composants majoritaires sont le menthol 38%, le menthone 27% et le néomenthol près de 11%. Des résultats similaires ont été obtenus par différents auteurs [138- 139].

II-3- CONCLUSION

L'analyse des cinq huiles essentielles du lavandin, menthe, camomille, marjoram, persil et de l'essence de citron par la GC qualitative a permis de faire une première tentative d'identification. Toutefois, cette technique doit être suivie par d'autres techniques instrumentales plus sensibles telle que le couplage de la GC à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation par impact électronique GC-MS-EI, dans un double but de confirmer les composés proposés et d'en identifier d'autres se trouvant à l'état de trace.

Ainsi, l'analyse des trois huiles essentielles commerciales de citron, lavandin et de menthe arvensis nous a permis de faire une comparaison avec ceux extraites naturellement.

La complexité des mélanges volatils (H.E) a nécessité d'avoir des techniques de séparation de grande efficacité et de haute résolution. Une meilleure rentabilité de cette technique est due à son couplage à la spectrométrie de masse : le chromatographe sépare les constituants du mélange complexe et le spectromètre de masse joue la fonction du détecteur très sensible.

Quoique cette technique instrumentale est complémentaire à la chromatographie seule, ne permette pas toujours d'obtenir une résolution complète pour des mélanges complexes tels que les huiles essentielles.

Pour remédier à ce problème, nous devons compléter notre étude par d'autres techniques instrumentales qui trancheront entre les composés majoritaires et minoritaires d'une part et entre les stéréo-isomères d'autre part.

II-4-PARTIE EXPERIMENTALE:

II-4-1- Chromatographie en phase gazeuse

$$I_p = 100 \times Z + 100 \times n \frac{t_{RS} - t_{Rz}}{t_{R(z+n)} - t_{Rz}} \quad \text{éq.1}$$

Où:

t_{RS} : Temps de rétention absolu du soluté étudié.

t_{Rz} : Temps de rétention absolu de l'alcane à z atomes de carbone qui précède le soluté.

$t_{R(z+n)}$: Temps de rétention absolu de l'alcane à (z+n) atomes de carbone qui suit le soluté.

n: Différence du nombre d'atome de carbone entre les deux alcanes (généralement n=1).

a- Chromatographie en phase gazeuse des huiles essentielles commerciales

Chromatographe Alltech Capillary Column, (licensed by H.P Company). Muni d'un:

- Détecteur à ionisation de Flamme F.I.D.
- Le gaz vecteur est l'Helium.
- Le volume injecté est de 0,2 μ l, température du détecteur 260°C, température injecteur 250°C
- La longueur de la colonne est de 30 mètres. Le diamètre interne est de 0,25 mm. La température de la colonne est 75°C (5mn) 4°/min 200°C (20mn).

b- Chromatographie en phase gazeuse des huiles essentielles naturelles

Le chromatographe est de type Shimadzu: GC 17 A, muni d'une colonne DB-5 de longueur 30 mètres et diamètre interne 0,25 mm. Le Détecteur est de type à ionisation de Flamme F.I.D. La température du détecteur et l'injecteur est 250°C, alors que celle de la colonne est de 60°C (3mn) 3°/min 240°C (3mn). Le gaz vecteur utilisé durant l'analyse est l' N_2 . La vitesse d'élution est de 1ml/min. Le volume d'H.E injectée est 0,2 μ l

II-4-2- GC-MS-EI des huiles essentielles commerciales

Selon la nature de l'huile essentielle (HE), nous avons utilisé deux types de colonnes pour la séparation des pics. Ainsi :

- **H.E de citron**, Colonne 60m

- **H.E de lavandin**, Colonne 30m

La température dans chacune des deux colonnes est 60°C (5mn) 5°C/mn 280°C.

La température dans l'injecteur, égale à celle du détecteur, est de 250°C.

Le gaz vecteur est l'Hélium. L'élution des produits est faite à un débit 0,8ml/mn. La phase stationnaire est de type CPSIL 5CB avec un diamètre égal à 0,25µL

II-4-3- GC-MS-EI des huiles essentielles naturelles

L'appareil est de type AGILENT 6890, muni d'une colonne capillaire en silice fondue de longueur 30m et diamètre 0.25mm. La phase stationnaire est de type HP5MS. Le gaz vecteur utilisé est l'Helium avec un débit 1ml/mn. Pour la séparation des composés un potentiel d'ionisation égale à 70 eV est imposé.

La température dans chacune des deux colonnes est 60°C (2mn) 2°C/mn 220°C.

La température dans l'injecteur, égale à celle du détecteur, est de 250°C.

III-1 Introduction

Les composants des huiles essentielles sont génériquement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique, ce qui peut prêter à confusion. Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable. La plupart sont **poly-moléculaires**, c'est à dire composées d'une grande diversité de composés (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'huile essentielle de Rose). A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces.

Les huiles essentielles sont aussi **homogènes** ou **hétérogènes** dans leur composition au regard de la structure chimique des composés. Extrêmement nombreux - près de 10000 sont chimiquement définis - on peut les grouper dans les différentes familles de composés chimiques.

Les composés des huiles essentielles ont une masse moléculaire relativement faible (terpènes : 136 u.m.a., terpénols : 154 u.m.a., et sesquiterpènes : 200 u.m.a.), ce qui leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives.

Lors de l'étude des HE par la CPG un problème se pose le choix du procédé le plus approprié à mettre en œuvre ainsi que les conditions opératoires les plus adéquates. Le choix de la phase stationnaire est primordial : c'est le principal facteur intervenant dans la séparation et il dépend du mélange à analyser.

En général on peut schématiser le problème en disant que la polarité de la phase doit correspondre à celle des produits considérés [140-142] .

Ainsi pour un échantillon contenant des composés peu polaires, une phase apolaire est tout indiquée et inversement.

Pour un mélange d'hydrocarbures terpéniques une température relativement basse (60°-80°) permet une bonne séparation. Les composés polaires, moins volatils nécessitent pour leur élution une température plus élevée.

Lorsqu'on a affaire à un mélange complexe comprenant des constituants à polarité et à volatilité variées l'utilisation de la programmation de température

s'impose : ceci consiste à commencer à faible température et à augmenter celle-ci progressivement selon un programme bien choisi [143-144].

Dans ce cas les substances légères les plus rapides apparaissent à température relativement basse, les substances lourdes, plus lentes, sont accélérées au cours de l'opération.

L'identification des composants des huiles essentielles se fait sur la base de la comparaison des indices de rétention obtenus pour le mélange analysé avec ceux donnés dans la littérature.

Aussi, les indices calculés en programmation de température se sont révélés être le plus efficace lors de l'identification de leurs constituants. Néanmoins, les valeurs des indices de rétention des étalons purs différents d'un laboratoire à un autre et cela en utilisant la même équation de Van Den Dool et Kratz.

Pour recalculer ces indices nous nous sommes proposés d'utiliser une deuxième équation proposée par Golovnya et dans un double but de les comparer avec ceux obtenus précédemment.

Toutefois ces valeurs ne sont pas identiques et l'écart peut atteindre même quelques unités voir même des dizaines.

Dans le tableau 26 nous regroupons les valeurs des indices de rétention de quelques composés sur deux phases de polarités différentes.

Notre objectif est :

- D'utiliser une nouvelle équation non linéaire à quatre paramètres qui permet l'extrapolation et l'interpolation des indices de rétention [145].
- Avoir plusieurs conditions de programmation.
- De savoir l'avantage de cette nouvelle équation en la comparant avec celle de Van Den Dool[65-66].

Tableau -26 : Les valeurs d'indices de rétention de certains composés données dans la littérature.

Composé	Polaire			apolaire		
	I _p A	I _p B	I _p C	I _p A	I _p B	I _p D
p-cymène	1266	1272	1286	1010	1020	1005
Limonène	1197	1206	1220	1020	1092	1028
Linalyl acétate	1559	1538	1544	-	1246	1242
αPinène	1017	1039	1032	-	942	940
δTerpinène	1243	1189	1210	1045	-	1056
Trans carvéol	-	1790	1780	-	1209	1211
Carvone	-	1715	1698	1213	1228	1263
Caryophylène oxyde	1984	2000	1919	1568	1576	1576
Myrténol	1798	-	1742	1190	-	-

A : indice donné par Brice [146] C : indice donné par Davies[61]
B : indice donné par Baaliouamer [56] D : indice donné par Benchikha [147]

III-2 Résultats et discussion

En raison de difficultés rencontrées lors de l'identification par GC moyennant les indices de rétention exemple les différences obtenues sur une même phase tableau 26.

Afin de remédier à ce problème nous nous sommes proposé d'utiliser une deuxième équation.

Une nouvelle équation à quatre (04) paramètres afin de remédier à l'écart d'indices. L'équation permet l'extrapolation et l'interpolation de l'indice de rétention avec la précision des conditions expérimentales en programmation de température.

Pour cela, nous avons opté pour trois conditions de programmation de température, en changeant deux paramètres.

