République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Yahia FARES de MÉDÉA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

En Génie des Procédés

Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème

EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DES HUILES ESSENTIELLES DE *PISTACIA LENTISCUS* L, *MARRUBIUM VULGARE* L ET *GLYCYRRHIZA GLABRA* L ; EVALUATION DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN

Proposé et dirigé par :

Dr. Chérif SI MOUSSA

Melle. Sarah REZAZI

Étudié et présenté par :

Amel LACHENANI

Promotion 2012

Remerciements

Tout d'abord je remercie mon DIEU, le tout puissant pour m'avoir guidé vers le bon chemin du savoir et de m'avoir donné du courage et de la volonté afin de pouvoir réaliser ce modeste travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Chérif SI MOUSSA, Maitre de Conférences à l'université Yahia FARES de Médéa, pour l'encadrement de ce mémoire, pour sa compétence, ses encouragements, ses précieux conseils et la confiance qu'il m'a accordée. C'est une chance inouïe d'avoir eu l'occasion de travailler sous sa direction.

Mes respects aux président et membres de jury qui nous font l'honneur d'accepter et de juger ce travail. Et d'apporter leur réflexion et leurs critiques scientifiques.

Je remercie chaleureusement et sincèrement ma Co-promoteur : Melle REZAZI. S pour son aide précieux, ses conseils éclairés, sa patience et ses encouragements qu'ils n'ont cessé de me prodiguer afin de mener à bien cette tâche.

J'exprime mes vifs remerciements à tous les gens qui m'ont facilité mes travaux et mettre à ma disposition les moyens nécessaires au hall technologique de l'université de Médéa et au complexe SAIDAL de Médéa.

Mes sincères remerciements vont également à tous les enseignants du département de génie des procédés de la faculté des sciences et de la technologie de l'université de Médéa qui ont participé à notre formation, en particulier, le chef de département Mr. NEDJIOUI. M et le Vice doyen de la pédagogie Mr. HAMADACHE. M.

Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

À mes très chers et adorables parents,
qui m'ont toujours encouragé, aidé à surmonter touts les obstacles
que j'ai rencontré dans ma vie et être à mes cotés dans les moments les plus difficiles.

Merci pour votre amour, votre tendresse, vos prières, vos sacrifices et vos précieux conseils.
Savez que vous êtes extraordinaires et que grâce à vous je suis ou j'en suis.

Enfin Merci tout simplement d'être…mes parents avec ma profonde affection.

À mes très chers et magnifiques frères :

REDHA et sa femme SOUHILA,

IMAD et sa fiancée AMINA,

NABIL et sa fiancée FATIMA.

Merci pour vos encouragements, vos conseils et l'amour dont vous m'avez entouré.
Je vous exprime ici, toute mon affection et mes souhaits de bonheur et de succès.

Aux bijoux de la famille, mon adorable neveu SOFIANE LOUAI
et mon adorable nièce MALAK,

Je vous souhaite de bonne réussite dans vos futures études.

À tous les membres de la famille LACHENANI et BOUKOFTANE.

À mon formidable amie HEZIA,
C'est avec toi souvent que j'ai partagé mes joies et mes peines, tu m'as toujours soutenu grâce à ta présence et ton amitié. Que notre amitié dure éternellement.
Je te souhaite une bonne continuation dans tes études de Magister.

À tous mes amies et mes collègues, pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble.

À tous ceux qui me connaissent, et surtout qui m'aiment.

Je dédie ce modeste travail.

AMEL

ملخص

في هذا البحث، قمنا باستخلاص الزيوت الطيارة لثلاثة أنواع من النباتات الطبية التابعة للنباتات الجزائرية (الضرو، المريوت و عرق السوس) باستعمال أساليب متعددة (التقطير المائي, الاستخلاص بالمحاليل العضوية بواسطة جهاز السوكسلي و عن طريق النقع). تمت دراسة تأثير معايير مختلفة عل نسبة الاستخلاص مثل: (تجفيف و سحق النبتة، النسبة بين كمية النبتة و حجم المذيب، مدة الاستخلاص و نوع المذيب الخ...) بهدف تحديد الشروط التجريبية المواتية للحصول على مردود عالي لكل نموذج تجريبي. وقد مكننا هذا العمل من الحصول على الزيوت الطيارة و مستخلصات الضرو، المريوت و عرق السوس التي أخضعت لتحاليل فيزوكيميائية (أشعة مطيافية...). و في الأخير تم تقييم أثر الزيو ت الطيارة و مستخلصات النباتات الثلاثة على البكتيريا و الفطريات بواسطة تقنيات الأروماتوغرام.

الكلمات المفتاحية : الضرو، المريوت، عرق السوس، الزيوت الطيارة، التقطير المائي، السوكسلي، النقع، الأروماتوغرام.

Résumé

Dans ce présent travail, des différentes méthodes d'extraction (hydrodistillation, extraction par solvants volatils au moyen d'un extracteur Soxhlet et par macération à froid) ont été réalisées sur trois plantes médicinales (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L, *Glycyrrhiza glabra* L), appartenant à la flore Algérienne pour extraire les huiles essentielles. L'influence de divers paramètres liés à la matière végétale et aux procédés d'extraction comme : (le séchage et le broyage de la matière végétale, le rapport entre la quantité de la matière végétale et le volume du solvant, la durée d'extraction et le type solvant etc.) sur le rendement d'extraction a été étudiée pour déterminer les conditions opératoires favorables à la réalisation d'un processus d'extraction à rendement élevé. Ces travaux ont permis l'obtention des huiles essentielles et d'extraits de *Pistacia lentiscus L, Marrubium vulgare L et Glycyrrhiza glabra L* qui ont été par la suite soumises à une caractérisation par des analyses physico-chimiques (spectrophotométrie (Infra rouge)…). En outre, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et d'extrais des trois plantes a été déterminée par les techniques d'aromatogramme.

Mots clés: *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L, *Glycyrrhiza glabra* L, les huiles essentielles, hydrodistillation, Soxhlet, macération, aromatogramme.

Abstract

In this present work, different extraction methods (hydrodistillation, volatile solvent extraction using a Soxhlet extractor and cold maceration) were performed on three medicinal plants(*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L, *Glycyrrhiza glabra* L) belonging to the Algerian flora. The influence of various operating parameters such as: (drying and grindingthe plant, theratio between the quantity of plant material and the volume of the solvent, The Extraction time, and the type of the solvent etc.) on the extraction yield was studied in order to determine the operating conditions favorable to the realization of the extraction process, resulting in high yield. Also, The obtained the essential oil and extracts of *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L and *Glycyrrhiza glabra* L were subsequently characterized by physicochemical methods (Infra-red spectrophotometry…). Furthermore, the antimicrobial activity of the essential oils ant extracts of three plants was determined by the technique of aromatogram.

Key words: *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L, *Glycyrrhiza glabra* L, the essential oils, hydrodistillation, Soxhlet, maceration, aromatogram.

Table des matières

Table des matières i
Liste des figures vii
Liste des tableaux ix
Liste des acronymes x
Nomenclature et symboles xi

Introduction générale 01

Première partie : Étude Bibliographique

Chapitre I : Étude bibliographique des trois plantes

I.1 Introduction 05

I.2 Étude bibliographique des trois plantes aromatiques sélectionnées 05

I.2.1 L'espèce *Pistacia lentiscus* L 05

I. 2.1.1 Étude botanique de l'espèce *Pistacia lentiscus* L 05

I.2.1.1.1 Description botanique de la plante *Pistacia lentiscus* L 05

I.2.1.1.2 Taxonomie de *Pistacia lentiscus* L 06

I.2.1.2 Répartition géographique de *Pistacia lentiscus* L 07

I.2.1.3 Étude chimique de l'espèce *Pistacia lentiscus* L 07

I.2.1.4 Aspects Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus* L 09

I.2.1.5 Huile essentielle de Pistacia lentiscus L 10

I.2.1.5.1 Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L 10

I.2.2 L'espèce *Marrubium vulgare* L 12

I.2.2.1 Étude botanique de l'espèce *Marrubium vulgare* L 12

I.2.2.1.1 Description botanique de la plante *Marrubium vulgare* L 12

I.2.2.1.2 Taxonomie de *Marrubium vulgare* L 12

I.2.2.2 Répartition géographique de *Marrubium vulgare* L 13

I.2.2.3 Étude chimique de l'espèce *Marrubium vulgare* L 13

I.2.2.4 Aspects Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Marrubium vulgare* L 14

I.2.2.5 Huile essentielle de *Marrubium vulgare* L 15

I.2.2.5.1 Composition chimique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L 15

I.2.3 L'espèce *Glycyrrhiza glabra* L 16

I.2.3.1 Étude botanique de l'espèce *Glycyrrhiza glabra* L 16

I.2.3.1.1 Description botanique de la plante *Glycyrrhiza glabra* L 16

I.2.3.1.2 Taxonomie de *Glycyrrhiza glabra* L 16

I.2.3.2 Répartition géographique de *Glycyrrhiza Glabra* L 17
I.2.3.3 Étude chimique de l'espèce *Glycyrrhiza Glabra* L 17
I.2.3.4 Aspects pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Glycyrrhiza glabra* L 19
I.2.3.5 Huile essentielle de *Glycyrrhiza glabra* L 20
I.2.3.5.1 Composition chimique de l'huile essentielle de *Glycyrrhiza glabra* L 20
I.3 Conclusion 21