- 1)- 60°C (5min) 4°/min 200°C (15min)
- 2)- 70°C (5min) 4°/min 200°C (15min)
- 3)- 60°C (5min) 8°/min 200°C (15min)

Sur une colonne capillaire polaire CBWAX 20M : appartient à la série des polyéthylènes glycols.

Nous avons soumis nos étalons à toutes les conditions expérimentales citées ci-dessus. Les résultats sont regroupés dans le tableau 27 et le tableau 28.

En gardant la température initiale constante $T_0 = 60^\circ\text{C}$ nous avons injectés nos huiles essentielles de citron et du lavandin avec des vitesses de programmations différentes c'est à dire à 4°/min et à 8°/min les résultats sont regroupés dans le tableau 29 et le tableau 30 respectivement.

Les indices de rétention sont calculés selon deux équations de Golovnya et celle de Van Den Dool.

III-2-1 Equation de Golovnya

$$I_p = A_n + B_n t'_n + C_n \ln t'_n + \frac{D_n}{t'_n}$$

Les coefficients A_n , B_n , C_n et D_n sont calculés en utilisant le temps de rétention corrigés t' .

Cette nouvelle équation dite de Golovnya est une équation universelle simplifiée et développée pour les calculs des paramètres de rétention d'une série homologue en GC. Les indices de rétention des étalons injectés et les composés identifiés par GC des deux huiles essentielles sont calculés selon les deux équations précitées. Pour cela un mélange d'alcane est injecté sous les mêmes conditions d'injection des étalons purs. Au regard des résultats nous remarquons que :

La différence d'indices de rétention et ceux publiés est élevée ceci peut être expliqué par :

- la programmation de température non parfaitement linéaire en passant d'une expérience à une autre, étant donné que nos échantillons ne sont pas injectés le même jour.
- le changement des conditions expérimentales d'un laboratoire à un autre (débit, température de la colonne, vitesse de programmation...).

vis-à-vis des deux programmations $T^\circ=60^\circ\text{C}$ et $T^\circ=70^\circ\text{C}$ la différence des indices de retentions calculés selon Golovnya dépasse les trente unités.

Ainsi on note la différence des indices de rétention entre ceux calculés selon Van Den Dool et ceux calculés selon Golovnya, cela peut être expliqué par les valeurs trouvées, pour ces derniers un système de six équations (système d'équation non linéaire) pour quatre inconnus consiste à soustraire deux équations pour obtenir quatre équations à quatre inconnus.

Chaque fois qu'on change une équation le système change donc les valeurs des paramètres changent.

III-2-2 Calcul des indices de rétention des étalons purs selon Golovnya

On note aussi que la différence des indices de rétention est calculée suivant les deux autres programmations appliquées aux deux huiles essentielles.

Exemple à $4^\circ\text{C}/\text{min}$ le linalool présente un indice de rétention égale à 1500 alors qu'à $8^\circ\text{C}/\text{min}$ est de 1529 et cela selon l'équation de Golovnya, si on passe à l'équation préconisée par la norme AFNOR.

Tableau-27 : Calcul des indices de rétention des étalon purs selon Golovnya

T ₀ =60°C		T ₀ =70°C	Composés
4°/min	8°/min	4°/min	
1076	1080	1079	camphène
1120	1104	1110	α-Pinène
1167	1171	1167	Phéllandrène
1200	1206	1203	Limonène
1220	1235	1232	1,8-cinéole
1240	1246	1260	δ-Terpinène
1260	1278	1267	p-cymène
1500	1510	1503	Camphor
1535	1539	1540	Linalyl acétate
1700	1725	1710	Carvone

III-2-3 Calcul des indices de rétention des étalons purs selon Van Den Dool

Tableau-28 : Calcul des indices de rétention des étalon purs selon Van Den Dool

T ₀ =60°C		T ₀ =70°C	Composés
4°/min	8°/min	4°/min	
1080	1080	1182	Camphène
1122	1111	1115	α Pinène
1170	1175	1169	Phéllandrène
1205	1206	1206	Limonène
1225	1230	1229	1,8-cinéole
1245	1250	1253	δTerpinène
1270	1280	1274	p-cymène
1515	1520	1509	Camphor
1532	1536	1530	Linalyl acétate
1703	1720	1712	Carvone

III-2-4 Calcul des indices de rétention de l'essence de *citrus limonum* selon Golovnya et Van Den Dool

Tableau-29: Calcul des indices de rétention de l'HE de citron selon Golovnya et Van Den Dool

I _p Selon Golovnya		I _p Selon V .D.D		I _D	Composés
4°	8°	4°	8°		
1075	1090	1080	1070	1083	Camphène
1219	1235	1218	1220	1124	αPinène
1269	1260	1272	1299	1177	Phéllandrène
1200	1201	1201	1212	1206	Limonène
1255	1253	1231	1253	1250	Trans-ocimène
1266	1270	1276	1272	1272	Cymène
1703	1730	1732	1700	1715	Carvone

III-2-5 Calcul des indices de rétention de l'HE de *lavandula* selon Golovnya et Van Den Dool

Tableau-30 : Calcul des indices de rétention de l'HE du lavandin selon Golovnya et Van Den Dool

I _p Selon Golovnya		I _p Selon V .D.D		I _D	Composés
4°	8°	4°	8°		
1036	1037	1003	1015	1038	βPinène
1077	1070	1070	1089	1083	Camphène
1122	1123	1110	1136	1124	αPinène
1215	1240	1224	1240	1228	1,8cinéole
1244	1253	1248	1259	1251	δterpinène
1500	1529	1501	1523	1506	linalool
1508	1500	1500	1530	1518	Camphor
1530	1511	1530	1548	1538	Linalyl acetate

Nous remarquons que le δ terpinène a un indice de rétention près de 1248 à 4°C/min par contre à 8°C /min est de 1259.

On note aussi que la différence des indices de rétention des étalons purs et ceux publiés n'est pas importante, mais elle atteint à 10 unité pour le limonène, Les deux chromatogrammes des deux huiles présentent peu de pics avec un pic de concentration importante de l'huile essentielle de citron à 80% (limonène) et de deux pics pour celle du lavandin à une concentration de 45% pour le linalool et 20% pour le linalyl acétate.

III-3 Conclusion

Les résultats obtenus justifient la recommandation de cette équation à quatre paramètres pour le calcul des indices de rétention en programmation de température. Son avantage a été démontré quand quelques membres de n-alcanes d'une série homologue manquent.

Cette équation permet l'extrapolation et le calcul de l'interpolation des valeurs de I_p avec précision expérimentale.

Les coefficients de l'équation sont calculés en ajustant les temps de rétention.

Il est préférable d'utiliser plusieurs programmations, dans notre cas nous avons fait varier que la température initiale et la vitesse de programmation. Cette étude devrait être complétée par le changement d'autres paramètres tels que la longueur de la colonne.

Ainsi que pour une série de n-alcanes non complète les valeurs des indices de rétention ne seront pas les mêmes calculés pour une série de n-alcanes complète. Ou étendre cette investigation à une colonne apolaire.

III-4 Partie expérimentale

La chromatographe est de type Shimadzu: GC-14B, muni d'une colonne CB Wax 20M de longueur 50 mètres et diamètre interne 0,32 mm. Le Détecteur est de type à ionisation de Flamme F.I.D. La température du détecteur est de 220°C celle de l'injecteur est 180°C, alors que celle de la colonne est de;

1)- 60°(5min) 4°/min 200°(15min)

2)- 70°(5min) 4°/min 200°(15min)

3)- 60°(5min) 8°/min 200°(15min)

Le gaz vecteur utilisé durant l'analyse est l' N_2 , avec un débit de 41cm/s. Le volume d'H.E injectée est 0,2 μ l

IV-1 Introduction

les huiles essentielles ont été utilisées en médecine populaire depuis plusieurs siècles .

Toutefois leur effet antimicrobien n'a été étudié qu'au début du siècle, permettant ainsi leur introduction dans le domaine pharmaceutique . Ce n'est qu'entre 1920 et 1924 que l'effet antimicrobien des huiles volatiles a été signalé par Macht et Kunket ainsi que par Dyche – Teague, tels que les ont cité Morris et al [148]. Bien plus tard, Maruzella et al ont décrit l'activité antibactérienne et antifongique de quelques huiles essentielles, ainsi que celle de leurs constituants, comme l'a rapporté Prakash [149].

Notre objectif est :

- D'une part, d'évaluer le pouvoir ou le potentiel inhibiteur des huiles essentielles du citron, lavandin, marjoram, persil, menthe et du camomille et de leurs composés majoritaires vis-à-vis de 6 (six) bactéries, une levure et un champignon.
- D'autre part, d'essayer de déterminer la synergie des huiles essentielles naturelles du citron, lavandin et des trois essences de citron, lavandin et marjoram dans différentes proportions vis-à-vis des mêmes micro-organismes.

IV-2 Matériels et Méthodes :

IV-2-1 Les souches :

Les souches testées proviennent du laboratoire de bactériologie du secteur sanitaire de Biskra (Bachir Ben Nacer) et du laboratoire d'analyse médicale (Aloui). Elles sont toutes d'origines humaines. Dans le tableau –31- nous donnons un aperçu sur la classification et les caractéristiques des souches testées.