Chapitre II : Les huiles essentielles

II.1 Introduction 23
II.2 Présentation des huiles essentielles (HE) 23
II.2.1 Rôle des huiles essentielles 23
II.2.2 Composition des huiles essentielles 24
II.2.2.1 Composés terpéniques 24
II.2.2.2 Composés aromatiques 25
II.2.2.3 Composés d'origine diverse 25
II.2.3 Propriétés des huiles essentielles 25
II.2.3.1 Propriétés physico-chimiques 25
II.2.3.2 Propriétés biologiques 26
II.2.3.3 Propriétés pharmacologiques 26
II.2.4 Biochimie des huiles essentielles 26
II.2.4.1 Apparitions des huiles essentielles dans les plantes 26
II.2.4.2 Fonction biologique des huiles essentielles 26
II.2.5 Stabilité et conservation des huiles essentielles 27
II.2.5.1 Stabilité 27
II.2.5.2 Conservation 27
II.2.6 Mode d'utilisation des huiles essentielles 27
II.2.6.1 Par voie orale (ou buccale) 27
II.2.6.2 Par voie rectale 27
II.2.6.3 Par voie cutanée 27
II.2.7 Dangers et toxicité des huiles essentielles 28
II.3 Extraction des huiles essentielles 28
II.3.1 Définition 28
II.3.2 Procédés d'extractions 28
II.3.2.1 La distillation 29
II.3.2.2 Extraction par solvants organiques 31
II.3.2.3 Extraction par CO2 supercritique 33
II.3.3 Facteurs intervenant dans l'extraction 34
II.3.3.1 Nature et état du solide et soluté 34
II.3.3.2 Nature de solvant 34

II.3.3.3 Température 35
II.3.3.4 Humidité 35
II.4 Caractérisation et analyse des huiles essentielles 35
II.4.1 Caractérisation des huiles essentielles 36
II.4.1.1 Caractéristiques organoleptiques 36
II.4.1.2 Caractéristiques physiques 36
II.4.1.3 Caractéristiques chimiques 36
II.4.2 Analyse des huiles essentielles par les méthodes chromatographiques 36
II.4.2.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG) 36
II.4.2.1.1 Principe 37
II.4.2.1.2 Appareillage 37
II.4.2.2 Chromatographie liquide à hautes performances (HPLC) 37
II.4.2.3 Chromatographie sur couche mince (CCM) 38
II.4.2.3.1 Principe 39
II.5 Pouvoir antibactérien des huiles essentielles 39
II.5.1 Bactéricide et Bactériostase 40
II.5.2 Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne 40
II.5.2.1 Aromatogramme 41
II.5.2.1.1 Intérêt d'aromatogramme 41
II.5.2.1.2 Technique d'aromatogramme 41
II.5.2.2 Microatmosphère 42
II.6 Conclusion 43

Deuxième partie : Étude Expérimentale

Chapitre III : Matériel et Méthodes

III.1 Matériel végétal 46
III.1.1 Récolte des plantes 46
III.1.2 Conservation des plantes 46
III.1.3 Détermination de taux d'humidité 47
III.2 Procédés d'extraction des huiles essentielles 47
III.2.1 Extraction par hydrodistillation classique 47
III.2.1.1 Optimisation du rendement de l'extraction par hydrodistillation classique 48
III.2.1.1.1 Effet de séchage 48
III.2.1.1.2 Effet du broyage 50
III.2.1.1.3 Effet du rapport pondéral 50
III.2.2 Extraction par solvants volatils à chaud (Extracteur Soxhlet) 51
III.2.2.1 Optimisation du rendement d'extraction par Soxhlet 53
III.2.2.1.1 Effet du broyage 53

III.2.2.1.2 Effet de la durée d'extraction (Nombre de siphonage) 53
III.2.2.1.3 Influence de la nature de solvant 53
III.2.3 Extraction par solvants volatils à froid 54
III.3 Caractérisation et Analyse des huiles essentielles 55
III.3.1 Caractérisation des huiles essentielles 55
III.3.1.1 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles 55
III.3.1.2 Caractéristiques physiques des huiles essentielles 55
III.3.1.3 Caractéristiques chimiques des huiles essentielles 57
III.3.2 Analyse des huiles essentielles 63
III.3.2.1 Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge 63
III.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles 63
III.4.1 Préparation des milieux de cultures 65
III.4.2 Réalisation d'aromatogramme 66

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1 Taux d'humidité 68
IV.2 Rendement en huile essentielle 69
IV.2.1 Hydrodistillation classique 69
IV.2.1.1 Effet de séchage 69
IV.2.1.2 Effet de broyage 70
IV.2.1.3 Effet de rapport pondéral 72
IV.2.2 Extraction par solvants volatils à chaud (Extracteur Soxhlet) 73
IV.2.2.1 Effet du broyage 73
IV.2.2.2 Effet de nombre de siphonage 75
IV.2.2.3 Effet de la nature de solvant 76
IV.2.3 Extraction par solvants volatils à froid (Macération à froid) 76
IV.3 Caractérisation et Analyse des huiles essentielles 77
IV.3.1 Caractérisation des huiles essentielles 77
IV.3.1.1 Caractéristiques organoleptiques 77
IV.3.1.2 Caractéristiques physiques des huiles essentielles 79
IV.3.1.3 Caractéristiques chimiques des huiles essentielles 80
IV.3.2 Analyse des huiles essentielles 83
IV.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles 87

Conclusion générale 91

Références bibliographiques

Liste des figures

LISTE DES FIGURES DU CHAPITRE I		
Figure I-1	Plante de *Pistacia lentiscus* L.	06
Figure I-2	Distribution géographique de genre *Pistacia*.	07
Figure I-3	Structures chimiques des glycosides de flavanol dans les Feuilles de *Pistacia lentiscus*.	08
Figure I-4	Structure chimique de quelques constituants des HE des différentes parties de *Pistacia lentiscus* L.	11
Figure I-5	Plante de *Marrubium vulgare* L.	12
Figure I-6	Structure chimique de quelques constituants des différentes parties de *Marrubium vulgare* L.	14
Figure I-7	Structure Chimique de quelques constituants de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L.	15
Figure I-8	Plante de *Glycyrrhiza Glabra* L.	16
Figure I-9	Structure chimique de quelques constituants des différentes parties de *Glycyrrhiza glabra* L.	18
Figure I-10	Structure chimique de quelques constituants de l'huile essentielle de *Glycyrrhiza glabra* L.	20
LISTE DES FIGURES DU CHAPITRE II		
Figure II-1	Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entrainement à la vapeur d'eau.	29
Figure II-2	Montage de l'hydrodistillation simple.	30
Figure II-3	Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite.	31
Figure II-4	Montage de Soxhlet.	32
Figure II-5	Schéma du système d'extraction par CO2 supercritique.	34
Figure II-6	Appareil de CPG, muni d'un détecteur à ionisation de flamme.	37
Figure II-7	Principe de fonctionnement de l'HPLC.	38
Figure II-8	Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri.	42
Figure II-9	Illustration de la méthode des microatmosphères	42
LISTE DES FIGURES DU CHAPITRE III		
Figure III-1	Les trois plantes utilisées dans l'extraction des huiles essentielles (A: *Pistacia lentiscus* L, B: *Marrubium vulgare* L, C: *Glycyrrhiza glabra* L).	46
Figure III-2	Montage d'hydrodistillation.	48
Figure III-3	Montage pour extraction par Soxhlet.	52
Figure III-4	Évaporateur rotatif.	53
Figure III-5	Extraction par solvants volatils à froid (macération).	55
Figure III-6	Polarimètre.	58
Figure III-7	Refractomètre.	59
Figure III-8	Montage pour la détermination de l'indice de saponification.	61
Figure III-9	Appareil de Karl Fisher.	65
Figure III-10	Appareil de lecture des diamètres d'inhibitions (FICHER LILIY).	69

LISTE DES FIGURES DU CHAPITRE IV		
Figure IV-1	Teneur en eau des trois plantes médicinales.	68
Figure IV-2	Effet de séchage sur le rendement obtenu par HD de trois plantes médicinales.	69
Figure IV-3	Effet de broyage sur le rendement en obtenu par HD de trois plantes médicinales.	71
Figure IV-4	Effet du rapport pondéral sur le rendement obtenu par HD de trois plantes médicinales.	72
Figure IV-5	Influence de broyage sur le rendement obtenu par Soxhlet.	74
Figure IV-6	Influence de la durée d'extraction sur le rendement obtenu par Soxhlet.	75
Figure IV-7	Influence de la nature de solvant sur le rendement obtenu par Soxhlet.	76
Figure IV-8	Variation de rendement des trois plantes médicinales en fonction du solvant utilisé.	77
Figure IV-9	HE extraite par HD de des trois plantes médicinales.	78
Figure IV-10	Concrètes (diluées) extraites par macération à chaud (Soxhlet)	79
Figure IV-11	Spectre infrarouge d'HE de *Pistacia lentiscus* L	83
Figure IV-12	Spectre infrarouge d'HE de *Marrubium vulgare* L	83
Figure IV-13	Spectre infrarouge d'HE de *Glycyrrhiza glabra* L	84
Figure IV-14	Spectre infrarouge de concrète de *Pistacia lentiscus* L	84
Figure IV-15	Spectre infrarouge de concrète de *Marrubium vulgare* L	85
Figure IV-16	Spectre infrarouge de concrète de *Glycyrrhiza glabra* L	85
Figure IV-17	Aromatogramme des huiles essentielles de (A: *Pistacia lentiscus* L, B: *Marrubium vulgare* L, C: *Glycyrrhiza glabra* L).	87
Figure IV-18	Aromatogramme des concrètes diluées de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L).	88