IV-3 Résultats et Discussion:

IV-3-1 Détermination de l'activité inhibitrice des H.E seules par deux méthodes :

* Les différents résultats de l'activité des H.E seules par la méthode des disques et de la C.M.I, sont rassemblés dans les tableaux 32 et 33 respectivement.

* Nous pouvons noter globalement la présence d'une activité antibactérienne pour

toutes les essences.

* L'essence du lavandin, marjoram et de la menthe sont celles qui donnent des zones d'inhibition les plus nettes par rapport à l'essence de citron, du persil et du camomille.

*En ce qui concerne les bactéries à gram-négatif :

-seule *P.m* est sensible à 2 et 3 mg/disque et qui donne lieu à des zones d'inhibitions de 10 et 11mm respectivement vis-à-vis de l'essence de citron les deux autres étant résistantes (*E.c* et *P.a*) . Toutefois l'essence de lavandin donne des zones d'inhibitions, avec cette dernière plus large que celle obtenues avec l'essence de citron . Elle présente une zone d'inhibition de 20mm pour l'essence de du lavandin, et de 11mm pour l'essence de citron et cela à 3mg/disque.

-Vis-à-vis de la même bactérie (*P.m*) et à 3mg/disque l'essence du marjoram donne une zone d'inhibition encore plus nette est de 24mm

-on note aussi que les deux bactéries *E.c* et *P.a* qui sont résistantes à l'essence de citron sont sensibles à toutes les essences et la sensibilité augmente en augmentant la concentration c'est-à-dire la quantité d'H.E par disque.

- l'essence de camomille donne de faible inhibition vis-à-vis de *E.c* et *P.a* a 2 et 3mg/disque elle est résistante à *P.m*.

-on remarque que l'essence de persil et celle de la menthe donnent les memes valeurs d'inhibition vis-à-vis de la bactérie *E.c* pour 2 et 3mg/disque.

Tableau31 : Aperçu sur la classification et caractéristiques des souches testées.

Famille	Gram	Genres & espèces testées	Ecologie & pouvoir pathogène [150-152]
Enterobacteriaceae	-	<i>Esherichia coli</i>	Pouvoir pathogène occasionnel (Diarrhée à <i>E-Coli...</i>)
Pseudomanadaceae	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pathogène opportuniste responsable du « Bleu pus » et diverses infections humaines.
Enterobactereaceae	-	<i>Proteus mirabilis</i>	- Nature - Hôte normal au tube digestif - Agent : entérites, otites, cystites, méningites...
Micrococcaceae	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-Intoxication alimentaire infection staphylococciques (infection cutanée, furoncle)
Micrococcaceae	+	<i>Staphylococcus blanc</i>	-Infections cutanées, sous-cutanées et muqueuses - ORL. -Infection urinaire
Sheptococcaceae	+	<i>Streptococcus α hémolytique</i>	- Infection localisée cutanée. - Septicémies endocardites. - Maladies particulières.
Levure		<i>Candida albicans</i>	Responsable des muguets, intertrigo, septicémie.

Tableau 32 : Mesure de l'activité inhibitrice des H.E par la méthode des disques

Bactéries mg/disque	Gram - Positif			Gram - Négatif			L c a	
	<i>S. b</i>	<i>S. a</i>	<i>S. α</i>	<i>E. c</i>	<i>P. m</i>	<i>P. a</i>		
Citron	2	15	13	17	R	10	R	12
	3	17	16	23	R	11	R	
Lavandin	2	20	19	23	11	15	11*	14
	3	24	22	32	13	20	11*	
Majoram	2	20	21	27	13	17	12	15
	3	25	28	36	14	24	13	
Persil	2	14	13	17	R	()	()	12
	3	15	14	20	R	()	()	
Menthe	2	17	15	20	12	13	16	14
	3	22	19	25	13	15	19	
Chamomile	2	15	13	17	12	13	()	16
	3	23	14	30	13	13	()	

R : Résistant
 () : Inhibition avec quelques colonies l'auréole
S. b : *Staphylococcus blanc*
S. a : *Staphylococcus aureus*
E. c : *Escherichia coli*
S. α : *Streptocoque α*
P. a : *pseudomonas aeurogenosa*
Hémolytique
L. c. a : *Levure candida albicans*
P. m : *Proteus mirabilis*

*Présence des colonies dans

*Les bactéries à gram-positif sont toutes sensibles aux deux essences, sans omettre de mentionner que les essences du lavandin, la menthe et du marjoram donnent globalement des zones plus larges. La bactérie *S.a* donne une zone d'inhibition de 23mm vis-à-vis de l'essence de citron, 32mm avec le lavandin et de 36mm avec l'essence du marjoram elle est de 27mm vis-à-vis de l'essence de la menthe et cela à 3mg/disque.

*Les bactéries à gram-positif sont les plus sensibles, suivies par la levure, et enfin celles à gram-négatif.

Sensibilité : Gram positif > levure > Gram négatif.

*vis-à-vis de toutes les essences la levure *L.c.a* présente des zones d'inhibitions nettes.

* à 2mg/disque la levure *L.c.a* donne une inhibition de 12mm avec les deux essences de citron et du persil alors qu'elle est de 15mm vis-à-vis du marjoram, 14mm avec la menthe et le lavandin. Avec la camomille elle est de 15mm avec quelques colonies.

*Ces résultats sont confortés par ceux de la C.M.I c'est à dire que les bactéries à gram-négatif sont plus résistantes, par exemple *P.a* donne une C.M.I supérieure à 12 mg.ml⁻¹ d'HE de lavandin, elle est de 11 mg.ml⁻¹ pour *l.c.a* et de 2 mg.ml⁻¹ vis-à-vis de *S.a*.

*la bactérie *P.m* qui est la plus sensible vis-à-vis des bactéries à gram négatif donne les valeurs les plus basses de C.M.I..

*De toutes les bactéries testées *S.a* présente C. M.I la plus basse.

*les résultats obtenus pour la bactérie *S.b* selon la méthode des disques sont confirmés par celle de la C.M.I, elle est de 8 mg.ml⁻¹ pour l'essence de citron et de 9 mg.ml⁻¹ pour l'essence de lavandin 10 mg.ml⁻¹ pour le persil et 15 mg.ml⁻¹ pour la camomille.

* la levure *L.c.a* qui donne des zones d'inhibitions plus large que les bactéries à gram négatif par la méthode des disques est confirmé par celle de la CMI.

* la levure *L.c.a* qui est plus sensible par rapport aux bactéries à gram négatif présente une CMI plus basse, *E.c* et *P.a* les deux résistantes a l'essence de citron par la méthode des disques présentent des CMI de 21 et supérieur à 28 mg.ml⁻¹ pour la levure *L.c.a* vis-à-vis de la même essence.

Tableau 33: Mesure de l'activité inhibitrice par la méthode de CMI (mg/ml).

Espèce	Gram - Positif			Gram - Négatif			L.c.a
	<i>S.b</i>	<i>S.a</i>	<i>S.α</i>	<i>E.c</i>	<i>P.m</i>	<i>P.a</i>	
CMI citron	8	9	3	21	12	> 28	12
CMI Lavandin	9	8	2	17	14	> 12	11
CMI marjoram	7	5	1,5	11	10	13	8
CMI persil	15	15	11	17	15	23	13
CMI menthe poivrée	7	6	2	16	13	15	12
CMI camomille matricaire	10	17	14	28	23	26	13
<p><i>S.b</i> : <i>Staphylococcus blanc</i> <i>S.α</i> : <i>Streptocoque α Hemolytique</i> <i>S.a</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> <i>P.a</i> : <i>pseudomonas aeurogenosa</i> <i>E.c</i> : <i>Escherichia coli</i> <i>P.m</i> : <i>Proteus mirabilis</i> <i>L.c.a</i> : <i>Levure candida albicans</i></p>							

IV-3-2 Détermination de l'activité inhibitrice de la synergie des deux HE de citron et du lavandin par la méthode des disques

De plus, le mélange dans la proportion 1 :1 de deux essences de citron et du lavandin, la proportion 1:1:1 et dans la proportion 1:1:2 des trois essences de citron, lavandin et la majoram respectivement ont été soumis à l'analyse par la méthode des disques les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 34 , 35 et 36.

*Ainsi qu'une analyse de deux essences commerciales (SAIDAL) a été soumise à proportion 1:1 dans le but d'une comparaison.

L'examen de ces derniers montre :

*la mixture des deux huiles essentielles naturelles et commerciales de citron et de lavandin présente un effet antimicrobien

*en comparant les essences naturelles avec celles commercialisées par SAIDAL ne présentent pas une large différence.

* ces essences commerciales présentent un pouvoir inhibiteur qui est important vis-à-vis du lavandin [158].

* les zones d'inhibition obtenues sont nettement supérieures à celles obtenues pour les HE seules vis-à-vis des mêmes souches avec la même quantité d' HE utilisée (3mg/disque)

*en comparant les valeurs du tableau 34 avec celles du tableau 32 en remarque que :

-La bactérie *E.c* qui est résistante à 3 mg de l'essence de citron par disque et qui donne une zone

d'inhibition de 13 mm pour l'essence de lavandin , présente une zone d'inhibition plus large en mélangeant les deux H.E 29 mm.

De même pour autres micro-organisme restants, *S.a* et *L.c.a* les valeurs trouvées de l'activité antimicrobienne de la synergie est plus importante à celle des essences seules.

IV-3-3 Détermination de l'activité inhibitrice de la synergie des trois HE de marjoram, citron et du lavandin par la méthode des disques

*les résultats du tableau 35 montrent que l'effet de la synergie des trois essences avec la même proportion 1:1:1 est encore meilleure elle donne des zones plus larges qu'avec ceux obtenus dans le tableau 34. la levure *L.c.a* donne une zone de 21 mg/disque vis-à-vis des deux essences dans la proportion 1:1 elle est de 29mg/disque avec la proportion 1:1:1 des trois essences.

*a partir des résultats trouvés auparavant nous avons pensé a un troisième mélange dans la proportion 1:1:2 des mêmes trois essences les résultats sont regroupés dans le tableau 36

*cette proposition nous a mené a des résultats fiables, les zones d'inhibition sont encore plus nettes ce qui explique l'effet antimicrobien de l'essence du marjoram

L.c.a qui présente une zone de 21mm en mélangeant les deux essences , 29 mm avec les trois essences (1:1:1) est de 33mm vis-à-vis des trois essences dans les proportions 1:1:2.

Tableau 34 : la synergie des deux huiles essentielles de citron et de lavandin

Souches testées	<i>Eschérichia coli</i>	<i>Staphylococcus blanc</i>	<i>Levure candida albicans</i>
3(SAIDAL)	27	18.5	20.5
3 naturelle	29	23	21
(Les valeurs données sont en mm y compris le diamètre du disque qui est de 10mm)			

Tableau 35 : la synergie des trois huiles essentielles de citron , lavandin et majoram(1:1:1)

Souches testées	<i>Eschérichia coli</i>	<i>Staphylococcus blanc</i>	<i>Levure candida albicans</i>
3mg	32	26	29
(Les valeurs données sont en mm y compris le diamètre du disque qui est de 10mm)			

Tableau 36 : la synergie des trois huiles essentielles de citron , lavandin et majoram(1:1:2)

Souches testées	<i>Eschérichia coli</i>	<i>Staphylococcus blanc</i>	<i>Levure candida albicans</i>
3mg	40	30	33
(Les valeurs données sont en mm y compris le diamètre du disque qui est de 10mm)			

IV-3-4 Détermination de l'activité inhibitrice des composés majoritaires par la méthode des disques:

Les résultats (tableau 37) de l'activité inhibitrice des composés majoritaire de ces huiles essentielles montre que;

L'activité des HE peut être expliquée en partie par l'action des composés majoritaires, tels que l' α pinène qui est actif sur la bactérie *S.b* et la bactérie *S. α* , le linalool qui est actif sur *S.b*,

S. α , *P.m* et le champignon et surtout le limonène, et le linalyl acétate qui sont actifs sur *S.b*,

S. α , *P.m* et le champignon, une faible inhibition vis-à-vis de la bactérie *E.c*.

*en ce qui concerne le champignon seuls le linalool et le linalyl acétate ont une activité antifongique.

Ainsi nous avons constaté que;

S.aureus, l'une des bactéries les plus sensibles aux huiles, n'est inhibée par aucun des composés majoritaires.

Cette constatation laisse donc penser, qu'en plus des composés majoritaires d'autres composés interviennent également.

Ceci peut être aussi expliqué par des composés oxygénés issus d'une auto-oxydation. tel que le linalool, le trans pinocarvéol, le bornéol etc....présentent souvent une activité assez forte [159-163].

En effet, selon Farag et al. Hinou et al. [160,164], un composé manifeste une activité inhibitrice généralement importante lorsqu'il présente l'une des structures chimiques suivantes.

*un groupement fonctionnel polaire greffé sur un noyau aromatique ex ; thymol

* une isomérisation β tel que le β pinène.

*une structure méthyl isopropyl d'une part, et une fonction cétone ou alcool d'autre part.

Tableau 37 : Mesure de l'activité inhibitrice des composés majoritaires par la méthode des disques

Espèce mg/ml	Gram - Positif			Gram - Négatif			<i>L.c.a</i>
	<i>S.b</i>	<i>S.a</i>	<i>S.α</i>	<i>E.c</i>	<i>P.m</i>	<i>P.a</i>	
Linalool	13	tf	11	11	11	12	11
Linalyl acétate	14	-	NE	12	12	11	11,5
αPinène	11	-	11	tf	-	-	-
Limonène	12	-	11,5	-	11	11,5	12
<i>S.b</i> : <i>Staphylococcus blanc</i> <i>S.a</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> <i>E.c</i> : <i>Escherichia coli</i> <i>L.c</i> : <i>Levure candida</i> <i>S.α</i> : <i>Streptocoque α Hemolytique</i> <i>P.a</i> : <i>pseudomonas aeurogenosa</i> <i>P.m</i> : <i>Proteus mirabilis</i> <i>L.c.a</i> : <i>Levure candida albicans</i>							

IV-4 Détermination de l'activité antifongique des HE

D'autre part nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice du champignon

*les résultats sont rassemblés dans le tableau 38.

*La culture témoin a une croissance mycélienne jusqu'au 3ème jour et arrive presque en bordure de la boîte de pétri (45mm) dès le 4ème jour.

*Pour une concentration de 30mg.ml^{-1} près de 90% de la croissance fongique est inhibée par l'essence de persil alors qu'elle est proche de 80% pour l'H.E de la menthe.

*Pour une concentration de 30 mg.ml^{-1} du citron plus de 20% de la croissance est inhibée par rapport à celle du témoin.

*Aussi pour une concentration de 30 mg.ml^{-1} de l'essence du lavandin, la marjoram et l'essence de camomille la croissance fongique est inhibée à 100% par rapport au témoin.

* D'une manière générale, nous pouvons déduire que quoique relativement faible, nos essences présentent une activité antifongique telle qu'elle a été signalée dans la littérature [165-167].

L'activité des huiles essentielles vis-à-vis des souches testées a été déterminée par deux méthodes : celle des disques et celle de la détermination de la C.M.I.

La méthode des disques s'est révélée être moins adéquate dans le cas présent, en raison :

*des résultats parfois non reproductibles.

*De la diffusion des huiles qui peut être parfois non homogène.

*La détermination de la C.M.I donne des résultats plus fiables, mais nécessite cependant une grande quantité d'huile à tester.

Cependant d'une manière générale, nous pouvons déduire que quoique relativement faible, nos H.E présentent une activité antibactérienne tel qu'il a été signalé dans la littérature par [148-149,168-172].L'effet synergistique des H.E peut être expliqué par l'association des composants chimiques pour chaque H.E individuelle responsables de cette activité antimicrobienne, et qui donne lieu à une activité antimicrobienne encore meilleure comparativement à l'huile essentielle utilisée seule, c'est-à-dire que l'effet inhibiteur devient plus important .

Les aromathérapeutes ont montré que l'effet antimicrobien de la synergie n'est pas généralisé , et que l'utilisation des mélanges des H.E c'est pour diminuer l'odeur des H.E individuelles utilisées dans les nourritures [173].

Tableau 38 : Mesure de la croissance fongique du champignon

Nbre de jour mg/ml	0 jour	1 ^{er} jour	2 ^{eme} jour	3 ^{eme} jour	4 ^{eme} jour	% D'inhibition [153]
Témoin	4 mm	20	24	28	43**	0%
Citron 4	4 mm	19	20	27	40	7.68%
30	4 mm	14	16	20	35	20.51%
Lavandin 4	4 mm	17	19	22	30	33.33%
30	4 mm	4	4	4	4*	100%
Majoram 4	4 mm	19	22	25	30	7.69%
30	4 mm	4	4	4	4	100%
Persil 4	4 mm	15	19	20	30	33.33%
30	4 mm	4	4	10	10*	84,61%
Menthe 4	4 mm	19	22	25	35	20.51%
30	4 mm	4	10	12	13	76.92%
Camomile 4	4 mm	19	20	25	38	12.82%
30	4 mm	4	4	4	4*	100%

* Présence de quelques colonies

** Les colonies arrivent en bordure de la boîte de pétri (45 mm)

Les valeurs sont données en mm et correspondent à la croissance fongique (y compris le diamètre du disque du champignon 4 mm).

De plus dans un but de comparaison, de nos résultats obtenus pour nos HE avec ceux donnés en littérature pour les mêmes espèces (citron, lavandin, marjoram et la camomille) d'une part et avec d'autres plantes d'autre part.

Le tableau 39 regroupe les résultats donnés par ces chercheurs de l'effet inhibiteur des H.E envers les micro-organismes. Néanmoins ces derniers ne nous fournissent pas, en vue d'une comparaison efficace, des informations concernant l'origine et l'espèce, ainsi que la concentration et l'âge des huiles. Cependant, il faut préciser que des souches bactériennes appartenant à une même espèce peuvent avoir des réponses très différentes vis-à-vis d'une essence donnée. Ceci peut expliquer toutes les divergences obtenues envers *S.a* et *E.c* par Morris et al [148], et Maruzella et Lichtentein [174], B, d'une part, et notre travail d'autre part.