Liste des tableaux

LISTE DES TABLEAUX		
Tableau III-1	Organes végétaux destinés pour l'extraction.	47
Tableau III-2	Propriétés des solvants utilisés.	51
Tableau III-3	Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles.	56
Tableau III-4	Propriétés des souches bactériennes utilisées	67
Tableau IV-1	Caractéristiques organoleptiques de L'HE extraite par hydrodistillation des trois plantes médicinales.	78
Tableau IV-2	Caractéristiques organoleptiques de concrète extraite par Soxhlet et macération à froid des trois plantes médicinales.	78
Tableau IV-3	Résultats de la densité relative.	79
Tableau IV-4	Résultats du pouvoir rotatoire.	80
Tableau IV-5	Résultats d'indice de réfraction.	80
Tableau IV-6	Résultats d'indice d'acide.	80
Tableau IV-7	Résultats d'indice d'acide.	81
Tableau IV-8	Résultats d'indice d'ester.	81
Tableau IV-9	Résultats de taux d'humidité de l'HE des trois plantes médicinales.	82
Tableau IV-10	Résultats d'infrarouge	86
Tableau IV-11	Résultats des diamètres des zones d'inhibition des HE des trois plantes médicinales	87
Tableau IV-12	Résultats des diamètres des zones d'inhibition des concrètes diluées des trois plantes médicinales	88

Liste des Acronymes

Acronyme	Signification
AFNOR	Association Française de Normalisation.
ATCC	American Type Collective Cultures
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
HD	Hydroditillation
HE	Huile essentielle
HPLC	Chromatographie Liquide à hautes performances
IR	Infra Rouge
ISO	Organisation de Standardisation Internationale.
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales

Nomenclature et symboles

Lecture	Désignation
A	Valeur de l'angle de rotation en milliradians ou degrés d'angle.
C	Concentration
F	Facteur de la solution de dosage Karl Fisher en mg/ml d'eau.
H	Teneur en eau (en %).
H	Taux d'humidité exprimé en pourcentage.
$\mathbf{I_A}$	Indice d'acide
$\mathbf{I_E}$	Indice d'Ester.
$\mathbf{I_s}$	Indice de Saponification
L	Longueur du tube utilisé, en décimètre
m	Masse de l'échantillon (en g).
M	Masse de la matière végétale en (g).
p	Rapport pondérale exprimé en (%).
Pc	Pression critique
R	Rendement en huile essentielle exprimé en (%).
Tc	Température critique
V	Volume indiqué sur le cadran de l'appareil (en ml).
α^{20}_{D}	Pouvoir rotatoire
λ	Longueur d'onde
ρ_{eau}	Masse volumique de l'eau
ρ_{HE}	Masse volumique de l'huile essentielle
η_{λ}^{t}	Indice de réfraction

Introduction générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis la nuit des temps, les humains apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes, [Larousse., 2001]. À travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autre au contraire semble plus fondée, plus efficaces. Pourtant, toute sont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des humains [Verdrager. J., 1978].

Actuellement la recherche sur les bienfaits des plantes médicinales voit son développement s'accroitre, notamment avec les huiles essentielles dont les domaines d'application sont nombreux aussi bien en médecine, en pharmacie ainsi que dans d'autres domaines tels que : l'agro-alimentaire, l'industrie chimique et cosmétique.

Les huiles essentielles (HE), extraites des feuilles, des fleurs, des fruits, des semences, des écorce ou des grains de certaines plantes sont largement utilisées pour leurs vertus curatives. L'affinité des huiles essentielles sur la peau (absorption en quelques secondes) et leur diffusion dans la microcirculation sanguine, font qu'elles ont une action thérapeutique. C'est ainsi que l'on assiste aujourd'hui à un retour de la médecine par les plantes [Polleti. A., 1982].

L'étude des activités biologiques et biotechnologique des extraits de plantes est d'un grand intérêt. Les activités antimicrobiennes des huiles essentielles ont été rapportées dans plusieurs travaux. Dans la plupart des cas ces activités sont attribuées aux mono terpènes oxygénés [Bouzouita. N et al., 2008].

La flore Algérienne est très riche en espèces connues pour leurs effets thérapeutiques traditionnels mais la plus part n'ont pas été sujet d'études phytochimiques.

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale: méditerranéenne, saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques [Ozenda. O., 1977].

Ce mémoire est subdivisé en deux grandes parties :

Une étude théorique inclue deux chapitres :

- Le premier chapitre présente un bilan bibliographique des connaissances sur les trois plantes médicinales sélectionnées (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L *et Glycyrrhiza glabra* L).
- Dans le deuxième chapitre, on présente les huiles essentielles, les méthodes d'extraction et caractérisation des HE et l'activité antibactérienne de ces dernières.

Une partie expérimentale présente en premier lieu les méthodes et les techniques utilisées pour l'obtention de l'huile essentielle, à savoir :

- L'extraction de l'huile essentielle de (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L *et Glycyrrhiza glabra* L) qu'elles proviennent du nord d'Algérie et précisément la région de Médéa (Médéa ville, Benchicao et Berrouaghia) par hydrodistillation puis par solvant volatils à chaud (Soxhlet) et à froid.
- L'étude de l'influence des principaux facteurs impliqués dans le procédé d'extraction par d'hydrodistillation et par solvant volatils.

Ensuite, on entame une étude analytique :

- La caractérisation physico-chimique des HE obtenues.
- L'analyse de la composition chimique de ces huiles essentielles et des concrètes par spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge.

Et à la fin, on fait une étude microbiologique des huiles essentielles et des concrètes obtenus en utilisant la technique d'aromatogramme.

Première partie

Données bibliographiques

Chapitre I

Etude bibliographique des trois plantes

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES TROIS PLANTES AROMATIQUES SELECTIONNEES

I.1 Introduction

Depuis quelques années, l'utilisation des plantes médicinales a retrouvé tout son intérêt, après avoir été le principal moyen pour remédier aux maux frappant l'être humain parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutique [Nostro. A et al., 2000]. L'homme, de tout son temps, était confronté aux maladies et aux agressions de son environnement. Actuellement, on reconnaît aux plantes médicinales un pouvoir bienfaisant. L'efficacité de la plante revient certainement aux produits naturels qu'elle contient, qui comportent dans leurs formules tous les éléments nécessaires à son action [Bellazougui. K., 2000].Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie: en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie [Bahorun. T et al., 1996].

À côté des plantes médicinales, les plantes aromatiques qui se différencient des autres plantes médicinales par la présence en certains de ses tissus de principes volatils, odoriférants et parfumés ont été étudiées et utilisées surtout dans le domaine de la parfumerie. Leurs huiles essentielles sont très recherchées et constituent la base de l'industrie des parfums et produits cosmétiques dans le monde [Clevely. A et Richmond. K., 1997].

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés de présenter les données bibliographiques sur les espèces aromatiques *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L.

I.2 Étude bibliographique des trois plantes aromatiques sélectionnées

I.2.1 L'espèce *Pistacia lentiscus* L

I. 2.1.1 Étude botanique de l'espèce *Pistacia lentiscus* L

I.2.1.1.1 Description botanique de la plante *Pistacia lentiscus* L

Pistacia lentiscus L (Pistachier lentisque ou Arbre à mastic), Darou en arabe local, appartenant à la famille des Anacardiacées [Leprieur. M., 1860], est un arbrisseau vivace de trois mètres de hauteur, ramifié, à odeur de résine fortement âcre.

Pistacia lentiscus L est particulièrement représentatif des milieux les plus chauds du climat méditerranéen. Il est caractérisée par :



- **Écorce :** Rougeâtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Quand on incise l'écorce la plante laisse s´écouler une résine irritante non colorée à odeur forte.
- **Branches :** tortueuses et pressées, forment une masse serrée.
- **Feuilles :** Sont persistantes, composées, et possèdent un nombre pair de folioles (4 à 10) d'un vert sombre, elliptiques, obtuses, luisantes en dessus, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte. Floraison de Mars à Mai.
- **Fleurs :** Sont d'environ 3 mm de large se présentent sous forme de grappe, Elles apparaissent au printemps et sont très aromatiques, forment des racèmes de petite taille à l'aisselle des feuilles. Floraison de Mars à Mai.
- **Fruit :** Est une baie globuleuse (de 2 à 3 mm), monosperme, remplie par nucléole de la même forme; d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité, qui est complète l'automne.

I.2.1.1.2 Taxonomie de *Pistacia lentiscus* L



- **Règne :** Plantae.
- **Division :** Magnoliophyta.
- **Classe :** Magnoliopsida.
- **Sous-classe :** Rosidae.
- **Ordre :** Sapindales.
- **Famille :** Anacardiaceae.
- **Genre :** Pistacia L.
- **Espèce :** *Pistacia lentiscus* L.

Figure I-1 : Plante de *Pistacia lentiscus* L [Belfadel F.Z., 2009].

I. 2.1.2 Répartition géographique de *Pistacia lentiscus* L

Pistacia lentiscus L est très commun dans le bassin méditerranéen (Figure I-2), il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tout type de sols, bien qu'il préfère les terrains en friche, pierreux, secs et ensoleillés.

En Algérie, le lentisque se trouve sur le long du tell et dans les zones forestières, [More. D et White. J., 2005].

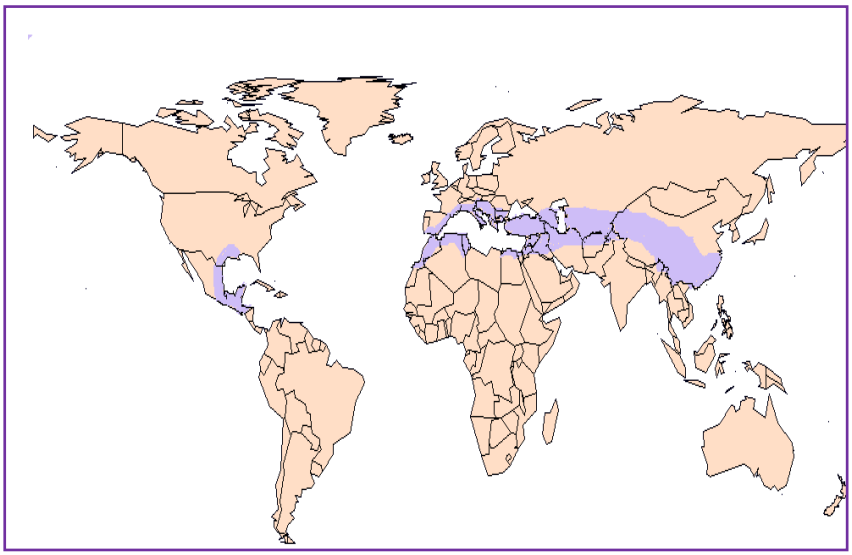


Figure I-2: Distribution géographique de genre *Pistacia* [Belfadel F.Z., 2009].

I. 2.1.3 Étude chimique de l'espèce *Pistacia lentiscus* L

La séparation des polyphénols a été effectuée sur les feuilles de *Pistacia lentiscus* par l'utilisation des méthodes HPLC semi-préparatoires, HPLC avec détecteur photomètre UV-VIS à barrette de diodes (PDA) ainsi que par analyse HPLC-SM, 1H – et RMN 13C [Romani et al., 2002].

Trois grandes classes de métabolites secondaires ont été détectées :

- Acide gallique et dérivés galloyls.
- Anthocyanes, à savoir delphinidine 3-O-glucoside et cyanidin 3-O-glucoside.
- Glycosides de flavonol comme les glucosides de quercetine et de myricetine (Figure I-3).

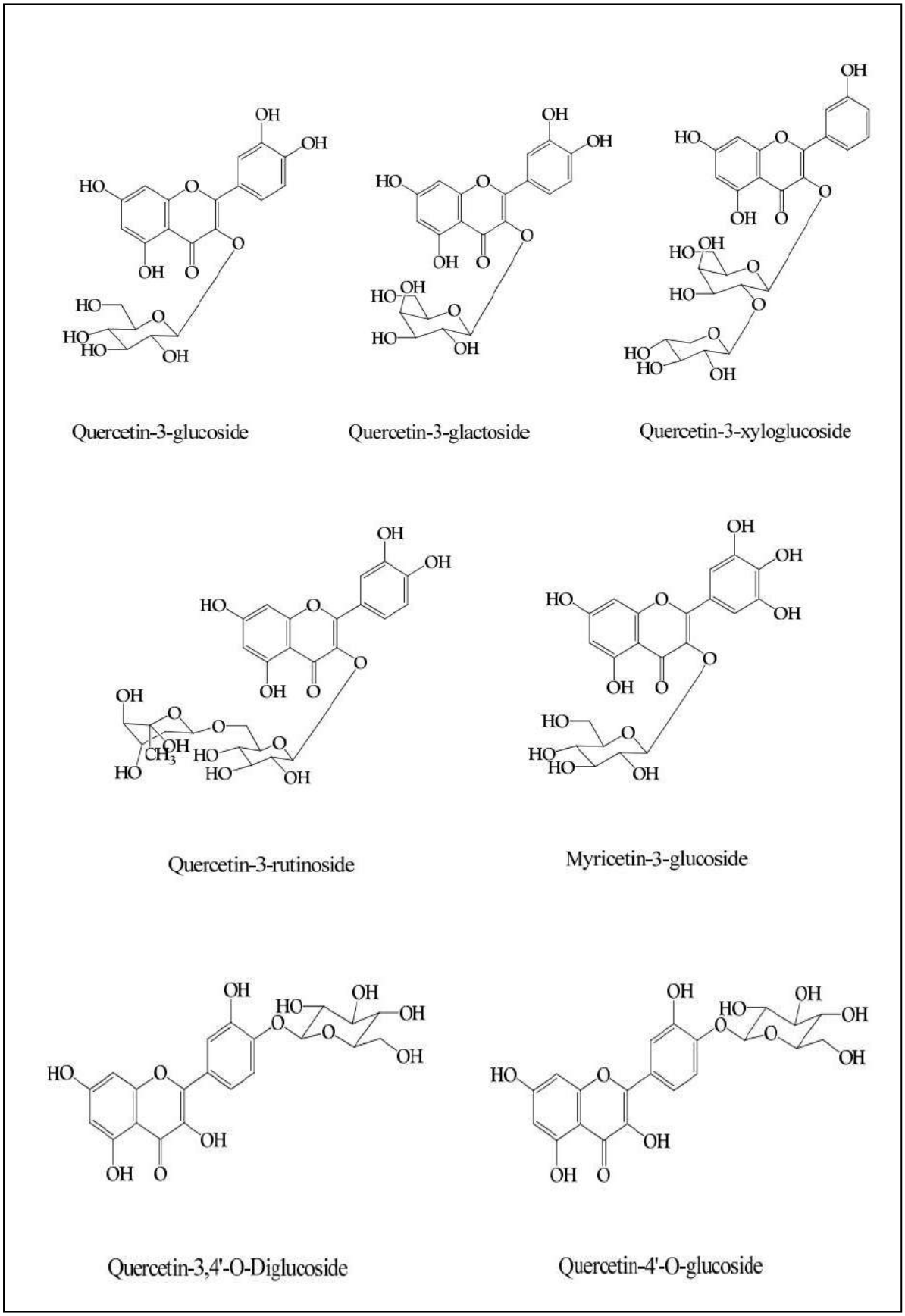


Figure I-3 : Structures chimiques des glycosides de flavanol dans les Feuilles de *Pistacia lentiscus* L [Belfadel F.Z., 2009].

I.2.1.4 Aspects Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus* L

Pistacia lentiscus L est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité [Palevitch. D et Yaniv. Z., 2000]. La décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère **[**Ouelmouhoub. S., 2005].

- La partie aérienne de *Pistacia lentiscus* L est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques [Bentley R.Y., 1980, Sanz M.J et al., 1992 et Scherrer A.M et al., 2005].
- Les feuilles ont pourvue d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépatoprotective, expectorante et stimulante [Kordali. S et al., 2003, Paraschos. S et al., 2007].

- Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, infections buccales, diarrhées, lithiases rénales, ulcères, maux d'estomac, asthme et problèmes respiratoires [Lev. E et Amar. Z., 2000, Said. O et al., 2002].

L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L est connue pour ses vertus thérapeutiques en ce qui concerne les problèmes lymphatiques et circulatoires.

- Des travaux précédents sur les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L révèlent la présence de certaines activités antalgique, antioxydante, anti-inflammatoire, antimicrobienne [Giner-Larza E.M et al., 2000, Papachristos D.P et Stamopoulos D.C., 2002].

- L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L assure sa propriété antiseptique atmosphérique, d'antidouleurs, et surtout sa grande valeur de décongestionnante des voies respiratoires, veineuses et même prostatiques. Ainsi, on l'indique spécialement pour traiter les hyperhémies, les varices et les jambes lourdes C'est également un remède efficace en cas d'hémorroïde internes et externes [Iauk. L et al., 1996, Magiatis. P et al., 1999].

- La médecine traditionnelle a utilisé l'huile essentielle de Pistacia lentiscus L en synergie avec d'autres huiles essentielles, elle devient un bon secours en cas d'eczémas variqueux, de cyanose et de fracture. L'utilisation de l'extrait de *Pistacia lentiscus* L pourra se faire soit par voie interne, en transcutanée soit en diffusion [Duru M.U et al., 2003, Gardeli. C et al., 2008].

I.2.1.5 Huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L

I.2.1.5.1 Composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L

L'étude bibliographique sur les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L a montré la richesse en mono terpènes et les sesquiterpènes.

L'étude réalisée par Barazani. O et ses collaborateurs, (2003) sur l'extrait T-butyl méthyl éther d'huile essentielle de feuilles de *Pistacia lentiscus* L à montrer la présence de :

- 12 mono terpènes.
- 7 sesquiterpènes.
- un seul mono terpène linéaire.
- Les α-pinène, sabinene, limonène, caryophyllene et Germacrene D.

Ces constituants majoritaires sont identifiés par la méthode GC-MS.

Une étude phytochimique réalisé par [Kivçak. B et Akay. S., 2005] sur l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* L a permis d'identifier quantitativement α-tocophérol. Le travail de Castola. V et ses collaborateurs, (2000), effectué sur 105 échantillons d'huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus* L de corse, révèle la présence des constituants majoritaires comme Myrcene, Limonene, Terpinen 4-ol, α-pinène, α-phellandrene.

En Algérie, une étude phytochimique effectuée par Dob. T et ses collaborateurs, (2006) sur les huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de *Pistacia lentiscus* L de régions (d'Alger, Tizi-Ouzou et d'Oran) par l'utilisation de méthodes GC et GC / MS. Les résultats indiquent la présence de Longifolene comme un composé majoritaire dans les huiles essentielles d'Alger (12,8%) et de Tizi-Ouzou (16,4%), tandis que α-pinène (19,0%) constitue le principal constituant de l'huile essentielle d'Oran.

Les autres composés étaient présents en quantités importantes dans les différentes huiles essentielles :

- **L'huile essentielle d'Alger**
  - γ-cadinene (6.2%).
  - *trans*-β-terpineol (5.0%).
  - α-acorneol (4.6%).

- **L'huile essentielle de Tizi-Ouzou**
  - *trans*-β-terpineol (15.6%).
  - terpinen-4-ol (7.0%).
  - γ-muurolene (5.7%).