De plus nous avons effectué aussi une comparaison des tableau des CMI des H.E, avec celles d'autres plantes connues par leurs activités antimicrobiennes telles que :

Le cyprès, l'eucalyptus, xylopia Aethiopica et le thym (tableau40) on remarque :

Le thym est le plus actif puisqu'il donne les valeurs les plus basses.

Le citron et le lavandin semblent être plus efficaces que la plus part des autres plantes et cela vis-à-vis des mêmes micro-organismes.

La comparaison des résultats d'une même espèce (citron, lavandin, camomille, persil, menthe, marjoram, thym, cyprès, eucalyptus, xylopia aethiopica) est assez difficile pour diverses raisons.

Les souches testées ne sont pas toujours les mêmes [175] c'est à dire des micro-organismes peuvent avoir des réponses très différentes.

Enfin l'origine botanique de l'espèce semble jouer un rôle capital dans son efficacité antimicrobienne, ce qui confirme la relation étroite qui existe entre la structure chimique des constituants des H.E et l'effet antimicrobien tel qu'il a été rapporté par Farrag et al [176], Deans et al [177] et Hinou et al [178].

Tableau 39 : L'activité des H.E données par la littérature (CMI mg /ml)

HE	<i>P.a</i>	<i>E.c</i>	S.a
<i>Citrus limonum</i> [157]	NE	2,2	NE
<i>Mentha piperita</i> [157]	NE	2,5	NE
<i>Origanum Majorana</i> [157]	NE	0,920	0,782
<i>Lavandula augustifolia</i> [159]	> 2	0,5	1,0
<i>Mentha piperita</i> [159]	> 2	0,5	1,0
<i>Citrus limonum</i> [159]	> 2	> 2	2
<i>Camomille Matricaire</i> [148]	NE	1000ppm	1000ppm
<p><i>P.a</i> : pseudomonas aeurogenosa <i>S.a</i> : Staphylococcus aureus</p> <p><i>E.c</i> : Escherichia coli</p> <p>NE : test non effectué</p>			

Tableau40 : Pouvoir anti-microbien des H.E (CMI : mg/ml)

Souches plantes	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>L.c.a</i>
Thym [148]	0,75	/	0,50	/
Cyprès [154]	> 69,9	>69,9	61,1	/
Xylophia Aethiopica [155]	>2	/	1	0,125
eucalyptus [156]	> 1000 ppm	/	> 1000	1000
<p><i>S.a</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> <i>P.a</i> : <i>pseudomonas aeurogenosa</i> <i>L.c.a</i> : <i>Levure candida albicans</i> <i>E.c</i> : <i>Escherichia coli</i></p>				

IV-5 Conclusion :

Les six H.E du citron , lavandin, menthe, camomille, persil et du marjoram présentent une activité antibactérienne et antifongique.

L'H.E du lavandin donne des inhibitions plus nettes que l'H.E du citron, l'activité de ces dernières est très intéressante surtout vis-à-vis d'une bactérie pathogène comme *S.a* responsable des furoncles et intoxications alimentaires, ou encore des *candida* responsables des muguets et intertrigo. De plus, nous devons signaler l'effet antimicrobien de la synergie des trois H.E important par rapport aux deux essences et aux essences seules permettant ainsi le renforcement de l'effet inhibiteur moyennant de faible quantité d'huiles essentielles .

Le pouvoir inhibiteur des composés majoritaires vis-à-vis des mêmes souches nous a mené à penser qu'en plus de ces composés majoritaires sus-cité d'autres interviennent.

IV-6 Partie expérimentale

IV-6-1 Détermination de l'Activité Inhibitrice des H.E :

L'activité inhibitrice des H.E seules envers les bactéries a été testée par deux méthodes :

IV-6-1-1 Détermination de l'activité inhibitrice des H.E par la méthode des disques :

L'activité inhibitrice des H.E seules, des composés majoritaires et la synergie des essences

envers les bactéries est déterminée par la méthode des disques, [179,148-149,173,175,153,180-188] de 1cm de diamètre, elle consiste à mesurer la zone d'inhibition, cette dernière est matérialisée par une auréole claire autour du disque à papier .

habituellement préconisée pour les antibiotiques seules les bactéries ont été testées par cette méthode, le milieu de culture utilisé pour toutes les expériences est la gélose nutritive (commercialisée par l'institut Pasteur Alger).

Ce milieu est fondu à chaud, coulé dans des boîtes de pétri stériles (85mm) puis solidifié après refroidissement.

La stérilité des H.E a été vérifiée par un dépôt de quelques gouttes d'H.E à la surface de milieu de culture et après incubation à 37°C pendant quelques jours, l'absence totale du développement microbien, nous permet de nous assurer de leur stérilité, l'ensemencement des germes sur le milieu se fait de la manière suivante :

Les cellules bactériennes sont mises en suspension dans un tube contenant un bouillon nutritif (BN) utilisé pour *P.a*, *E.c*, *P.m* et un bouillon BHIB (bouillon qui enrichit les *staphs*) pour les *S.b* et *S.a*, et un BGT (Bouillon glucosé tamponé) pour les levures *candida* et *candida albicans*.

Une goutte de la suspension est déposée puis étalée c'est à dire ensemencée avec une pipette pasteur stérile sur toute la surface du milieu gélose.

Une fois cette étape est réalisée un volume connu d'H.E seule ainsi que pour la synergie est déposé sur des disques en papier stériles de 1cm de diamètre.

Les disques inhibés sont déposés à la surface du milieu gélosé précédemment inoculé avec la bactérie à tester les boîtes de pétri sont mises à incuber

Les lectures se font après 24h et 48h elles consistent à mesurer la zone d'inhibition les valeurs données des zones d'inhibitions représentent la moyenne de 3 mesures selon 3 axes (en tenant compte du diamètre du disque qui est de 10mm) .

IV-6-1-2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice des H.E :

Les boîtes de pétri (85mm) sont mise à incuber à 37° C après avoir inoculé le micro-organisme dans le milieu gélose, l'essence est alors ajoutée.

Pour cette détermination on utilise la gélose nutritive (liquide) et on lui ajoute différentes concentrations d'H.E le mélange est bien agité à l'aide d'un vortex, puis couler dans les boîtes de pétri de 45mm. Après solidification le milieu estensemencé avec les suspensions bactériennes préparées auparavant puis incube à 37°C dans l'étuve une culture témoin est réalisée en parallèle, les lectures se font après 24h et 48h, elles consistent à déterminer la C.M.I c'est à dire la plus faible concentration qui inhibe complètement la croissance des bactéries.

En ce qui concerne le champignon, il n'a été testé que par la méthode de C.M.I et cela est réalisée à l'aide des disques de 4mm de diamètre découpés à partir de la gélose (Gélose sabouraud) supportant la culture d'un champignon (Agée de 7 jours). Ils sont ensuite déposés sur milieu nutritif à différentes concentrations d'huile essentielle.

Les lectures se font tous les jours, pendant 4 jours, elles consistent à mesurer le diamètre des colonies mycéliennes c'est-à-dire de la croissance radiale.

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de la valorisation des produits naturels nationaux, nous nous sommes intéressés en premier lieu;

-A l'extraction par hydrodistillation des six plantes sélectionnées pour leurs propriétés biologiques, la durée de l'extraction en moyenne 2 à 3 heures de temps, elle est de 4 heures pour le persil, l'essence récupérée n'est pas exactement la même, les rendements ont été calculés à partir des matières sèches et fraîches. Les rendements en huiles essentielles sont très variables suivant les plantes, ces dernières (feuilles et fleurs) séchées donnent des rendements encore meilleurs par rapport aux plantes fraîches.

-A la caractérisation par leurs indices physico-chimiques des six huiles essentielles naturelles et de trois huiles essentielles commerciales utilisés par SAIDAL pour la préparation de quelques produits pharmaceutiques. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux donnés dans la littérature

L'indice CD spécifique aux essences a été calculé en utilisant la spectroscopie ultra-Violet. L'allure obtenue pour calculer la valeur CD de l'huile essentielle de citron ne correspond pas à celle donnée par la norme AFNOR. Ce qui laisserait penser que cette dernière ne soit pas une essence naturelle. L'analyse spectroscopique Infrarouge à transformée de Fourier elle aussi a été effectuée.

En second lieu, nous avons pu effectuer l'analyse fine des six huiles essentielles naturelles ainsi que les trois huiles essentielles commerciales par les méthodes suivantes :

-La chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire apolaire DB- 5 sur toutes les huiles essentielles et la colonne CPSIL5CB sur les essences de citron et du lavandin commerciales nous a permis de proposer les constituants des HE à partir des données de rétention.

-A partir des chromatogrammes obtenus nous avons dressé des tableaux qui indiquent les proportions relatives de toutes nos huiles essentielles.

-Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse en mode d'ionisation par impact électronique des huiles essentielles sur une colonne apolaire nous a permis de confirmer les composés proposés par la GC et d'identifier d'autres se trouvant à l'état de trace, les résultats obtenus ont été comparés avec ceux donnés par la littérature.