- **L'huile essentielle d'Oran**
  - *trans*-β-terpinéol (13.1%).
  - sabinene (12.6%).
  - β-pinene (6.5%).

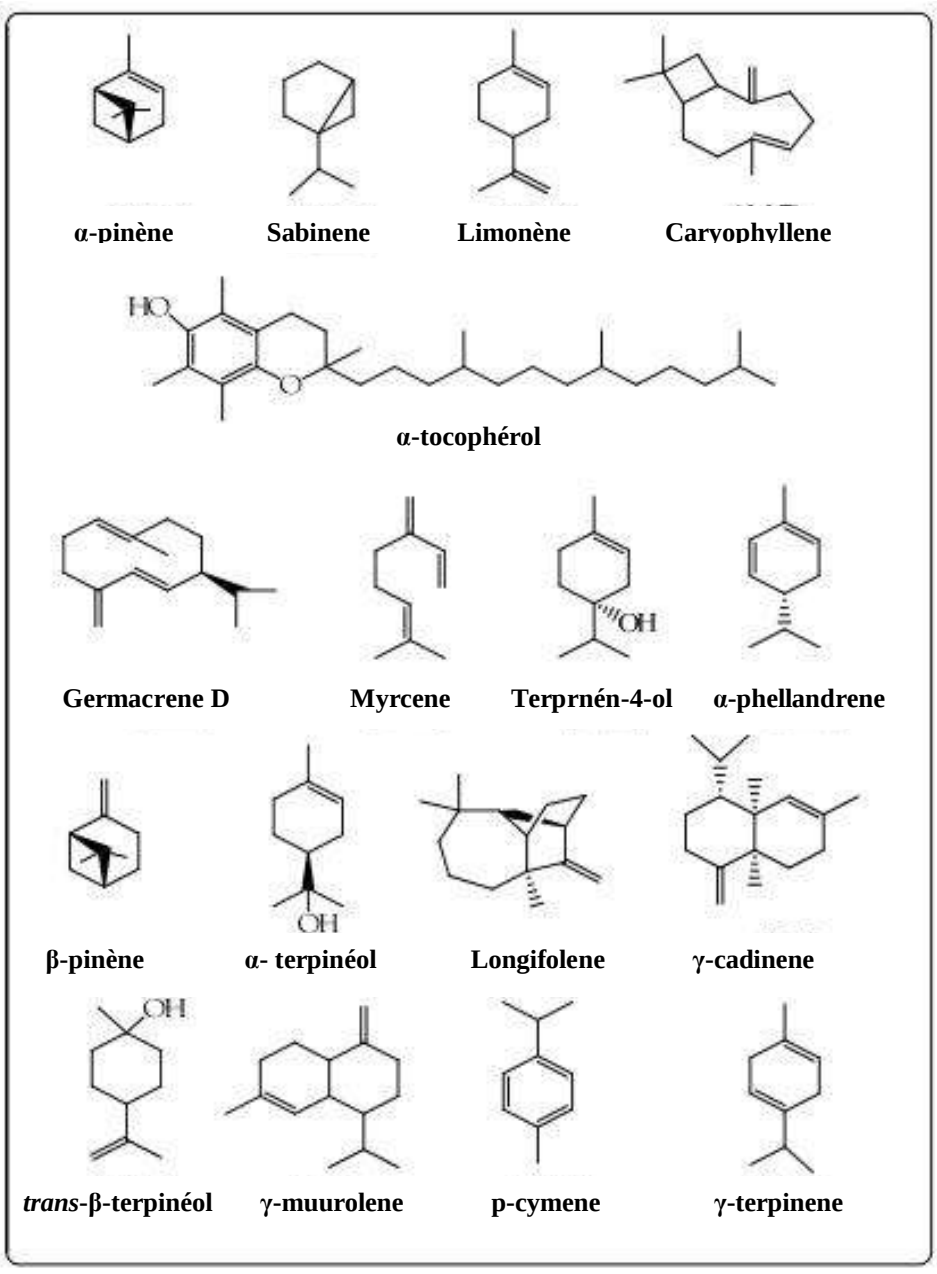


Figure I-4 : Structure chimique de quelques constituants des HE des différentes parties de *Pistacia lentiscus* L [Belfadel F.Z., 2009].

I.2.2 L'espèce *Marrubium vulgare* L

I.2.2.1 Étude botanique de l'espèce *Marrubium vulgare* L

I.2.2.1.1 Description botanique de la plante *Marrubium vulgare* L

Marrubium vulgare L (Marrube blanc, Marrube Commun ou Herbe vierge), Mériwét en arabe local, appartenant à la famille des Lamiacées, est une plante herbacée de 30 à 60 cm de hauteur et de couleur vert grisâtre, il dégage à l'état frais, une forte et agréable odeur aromatique. Il est originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie. *Marrubium vulgare* L est caractérisé par :



- **Tiges :** Quadrangulaire. épaisses, simples ou peu rameuses.
- **Feuilles :** Sont obovales et duveteuses, de couleur verte grisâtre, alternent très régulièrement, ont une longueur de 2 à 5 cm et possédant un bord crénelé et dentelé et un aspect froissé.
- **Fleurs :** Sont blanches, multiflores et très discrètes.

I.2.2.1.2 Taxonomie de *Marrubium vulgare* L



- **Règne :** Plantae.
- **Division :** Magnoliophyta.
- **Classe :**Magnoliopsida.
- **Sous classe :** Asteridae.
- **Ordre :**Lamiales.
- **Famille** : Lamiaceae.
- **Genre** : Marrubium L.
- **Espèce :** *Marrubium vulgare* L.

Figure I-5 : Plante de *Marrubium vulgare* L [Pharmaceutical Press., 2007].

I.2.2.2 Répartition géographique de *Marrubium vulgare* L

Le genre *Marrubium* comporte quelque 40 espèces, originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie. Répandues principalement le long de la méditerranée, les zones tempérées du continent Eurasien et quelques pays d'Amérique Latine [Meyre-Silva. C et al., 2005].

I.2.2.3 Étude chimique de l'espèce *Marrubium vulgare* L

Les diterpènoïdes est la famille de composés naturels la plus explorée, jusqu'à présent, dans le genre *Marrubium* [Karioti. A et al., 2007**]**. Certains auteurs rapportent la richesse de ce genre en polyphénols, en particulier les flavonoïdes et les phényl propanoïdes. Il convient aussi de signaler la présence d'acides phénoliques et de certains polymères comme les lignanes [Hennebelle. T et al., 2007].

Marrubium vulgare L se compose de :

- **Huiles volatiles.**
- **Diterpènes**
  - Marrubiine (0,3-1,0 %),
  - Lactone, comme composant principal avec des quantités moindres d'alcools différents (par exemple marrubenol, marrubiol, peregrinol et vulgarol).
- **Alkaloids**
  - Pyrrolidine-type.
  - Betonicine (0.3%).
  - Cis-isomère turicine.
- **Flavonoids**
  - Apigénine.
  - La lutéoline.
  - La quercétine, et leurs glycosides.

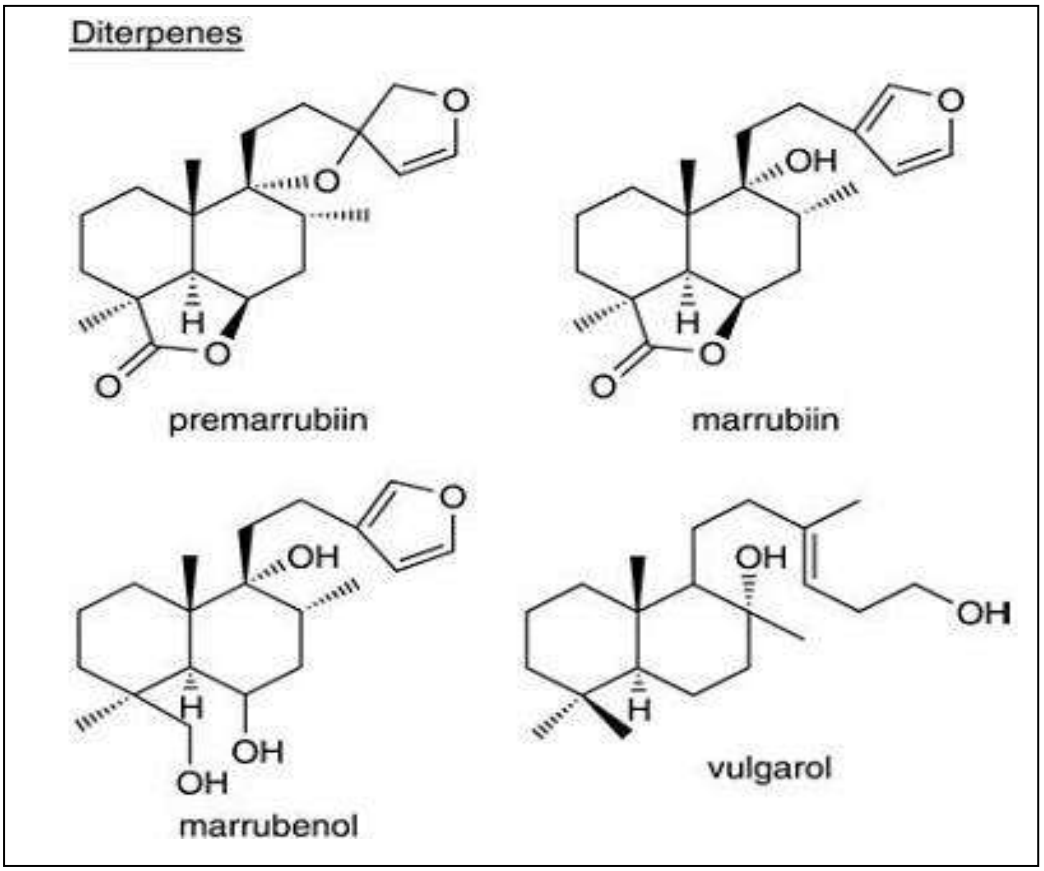


Figure I-6 : Structure chimique de quelques constituants dès différentes parties de *Marrubium vulgare* L [Pharmaceutical Press., 2007].

I.2.2.4 Aspects Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Marrubium vulgare* L

Marrubium vulgare L est connu dans l'Égypte et la Grèce anciennes depuis la plus haute antiquité pour ses propriétés apaisantes contre la toux et les bronchites, il était considéré contre les morsures de chiens enragés [Meyre-Silva. C et al., 2005].

En médecine ayurvédique en Inde, chez les aborigènes d'Australie et les Amérindiens d'Amérique du Nord, le *Marrubium vulgare* L servait à traiter les infections des voies respiratoires.

Marrubium vulgare L est également utilisé dans la fabrication de nombreux sirops et dans le cas d'inflammations des voies respiratoires et de troubles dyspeptiques tels que les flatulences et ballonnements, il a aussi un pouvoir amaigrissant léger, stomachique, cholérétique et analgésique.

I.2.2.5 Huile essentielle de *Marrubium vulgare* L

I.2.2.5.1 Composition chimique de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L

L'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L obtenue par hydrodistillation à partir des parties aériennes recueillies au cours de la floraison sont analysées par GC et GC / MS. L'eugénol est le principal composant de l'huile F (durant la phase de floraison) (50%), mais seulement 16% dans l'huile V (durant la phase végétative).

β-bisabolène est le composant principal de l'huile de V (29%) et le deuxième composant principal dans l'huile F (11%). D'autres constituants ont été identifiés dans l'HE de *Marrubium vulgare* L [Pharmaceutical Press., 2007]. Parmi ces composés, on cite :

- La choline ($C_5H_{14}NO$).
- La saponine.
- Sabinène et Sesquiterpène.
- Bisablol.
- Camphène ($C_{10}H_{16}$).
- p-cymène.
- Limonène ($C_{10}H_{16}$).
- B-pinène.
- β-sitostérol ($C_{29}H_{50}O$) (un phytostérol).
- Cires.

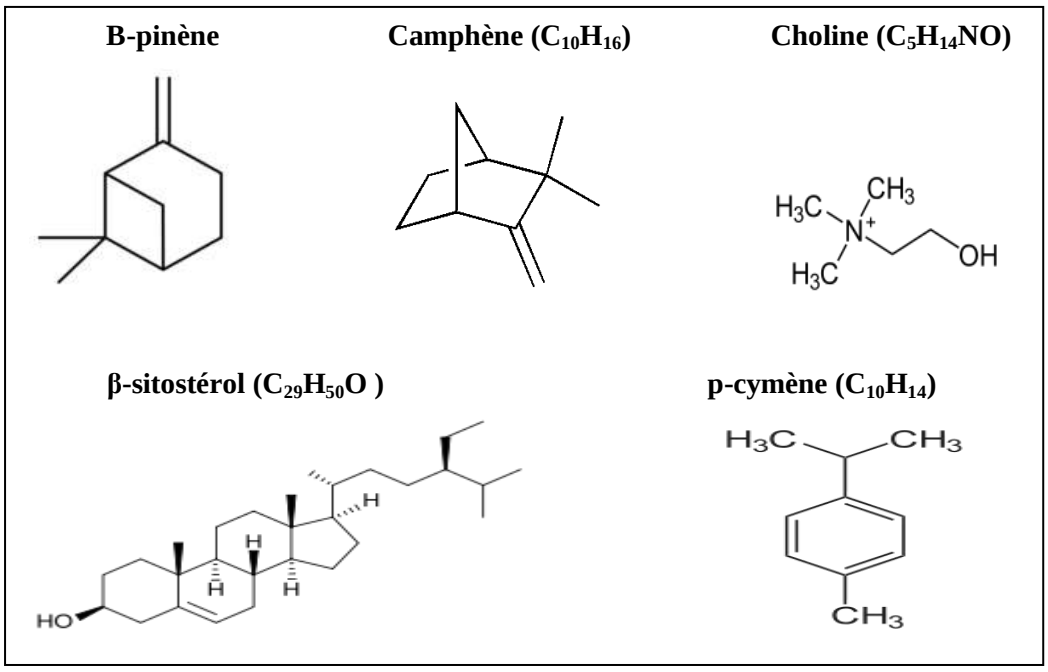


Figure I-7 : Structure Chimique de quelques constituants de l'huile essentielle de *Marrubium vulgare* L, [Pharmaceutical Press., 2007].

I.2.3 L'espèce *Glycyrrhiza glabra* L

I. 2.3.1 Étude botanique de l'espèce *Glycyrrhiza glabra* L

I.2.3.1.1 Description botanique de la plante *Glycyrrhiza glabra* L

Glycyrrhiza Glabra L (Réglisse, Réglisse glabre, Bois sucré, Bois doux ou Racine douce), Ark Essouss en arabe local, appartenant à la famille des fabacées, est une plante herbacée de 1 à 1,5 m de hauteur qui pousse en buissons. La partie la plus utilisée est la racine ou plutôt la tige souterraine appelée stolon. *Glycyrrhiza Glabra* Lest caractérisé par :

- **Racines :** Sont grosses, ligneuses, traçantes, jaune à l'intérieur et marron foncé à l'extérieur, aromatiques, sucrées et forment des rhizomes cylindriques.
- **Feuilles :** Sont vertes et pennées, de 7 à 15 cm de long, composées de 9 à 17 folioles oblongues. Elles portent des poils sécréteurs d'huile essentielle qui les rendent poisseuses au toucher (feuilles glutineuses).
- **Fleurs :** Sont violettes d'un centimètre de diamètre, disposées en inflorescence.
- **Fruits :** Sont des gousses plates, de deux à 3 cm de long, ils contiennent de nombreuses graines.



I.2.3.1.2 Taxonomie de *Glycyrrhiza glabra* L



- **Règne :** Plantae.
- **Division :** Magnoliophyta.
- **Classe :** Magnoliopsida.
- **Sous classe :** Rosidae.
- **Ordre :** Fabales.
- **Famille :** Fabaceae.
- **Genre :** Glycyrrhiza L.
- **Espèce :** *Glycyrrhiza glabra* L.

Figure I-8 : Plante de *Glycyrrhiza Glabra* L, [Pharmaceutical Press., 2007].

I.2.3.2 Répartition géographique de *Glycyrrhiza Glabra* L

Glycyrrhiza Glabra L est originaire du sud de l'Europe et de l'Asie. Elle pousse préférentiellement dans un sol riche et humide et elle a besoin d'un climat chaud, comme sur le pourtour de la Méditerranée, au sud des États-Unis, au Moyen-Orient, et en Afrique du Nord.

I.2.3.3 Étude chimique de l'espèce *Glycyrrhiza Glabra* L

L'étude bibliographique sur les composés chimique de *Glycyrrhiza glabra* L a montré la richesse en flavonoïdes, Terpénoïdes, traces d'huiles essentielles et d'autres constituants chimiques [Miething. H., Speicher-Brinker. A et Neolicuroside. A., 1989].

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes se composent de Flavonols, Isoflavones, Glabrin, Glabrol, Glabrone, Glyzarin, Glycyrol, Glabridine et ses dérivés, Kumatakenin, Licoflavonol, Licoisoflavones A et B, Licoisoflavanone, Licoricone, liquiritin et ses dérivés, Phaseolli-nisoflavan, Isoliquiritigénine, licuraside, Echinatin, licochalcones A et B et Néo-licuroside [Mitscher L.A et al., 1980].

- **Terpénoïdes**

  - Glycoside glycyrrhizine (1 - 24%), aussi appelée acide glycyrrhizique (ou glycyrrhétique) et l'acide glucuronique.
  - Glycyrrhetol, glabrolide, l'acide licorique, l'acide liquiritique et β-amyrine.

- **D'autres constituants**
  - Les acides aminés.
  - Les coumarines Glycyrin.
  - Les amines, les gommes, la lignine et l'amidon.
  - Les stérols (β-sitostérol, le stigmastérol), des sucres et de la cire.
  - Les autres parties de plantes composants documentés pour les feuilles de *Glycyrrhiza glabra* les flavonoïdes (kaempférol et ses dérivés, isoquerce-étain, la quercétine et ses dérivés, phytoalexines), coumarines (bergap-dix, xanthotoxine), phytoestrogènes, b-sitostérol et saponaretin.