La prise de conscience par les chercheurs et les industriels de l'importance de ce champ d'investigation s'affirme chaque jour d'avantage. Par exemple, connaître le ou les responsables de la saveur caractéristique d'une plante ou d'un fruit est une des raisons de l'étude qualitative et quantitative des HE.

L'analyse poussée d'une HE permet d'identifier à côté des constituants majeurs déjà connus bien d'autres qui apportent leurs contributions à la formation du bouquet spécifique même s'ils existent en très petites proportions.

D'autre part, une autre analyse chromatographique en phase gazeuse en programmation de température a été effectuée, sur une colonne capillaire polaire CB Wax 20M, pour trois différentes conditions, et qui nous a permis de proposer une deuxième équation (équation de Golovnya) pour le calcul des indices de rétention et dans un second but de la comparer avec celle donnée par V.D.D

Cette équation a été appliquée pour le calcul des indices de rétention de l'essence de citron et du lavandin extraites naturellement. L'analyse complète d'une huile essentielle reste une œuvre de longue durée même en utilisant les méthodes les plus modernes de séparation et d'identification.

Enfin, et dans un but d'une évaluation biologique nous avons soumis nos essences à des tests microbiologiques vis-à-vis de six bactéries, trois à gram positif et trois à gram négatif, une levure et un champignon. Pour ce faire, l'activité antibactérienne et antifongique a été déterminée des essences seules ainsi que celle de la synergie des trois huiles essentielles de citron, marjoram et du lavandin avec des proportions différentes.

Les résultats obtenus montrent que les six H.E du citron, lavandin, menthe, camomille, persil et du marjoram présentent une activité antibactérienne et

antifongique. L'H.E du lavandin, camomille et la menthe donnent des inhibitions plus nettes que l'H.E du citron et du persil l'activité de ces dernières est très intéressante surtout vis-à-vis d'une bactérie pathogène comme *S.a* responsable des furoncles et intoxications alimentaires, ou encore des *candida* responsables des muguets et intertrigo.

De plus, nous devons signaler l'effet antimicrobien de la synergie des trois H.E important par rapport aux deux essences et aux essences seules permettant ainsi le renforcement de l'effet inhibiteur moyennant de faible quantité d'huiles essentielles. Le pouvoir inhibiteur des composés majoritaires vis-à-vis des mêmes souches nous a mené à penser qu'en plus de ces composés majoritaires d'autres interviennent.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Boutkedjinet C., **1999**, *Thèse de Doctorat*, Dpt: Génie Chimique EENP, Alger.
- [2] Association Française de Normalisation, **1986**, Huiles Essentielles, AFNOR 2^e édition.
- [3] Chanegriha N., Baalioumer N., Meklati, Rivista B.Y., **1994**, Italiana.E.P.P.O.S, 12,5-12;
- [4] Morris J.A, Kettry A., Seiz E.W, **1979**, J.Am.Oil Chem Soc,56(5),595-603.
- [5] Prakash S., Sinha G.K, Phatal R.C., **1972**, Indian.Oil Soap J., 37s(9),230-2.
- [6] Rios , J.L., Recio, M.C. and Villar, A., 1988, Journal of Ethnopharmacology, 23, 127-149
- [7] Pibiri Marie-Cécile, **2006**, *Thèse de doctorat*, Lausanne.
- [8] Cu J.Q., **1990**, *Thèse de doctorat*, Institut Nationale Polytechnique, Toulouse, France.
- [9] Tedder J.M., **1970**. Basic Organic Chemistry. Ed. John Wiley & Sons. New York.
- [10] Brunechon J., **1987**, Pharmacognosie, Ecole Technique de Documentation, Ed. Ravoilie.
- [11] Pellecuer J., Roussel J.L Andary C., **1980**, Rivista Italiana Essenzo (EPPOS), 23, 45-50.
- [12] Bourrel C., **1993**, *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique, Toulouse, France.
- [13] Langenheim J.H., **1969**, Amber: A botanical Inquiry. *Science*. 163 (872), 1157-1169.
- [14] Chanegriha N., Foudil-cherif Y., Baaliouamer A., Meklati B.Y., **1998**, Rivista Italiana E.P.P.O.,2511-16,
- [15] Farrag R.S., DAW Z.Y., Hewedi F.M., **1989**, El-Baroty,J.Food Protect.,52(9), 665-667.
- [16] Lens-Lisbonne C., Cremieux A., Maillard C., Blansard G., **1987**, J.Pharm Belg.,42(5), 297-302,.
- [17] Hinou J.B., Harval C.E., Hinou E.B., **1989**, Pharmazie, 44(4), 302-3.
- [18] Inouye S., Watanabe M., Nishiyama Y., Takeo K., Akao M., Yamaguchi H., **1998**, Mycoses, 41,403-410.
- [19] Massouti V., Viano J., Gaydou E.M., **1998**, Fitoterapia volume LXIX, 5.
- [20] Stassi V., Verykokidou E., Loukis A., Harvala C., Philianos S., **1996**, Flavour and Fragrance Journal, 11,71-74.
- [21] Lis-BalchimM., Deans S.G., Ealglesham E., **1998**, Flavour and Fragrance Journal, vol 13, 98-104.
- [22] Mc Kane L., Kandel J., **1985**, Microbiology, Essential and Application, Mc Graw Book Company.
- [23] Bosson L., Dietz G., **2004**. "L'aromathérapie Energétique: Guérir avec l'Ame des Plantes" Bruxelles.

- [24] Bruneton, J., **1999**, "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales" Editions Tec & Doc, Editions Médicales Internationales (1120).
- [25] Mailhebiau, P., **1994**, "La nouvelle Aromathérapie: Biochimie Aromatique et Influence Psychosensorielle des Odeurs" Lausanne, (635).
- [26] Borrel, T., **2000**, "Les Infections Nosocomiales, Cours Maladie", L'homme et son Environnement. Université Lumière Lyon II.
- [27] Valnet J., **1984**, Aromathérapie, Traitement des Maladies par des Plantes, Maloine S.A. Editeur Pris,.
- [28] Maruzella J.C, Lichtentein M.B, **1956**, J.AM. Pharm, Ass, 65(6), 378-381.
- [29] Journal of Ethnopharmacology, **2007**, 111, 341-364
- [32] Journal of Supercritical Fluids, **2004**, 30,163-174.
- [34] Extraction High-Tech pour Notes Fraiches, **1997**, P.Toursel, Process, 1128, 38-41.
- [35] Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R., **2004**, Journal of Chromatography A, 1025, 105-113.
- [36] Otto, Marius-p, l'Industrie des Parfums d'après les Théories Modernes, **1995**.
- [37] Edward P claus, Varro E.T., Lynn R.B., **1987**, Pharmacognosy Sixth Edition.LEA et Febiger (Ed), 184-187.
- [38] Marta Cristina.T.D, Ewerton Eduardo Leme, Camilia D., **2007**, Journal of Ethnopharmacology, 111, 197-201.
- [39] Koedam A., **1987**, Some Aspects of Essential Oils Preparation in Capillary Gas Chromatography in Essential Oils Analysis. Ed. P. Sandra, C. Bicchi. Herdelberg. New York.
- [40] Morin P., Gunther C., Peyron L., Richard H., **1985**, Bull. Soc. Chim. Fr., 5, 921-936.
- [41] Morin. P., Richard H., **1985**, 4 fh Weurman Flav. Res. Symp. Ed Elsevier Sci. Amsterdam. 563-576.
- [42] .Ganou L., **1993**, *Thèse de doctorat l'INP Toulouse, France.*
- [43] Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T., **2003**, Japan Agric Res. Quarterly, 37(4), 249-252.
- [44] Kanko C., Sawaliho B., Kone S., Koukoua G., **2004**. Study of Physicochemical Properties of Essential Oils from Lippia Multiflora, Cymbopogon Citrates, Cymbopogon Nardus, Cymbopogon Gigantescus, Comptes Rendus Chimie, 7(10-11), 1039-1042.