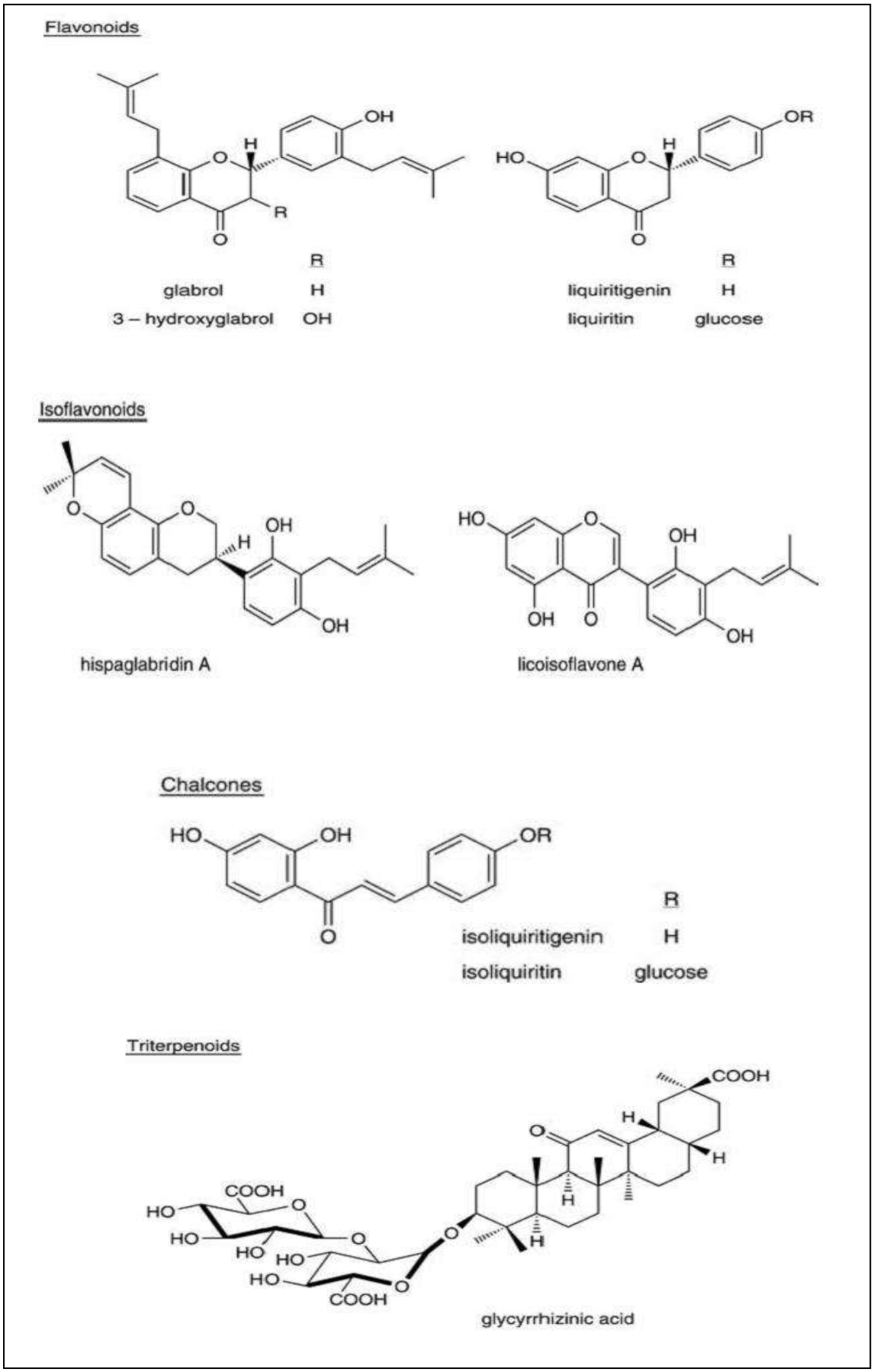


Figure I-9 : Structure chimique de quelques constituants des différentes parties de *Glycyrrhiza glabra* L [Pharmaceutical Press., 2007].

I.2.3.4 Aspects Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Glycyrrhiza glabra* L

Glycyrrhiza glabra L est largement utilisé pour ses propriétés médicinales. La racine est la partie la plus utilisée dans la plante. Elle contient 10 % de polysaccharides, des coumarines et un peu de phytostérols, elle est plus sucrée que le glucose et stimule la production d'hormones telles que l'hydrocortisone, ce qui lui confère des propriétés anti-inflammatoires [Mitscher L. A et al., 1980].

Glycyrrhiza glabra L est utilisé dans les problèmes bronchiques tels que le catarrhe, la bronchite, le rhume, la grippe et la toux. Il réduit les irritations de la gorge. Il est utilisé pour soulager le stress. Il s'agit d'un agent de guérison puissant pour la tuberculose. Il peut aussi aider à réduire la fièvre (acide glycyrrhétinique a un effet comme l'aspirine), et il peut avoir une action antibactérienne. Il est utilisé aussi dans le traitement des inflammations intestinales et chroniques telles que les maladies arthritiques, rhumatismales et des affections cutanées chroniques [Tawata. M et al., 1990].

Glycyrrhiza glabra L est également utilisé comme antispasmodique et expectorant. La présence de flavonoïdes lui confère des propriétés antivirales et protectrices de la cellule hépatique. Il est efficace pour combattre de nombreux virus. Certains praticiens de santé l'utilisent pour réduire les symptômes reliés à la ménopause et pour traiter les troubles digestifs, le plus souvent en association avec d'autres plantes [Mitscher L. A et al., 1980].

D'autres études ont aussi montré que :

- La réglisse avait une activité antioxydante et qu'elle empêchait l'adhésion de la bactérie Helicobacter pylori à la paroi de l'estomac. Ce faisant, elle contribue à lutter contre l'infection par cette bactérie qui représente la principale cause des ulcères gastroduodénaux.
- Des extraits de réglisse se sont avérés efficaces pour le traitement des aphtes, ces petits ulcères douloureux, mais sans gravité, qui se forment surtout dans la bouche. Au cours de deux essais impliquant un nombre restreint de participants, les extraits appliqués sur les lésions à l'aide de timbres autocollants ont réduit la sensation de douleur et accéléré la guérison.

I.2.3.5 Huile essentielle de *Glycyrrhiza glabra* L

I.2.3.5.1 Composition chimique de l'huile essentielle de *Glycyrrhiza glabra* L

L'étude bibliographique sur l'huile essentielle de *Glycyrrhiza glabra* L a montré que plus de 80 composants sont identifiés [Kameoka. H et Nakai K., 1987]. Parmi les plus principaux composants, on cite :

- Benzaldéhyde.
- Butyrolactone.
- alcool cumique.
- L'eugénol, fenchone, l'alcool furfurylique, l'hexanol, l'indole, le linalol et g-nonalactone.
- Estragol, l'acide propionique, α-terpinéol.

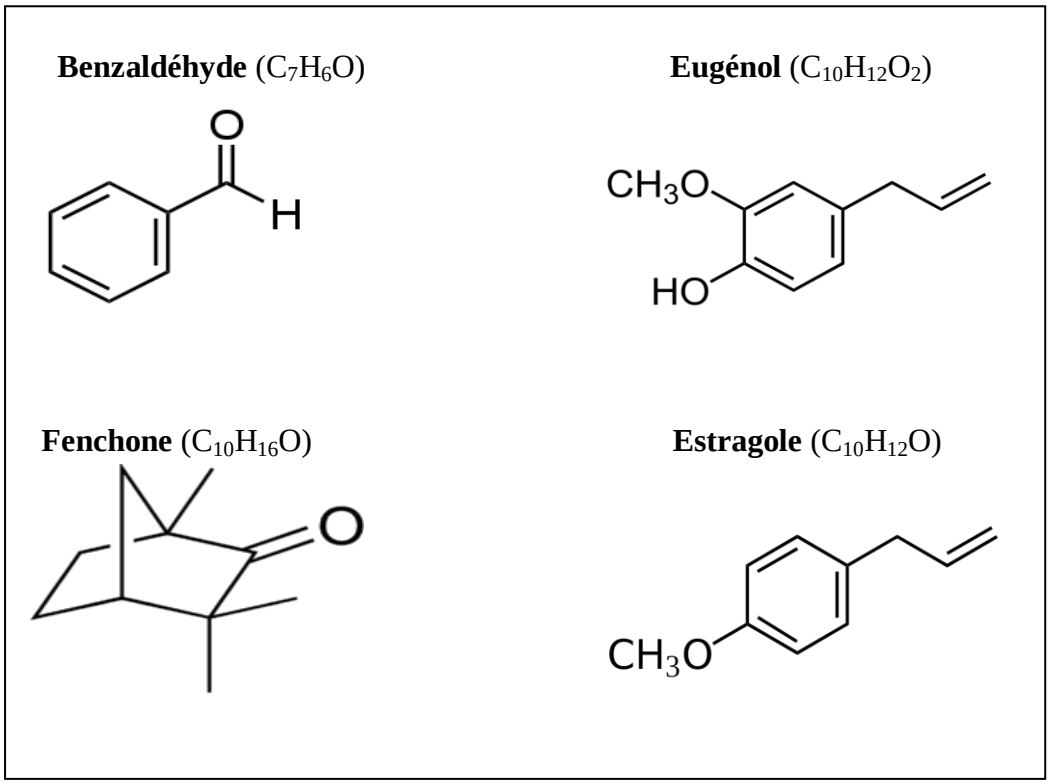


Figure I-10 : Structure chimique de quelques constituants de l'huile essentielle de *Glycyrrhiza glabra* L [Pharmaceutical Press., 2007].

I.3 Conclusion

Les substances d'origine naturelle connaissent une application croissante dans de produits de consommation. En effet, leur utilisation est encouragée car les produits équivalents issus de synthèses chimiques ont, à tort ou à raison, mauvaise presse dans le grand public. Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis longtemps. Il y a donc un besoin de production de substances bioactives isolées et concentrées, pour une utilisation dans un large champ d'application.

Chapitre II

Les huiles essentielles

CHAPITRE II

LES HUILES ESSENTIELLES

II.1 Introduction

L'association française de normalisation **(AFNOR)** définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entrainement àla vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'HE est ensuite séparé de la phase aqueuse par des procédés physiques [Afnor., 2000].