- [45] Valnet J., **1984**, Aromathérapie, Traitement des Maladies par des Plantes, Maloine S.A. Editeur Paris.
- [46] Chanegriha N., Foudil-cherif Y., Baaliouamer A., Meklati B.Y., **1998**, Rivista Italiana. E.P.P.O., 2511-16.
- [47] Baaliouamer A., **1978**, *Thèse de Magister*, ex. Fac. des Sciences Alger.
- [48] Guenther E., **1949**, The Individual Essential Oils of plant Families Rutaceae and Labiatae, Vol III.
- [49] Daurvault l'officine XXII^e Ed, Revue sous la direction de Leclerc J. et Hzebroucq G.
- [50] Badjah Hadj Ahmed A.Y., **1978**, *Thèse de Magister*, ex. Fac. des Sciences Alger.
- [51] Morrin P., **1988**, *Thèse de Doctorat Es Science*, Université de Pierre et de Marie Curie, Paris, France.
- [52] Schreier P., **1985**, Zeitschrift Fur, le Benslittel Untersuchung Und.Forschung, 181(3), 183-188.
- [53] Labo guide pratique de chimie méthodes d'analyse, **1984**, ed, Française: Labo.ed. Deltaet Spes S.A., CH-1026 Denges, 4, 197-214.
- [54] J. M. Purcell, P.Magidman, **1984**, Applied Spectroscopy, 38(2), 181-184.
- [54] Losing G., Degener M., Matheis G., **1998**, Spectroscopy, N°4.
- [55] Yahiaoui, PFE, **1992**, Dpt : Génie Chimique. ENP.
- [56] A.Baaliouamer, **1987**, **Thèse de Doctorat**, ex. Fac. des Sciences Alger.
- [57] M. Gerin. **2002**. Solvants industriels : Santé, Sécurité, Substitution. Collection médecine du travail. Ed. Masson. Masson, Paris.
- [58] Cristea D., **2003**, Thèse de Doctorat n° 2035, Institut National Polytechnique de Toulouse, France
- [59] Shibamoto T., **1981**, Journal of Chromatography. Sci., 15, 455-509.
- [60] Lieshout M.V., Rio Derks, Hans-Gerd Janssen, Carel. A. Cramers, Hight J., **1998**, Resol. Chromatogr, 21, (11) 583-586.
- [61] Jennings W.G., **1980**, Gas Chromatography With Glass Capillary Columns, 2nd Ed., Academic Press, New York.
- [62] Mc Reynolds W.O., **1970**, Journal of Chromatography, 8, p 685.
- [63] Analytical Methods Committee: Analyst, **1988**, 113, p 1125.
- [64] Analytical Methods Committee: Analyst, **1988**, 105, p 262.
- [65] Van Den Dool H., Kratz P.D., **1963**, Journal of Chromatography, 11, 453.
- [66] Van Den Dool H., **1974**, *Thèse de Doctorat*, Rotterdam.
- [67] Jennings W., Shibamoto T., **1980**, Qualitative Analysis of Flavors and Fragrance

- Volatils by Glass Capillary, Gas Chromatography, Academic Press, New York,
- [68] Davies N., **1990**, Journal of Chromatography, 503, 1-24.
- [69] M.Y Boumghar, 1989, thèse de Magister, E.N.P , Alger.
- [70] Enzel C., Appelton R.A., Wahlberg I., **1972**, Biochemical Applications of Mass Spectrometry, Ed. George, R. Waller and Willey Interscience.
- [71] Enzel C., Wahlberg I., **1980**, Biochemical Applications of Mass Spectrometry, Ed. George, R. Waller and Willey Interscience.
- [72] Audier H., Bory S., Fétizon M., **1964**, Soc. Chim. 5^e série - Mémoires.
- [73] Vernin G., Petitjean M., Metzger J., **1983**, Parfums, Cosmétiques, Arômes 51, 43.
- [74] Vernin G., Metzger J., Fraisse D., Scharff C., **1983**, Parfums, Cosmétiques, Arômes, 52, 51.
- [75] Adams R.P., Granat M., Hogge L.R., Von Rudloff E., **1981**, Journal of Chromatography.
- [76] Chien M., **1985**, Anal. Chem, 57, 348.
- [77] Mc Lafferty W., Venkataraghavan R., **1979**, J; Chromatog. Sci., 17, 24.
- [78] Zamureenko V. A., Kluyev N.A, Dmitriev L.B, **1984**, J. Chromatog., 303, 109.
- [79] Zhang H., Freng Chen., Xi Wang., Hui-Yuan Yao., **2006**, J. Food Research International 39, 833-839.
- [80] Jork H., **1963**, *Dissertation*, Chemische Rassen bei Petroselinum Hortense HOFFM. Und Asarum europaeum L., Univ., Saarbrucken,.
- [81] Stahl E., Jork H., **1964**, Arch. Pharm., 297(5), 273-281.
- [82] Louli V., G Folas., E Voutsas., K Magoulas., **2004**, J. of supercritical Fluids 30, 163-174.
- [83] Lamarati A., Badoc A., Deffieux G., **1994**, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 133, 73-89.
- [84] Franz C., Glasl H., **1976**, Qual. Plant.- Plant Foods hum. Nutr., 25(3-4), 253-262.
- [85] Mac Leod A.J., Snyder C.H., Subramanian G., **1985**, Phytochemistry, 24, 11, 2623-2627.
- [86] Vernon F., Richard H.M.J., **1978**, Lebensm. Wiss. Technol., 16, 1, 32-35.
- [87] Piccaglia R., Marotti. M., **1993**, Flavour and Fragrance Journal, 8, 115-122.
- [88] Kotnik P., Mojko S., Zeljko K., **2007**, J. of Surepcritical Fluids 43, 192-198.
- [89] Salamon I., 1996, Phytotherapy and Irritable Bool Synorome Medi herb 3, 1, 13-16.
- [90] Assan Salem. Ayad., **1991**, *Thesis Master*. Biochemistry., Ain Shams Univ.
- [91] Povh N. P., Marcia O.M., M Angela A., **2001**, J. of Supercritical Fluids 21, 245-256.

- [92] Scalia S. , L Giuffreda., P Pallado., **1998**, J. Pharm. Biomed. Anal. 2, 549-558.
- [93] Busatta C. and al ., **2008**, Food Microbiology 25, 207-211
- [94] .Vera R.R, Chane-Ming J., **1999**, Food Chemistry 66, 143-145.
- [95] Vagi E., B Simandi., A Suhajda., E Hethelyi., **2005**, Food Research Internatinal 38, 51-57.
- [96] Baratta M.T., Deans H.J.D., and al, **1998**, Flavour and Fragrance Journal, 13, 4, 235-244.
- [97] Novac J., Bitsh C., Langbehn J. Y. and al., **2000**, Biochemical Systematics and Ecology, 28, 697-704.
- [98] Daferea D.J., Ziogas B.N., **2000**, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 2576-2581.
- [99] Roman Pavela., **2004**, Fitoterapia 75, 745-749.
- [100] Koedam A., **1987**, Some Aspects of Essential Oils Preparation in Capillary Gas Chromatography in Essential Oils Analysis. Ed. P. Sandra, C. Bicchi. Herdelberg. New York.
- [101] Wallach O., **1907**, Contributions to our Knowledge Terpenes and Ethereal Oils. Ber. Dtsch. Chem. KGes. 80, 585-591.
- [102] Robert S., Luigi M., Marriot P., Dugo G., **2002**, Journal of Chromatography A., 970, 225-234.
- [103] Piccalia R., Marroti. F., **1993**, Frag.J., 8,115-122.
- [104] Food Quality and Preference, **2004**, 15, 447-452
- [105] Field Crops Research, **2003**, 84, 229-240
- [106] International Journal of Psychophysiology, **2005**, 55, 291-298
- [107] Evandri M.G., L Battinelli., S Mastrangelo., P Bolle ., G Mazzanti., **2005**, Food and Chemical Toxicology 43, 1381-1387.
- [108] Landmann C., Barbara F., Maria F., Marta D., Karl-Heinz E., Wilfried S., **2007**, Archives of biochemistry and Biophysics 465, 417-429.
- [109] Munoz-Bertomeu ., Isabel Arrillaga., Juan S., **2007**, Biochemical Systematics and Ecology 35, 479-488.
- [110] Shellie R., L Mondello., P Marriott., G Dugo., **2002**, Journal of Chromatography A, 970, 225-234.
- [111] Mona.A.M, **1994**, *Thesis PhD., B.Sc. Agri.Biochemistry.*, Cairo.Univ.
- [112] Lawrence B.M., **1993**, Perfumer Flavorist 18,1, 53-61

- [113] Lawrence B.M., **1994**, *Perfumer Flavorist* 19,3, 33-40
- [114] Shellie R., Marriott P., Cornwell C., **2000**, *HRC J. High Resolution Chromatography* 23, 554-560
- [115] Shellie R., Mondello L., Marriott P., Dugo G., **2002**, *Journal of Chromatography A* 970, 225-234.
- [116] Fakhari A.R., Salhi P., Heydari R., Ebrahimi S.N., Haddad P.R., **2005**, *Journal of Chromatography A* 1098, 14-18
- [117] Jung J., Sewenig S., Hener U., Mosandl A., **2005**, *Eur. Food Res. Technol.* 220, 232-237
- [118] Crupi M.L., Costa R., Dugo P., **2007**, L.M., *Food Chemistry*, 105, 771-783
- [119] Elena E., Stashenko R.M., Helena Pinzon M., **1996**, J.R., *Journal of Chromatography A*, 752, 217-222.
- [120] Kevin Mac Namara, J.H., Y.H., Albert R Jr., **2007**, *Journal of Chromatography A*, 1164, 281-290.
- [121] Cornu A., Massot R., **1975**, *Compilation of Mass Spectral data: Index de Spectre de Masse*, 1 et 2, Ed. Heyden and Sons.
- [122] *Eight Peak Index of Mass spectra*, **1974**, 2, 2nd Ed, Publié par Mass Spectrometry Data Enter.
- [123] Mc Lafferty F.W., **1980**, *Interpretation of Mass*, University Science Books Publication.
- [124] Mc Lafferty F.W., **1980**, *Separation / Identification Systems Applicable to Complex Mixtures*.
- [125] Vernin G., Metzger J., Suon K.N., **1984**, *Perfumer and Flavorist*, 9, 71-86.
- [126] Ramaswani S.K., Briscese P., gargiullo R.J., Von Geldern T., **1986**, 10 th International Congress of Essential Oils, Fragrance and Flavors, Washington, B. M. Lawrence, B. D. Mookherjee and B.J. Willis Ed.
- [127] Vernin G., Metzger J., Suon K.N., Fraisse D., **1985**, *Parf. Cosmét. Arômes*, 62, 69.
- [128] Vernin G., Metzger J., **1986**, *Per. Flavor*, 11, 5, 79.
- [129] *The Willey / NBS Registry of Mass Spectral data Vol 1, Vol 2*, Fred W. Mc Lafferty / Douglas B. Stauffer.
- [130] Fraisse D., Suon K.N, Scharff C., Vernin G., Mc Vernin G., Zambotsian R.M., Metzger J., **1983**, *J. Agric. Food Chem*, 31, 982.
- [131] Tressl R., Engel K.H., Kossa M. Koppler, **1983**, *J. Agric. Food Chem.*, 31, 4, 882-97.
- [132] Vernin G., Petijean M., Fraisse D., Suon K. N., Scharff C., **1987**, *Capillary Gas*

- Chromatography in Essential Oils Analysis Chap.10, p 287, (P. Sandra et C. Bicchi ed.), Heidelberg.
- [133] Baaliouamer A., Meklati B. Y., Fraisse D., Scharff C., 1985, J. Sci Food Agric., 36, 1145.
- [134] Vernin G., Metzger J., ghiglione C., hammoud A., Suon K.N., Fraisse D., parkannys C., **1988**, Phytochem., 27, 4, 1061-1064.
- [135] Vernin G., Metzger J., **1986**, Parfum Flavor, 11, 5, 79-84.
- [136] Oliveira D.R., G.G.L., H.R.B.,D.L., S.G.L., , **2007**, Food Chemistry, 101, 236-240
- [137] Sajjadi S.E., Rahiminezhad I., Poorassar A., **2001**, J. Essent. Oil Res. 13, 43-44.
- [138] Elisabeth H. Koschier, Katrin A., **2003**, Sedy, Crop Protection 22, , 929-934
- [139] Sur S.V., Tuljupa F.M., Sur L.I., **1991**, J. Chromatography 542(2), 451-458
- [140] Humphrey A.M., **1970**, Flavour.Ind, 1, 3, 163
- [141] Mostafa Khajeh, Y.Yamini, F.S., N.B., **2004**, Food Chemistry 86, 587–591
- [142] Chen-Xi Zhao, Yi-Zeng Liang , Hong-Zhuang Fang, Xiao-Ning Li, **2005**, Journal of Chromatography A, 1096, 76–85
- [143] Griffiths J., James D., Phillips C., **1952**, Analyst, 77, 597
- [144] Waginaire I., Gattefossé. S.F.P.A., **1968**, Bull.Tech., 63, 58
- [145] Golovnya R.V., Syomina L.A., Samosenko A., **1997**, J. High Resol.Chromatgr.,Vol 20, 611-614.
- [146] Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Koukoua G., N'Guessan T.Y., Costa J., Casanova J., **2006**, C. R. Chimie 9, 164–168
- [147] Benchikha N., **2000**, *Thèse de Magister*, Université Mentouri, Constantine, Algérie.
- [148] Morris J. A., Kettry A., Seitz E. W., **1979**, J. Am. Oil Chem. Soc, 56, 5, 595-603,.
- [149] Parakash S., Sinha G.K., Phatal R.C., **1972**, Indiann Oil Soap J., 37, 9, 230-2,.
- [150] Mc Kane L., Kandel J., **1985**, Microbiology, Essential and Application, Mc Graw Book Company.
- [151] Valnet J., 1984, Aromathérapie, Traitement des Maladies par des Plantes, Maloine S. A. Editeur Paris.
- [152] Bactérie Médicale et Vétérinaire Systématique Bactérienne, **1981**, Dépôt le pal., 4, N° 1933.
- [153] Tiziana Baratta M., Damien H. J., Deans S. G., **1998**, J. Essent. Oil . Res, 10, 618-627.
- [154] Chanegriha N., Foudil- Cherif Y., Baaliouamer A., Meklati B.Y., **1998**, Riv. Ital. E.P.P.O.S, 2511-16.

- [155] Massouti V., Viano J., Gaydou E. M., 1998, *Fitoterapia*, Vol LXIX, 5,.
- [156] Stassi V., Very Kokidou E., Loukis A., 1996, *C. Harvala and Fragrance J.*, 11, 71-74.
- [157] Moreira M.R., Ponce A.G., del Valle C.E., Roura S.I., 2005, *LWT*, 38, 565-570.
- [158] Busatta C., Vdal R.S., Popiolski A.S., Mossi A.J., 2008, *Food microbiology*, 25, 207-211.
- [159] Hammer K.A., Carson C.F, Riley T.V., 1999, *Journal of applied microbiology*, 86,985-990.
- [160] Mondello ,L., Cotrneo, A., I.S and Dugo, 1997, *J.Essent.Oil.Res*, 9, 379-392.
- [161] Yashphe J., Feuerstein I., Barel S., Segal R., 1987, *Int.J.Grude.Res.25*, 2, 89-96.
- [162] Jazet Dongmo P.M., Kuate J., 2002, *F. F. B, journal of Fruits*, ,57,95-104.
- [163] Hinou J.B., Harvala C.E., Hinou E.B., 1989, *Pharmazie*,44, 4, 302-3.
- [164] Knobloch K., Pauli A., Iberi B., Weigand H., Weis N., 1989, *J.Essent. Oil Res*, 1, 3, 119-28.
- [165] Ross, S.A., El-Keltawi, N.E. and Megalla, S.E., 1980, *Fitoterapia*, 51, 201-205.
- [166] Ponce A.G., del Valle C.E., Roura S.I., 2004, *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 37, 199-204.
- [167] Mann C.M., Markham J.L., 1998, *Journal of Applied Microbiology* 84, 538-544.
- [168] Lis-Balchin M., Deans S.G, Eaglesham E., 1998, *Flavour and Fragrance Journal*.Vol.13, 98-104.
- [169] Tiziana Baratta M., Damien H. J., Deans S.G., 1998, *J. Essent. Oil . Res*, 10, 618-627.
- [170] Benchikha N., 2002, *F.D,Rivis.Italiana.EPPOS*.
- [171] Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M., Tantaoui-Elaraki A. 1993, *Journal of Essential Oil Research*. 5, 179-184.
- [172] Dragland S., Senoo H., Wake K., Holte K., Blomhoff R., 2003, *J. Nutr.*133,1286.
- [173] Lis-Balchim M., Deans S. G., 1998, *Phytotherapy Research*, Vol 12, 472-475.
- [174] Maruzella J. C., Lichtentein M. B., 1956, *Journal of Americain Pharmaceutical Association*, 65, 6, 378-381.
- [175] *Labo Guide Pratique du Laboratoire de Chimie., Méthodes d'analyse*, 1984, Ed. Française, Labo, Ed. Dalta et Spes S.A., CH-1026 Denges, 4, p 197-214.
- [176] Farrag R.S., Daw Z. Y., Hewedi F. M., El-Baroty, 1989, *J. Food Protect*, 52, 5, 665-667.
- [177] Lens- Lisbonne C., Cremieux A., Maillard C., Blansard G., 1987, *J.Pharm Belg*, 42, 5, 297-302.
- [178] Hinou J. B., Harval G. E., Hinou E. B., 1989, *Pharmazie*, 44, 4, 302-3.

- [179] Isouye S., watanabe M., Nishiyama Y., Takeo K., Akao M., Yamaguchi H., **1998**, *Mycoses*, 41, 403-410.
- [180] Maruzella C., Lichtentein M. B., **1956**, *J. Am. Pharm. Asso*, 65, 6, 378-381.
- [181] Tiziana Baratta M., Damien Dorman H. J., Deans S.G., Cristina A. Figueiredo J., Barroso J.G., Ruberto G., **1998**, *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 235-244.
- [182] Chand S., Lusunzi I., Veal D. A., Williams L. R., Karuso P., **1994**, *J. of Antibiotics*, Vol 47, 11, 1295-1303.
- [183] Kim J., Marshall M.R., **1995**, *Food Cheng-i Wie*, *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 43.
- [184] Bergy. *Manual of Determination Bacteriology*, **1974**, 8 th ed., Buchanan. R. E and Gibbons . N. E (Eds). Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- [185] Yashphje J ., Feuerstein L.. Barel S., Segal R., Int., **1987**, *J. Grude Res*, 25, 2, 89-96.
- [186] Robinson J. C., Nel D. J., **1989**, *J. of Harticultural Science*, 64, 2, 211-222.
- [187] Berghe D.A.V., Vlietinck A. J., **1991**, *Methods in Plants, Biochemistry*, Vol 6, 47-68.
- [188] Rios J. L., Recio M. C., Villar A., **1988**, *Journal of Ethnopharmacology*, 23, 127-149.