Les HE extraites des plantes comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes [Iserin., 2001]. Elles constituent le facteur odorant qui peut s'exhaler spontanément [Erika. L, 2001]. On peut les extraire par divers moyens et les recueillir sous forme de liquide, en particulier. Ces derniers sont donc la matérialisation palpable de la substance odorante. Elles sont volatiles, et par évaporation, peuvent retourner a l'état d'odeur sans laisser de traces. Les huiles essentielles ont été initialement appelées "esprit" puis "essence". Pour un souci de normalisation, cette dénomination "essence" a été abandonnée au profit de celle d'« huile essentielle » [Parf. C., 1983].

II.2 Présentation des huiles essentielles (HE)

II.2.1 Rôle des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont quatre principaux rôles :

- Protection de la plante contre les déprédateurs (insectes).
- Attraction des insectes pollinisateurs.
- Inhibe la germination de la graine des espèces qui partagent le même espace.
- Elles ont aussi un rôle dans les échanges calorifiques dans les phénomènes capillaires.

II.2.2 Composition des huiles essentielles

Jusqu'à présent, plus 3000 constituants ont été isolés à partir des HE, ces dernières sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes :

- Composés terpéniques.
- Composés aromatiques dérivés du phenylpropane.

Les HE peuvent également renfermer divers produits issus de processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils [Brunetton. J., 1999].

II.2.2.1 Composés terpéniques

a. Terpènes

Ce sont des hydrocarbures cycliques, volatils de formule générale (C5H8) n qui se trouvent dans les huiles essentielles naturelles. Les terpènes ont un certain nombre de propriétés communes tenant à leur caractère insaturé : parenté d'odeur, fixation d'hydrogène, isomérisation, polymérisation, etc. [Brunetton. J., 1999].

b. Diterpènes :

Ce sont des composés en C_{20} moins volatils (quatre molécules iospréniques), ils sont cycliques ou acyclique.

c. Triterpènes

Ce sont des composés en C_{30} (six molécules isopréniques) aliphatique ou poly cycliques. On les utilise dans l'industrie des parfums. Il y'a aussi les tétraterpènes et polyterpènes qui sont des composés importants du point de vue biochimique. Ils contiennent des chaînes à plusieurs doubles liaisons conjuguées, responsables de leurs couleurs. La coloration de ces hydrocarbures tétra et polyterpènes est facilement explicable par le nombre important de doubles liaisons conjuguées.

d. Sesquiterpènes

Ce sont des composés moins volatils de formule moléculaire $C_{15}H_{22}$, $C_{15}H_{24}$, $C_{15}H_{26}$ (Trois molécules isopréniques disposées). On trouve quelques exemples de sesquiterpènes caractéristiques des HE: Carbures mono- ou polycyclique (B-bisabolene), Alcools (farnésol), Cétones (nootkatone), Aldéhydes (sinensals) et Esters (acétate de cédryle) [Brunetton. J., 1999].

II.2.2.2 Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phénol propane (C_6C_3) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des allyles et propenylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines HE d'Apiacea (fenouil, anis, persil…).

II.2.2.3 Composés d'origine diverse

Il s'agit là de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles.
Ces composés contribuent souvent aux aromes de fruits, compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer. Il en est de même pour les HE lorsqu'ils sont entrainables par la vapeur d'eau.

- Les composés issus de la dégradation d'acides gras.
- Les composés issus de la dégradation de terpènes.
- Les composés azotés ou soufrés [Brunetton. J., 1999].

II.2.3 Propriétés des huiles essentielles

II.2.3.1 Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physico-chimiques connues qui sont les suivantes :

- On trouve généralement les HE incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire.
- Toutes les HE sont volatiles, odorantes et inflammables. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HE officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HE de cannelle, de girofle et de sassafras.
- Elles sont peu polaires et peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques.
- Elles sont également très sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser pour former des produits résineux. [Seguin. E et al., 2001].

II.2.3.2 Propriétés biologiques

Quelque propriétés biologiques seulement sont reconnues et proviennent d'un usage traditionnel validé : il s'agit des propriétés antiseptiques et stimulante digestives a l'intérieur et, à l'extérieur, de propriétés antiseptiques, cicatrisantes et antalgiques. D'autres propriétés sont revendiquées et font l'objet de prescriptions sous l'entière responsabilité du médecin prescripteur. [Seguin. E et al., 2001].

II.2.3.3 Propriétés pharmacologiques

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants en proportion souvent variable, d'où la difficulté de mener des études pharmacologiques rigoureuses. Quelques propriétés principales peuvent cependant être dégagées. Un grand nombre d'huiles essentielles présentent des propriétés « digestives » ou des propriétés antispasmodiques, sédatives, irritantes [Seguin. E et al., 2001].

II.2.4 Biochimie des huiles essentielles

II.2.4.1 Apparitions des huiles essentielles dans les plantes

Les huiles essentielles sont extraites de plantes ou d'arbres de diverses familles dont le caractère commun est de pousser dans les régions chaudes du globe. Les essences sont synthétisées et stockées par la plante par exemple dans les :

- **Grains :** Macis, angélique, céleri, cardamone.
- **Fleurs :** Jasmin, rose, lavande, néroli.
- **Feuilles et tiges :** Géraniums, œillet, eucalyptus.
- **Fruits :** Bergamote, anis, cumin.
- **Écorce :** Cannelle, citron, orange.
- **Racines :** Iris.
- **Aiguilles et rameaux :** sapin argenté, sapin, pin. [Khoudja. A., 1997].

II.2.4.2 Fonction biologique des huiles essentielles

La cause et le but de la formation des huiles essentielles sont encore presque inconnus. L'odeur des fleurs attire les abeilles pour féconder les fleurs.

Pour les plantes et les racines, c'est un dispositif de protection contre la transpiration et l'infection par les bactéries.

II.2.5 Stabilité et conservation des huiles essentielles

II.2.5.1 Stabilité

Les huiles essentielles sont volatiles et généralement très sensibles au phénomène d'oxydation. Elles sont souvent associées à d'autres substances, telles que les gommes et les résines et tendent même à se résinifier par exposition à l'air. Ces phénomènes d'altération modifient fortement la composition chimique des huiles essentielles [Chiron. F, 1996].

II.2.5.2 Conservation

Les huiles essentielles doivent être contenues dans les récipients qui par leurs natures n'altèrent pas le produit et le protègent contre toutes agressions extérieures. D'une façon générale, les matériaux constitutifs des récipients doivent être inertes vis-à-vis des huiles essentielles qu'ils contiennent de façon à empêcher toute dégradation simultanée du produit et des matériaux [Brunetton. J., 1999].

II.2.6 Mode d'utilisation des huiles essentielles

II.2.6.1 Voie orale (ou buccale)

C'est la voie royale (la plus rapide et la plus efficace) pour les huiles essentielles, mais celle de tous les dangers. Il ne faut pas les utiliser pures, car elles peuvent provoquer des brûlures digestives. Elles peuvent être prises dans une cuillère à café de miel, dans des boissons ou encore dans une boulette de pain. [Biogassendi., 2003].

II.2.6.2 Voie rectale

Elles doivent être prises sous forme de suppositoires, cette voie permet d'éviter le système digestif donc la diffusion dans l'organisme se fait par circulation générale

II.2.6.3 Voie cutanée

Cette voie est la plus fréquemment utilisée, car c'est la moins toxique, elle permet une pénétration facile et rapide de l'huile essentielle qui va se diffuser dans la microcirculation périphérique puis dans la circulation générale où elle va exercer son activité [Willem J.P., 2004].

II.2.7 Dangers et toxicité des huiles essentielles

- Les huiles essentielles contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses **[**Elberling. J et Skov. PS., 2007]
- Les huiles essentielles qui sont utilisées en parfumerie peuvent se comporter en irritant des muqueuses respiratoires et favoriser le déclenchement de crises d'asthme pour les asthmatiques **[**Meynadier J. M et Raison-Peyron N., 1997].
- Les inflammations cutanées siègent de manière privilégiée sur les paupières, les aisselles et le périnée. De plus, certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques.
- Les molécules aromatiques présentent dans les huiles étant très puissantes, une ingestion accidentelle peut, selon la sorte et la quantité, générer une toxicité élevée voir un coma et même la mort [Willem J.P., 2004].

II.3 Extraction des huiles essentielles

II.3.1 Définition

L'extraction est une technique de séparation en génie chimique. Cette technique utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de propriétés chimiques ou physiques.

II.3.2 Procédés d'extractions

L'odeur parfumée des plantes est due en grande partie aux huiles essentielles présentes dans leur organisme. Très vite, ces composés ont intéressé 1'industrie de la parfumerie et des cosmétiques, c'est pourquoi des techniques d'extraction ont été mises au point rapidement par les industriels. Aujourd'hui, il existe différentes techniques d'extraction. Cette diversité dépend des facteurs suivants :

- La nature du solide lui-même (texture de la matière première).
- La distribution d'huile essentielle au sein du solide.
- La proportion des matières à extraire.
- La sensibilité thermique et chimique des extraits.

Nous donnerons ci-dessous un aperçu général sur quelques procédés d'extractions utilisées jusqu'à l'heure actuelle.

II.3.2.1 Distillation

La distillation peut être définie comme un procédé de séparation des composés d'un mélange, qui est basé sur la différence de leur volatilité relative. Dans le cas des huiles essentielles, la distillation est habituellement menée selon deux objectifs: la récupération et le fractionnement.

La première opération consiste en la séparation de l'huile à partir de la matière végétale, tandis que la deuxième est la séparation d'un composé à partir du mélange constituant l'huile [Richard. H et Multon. JI., 1992].

a. Extraction par entrainement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. À la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille.

Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange «eau + huile essentielle». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : « L'huile essentielle ». L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [Lucchesi M.E., 2005 et Guenther., 1972].

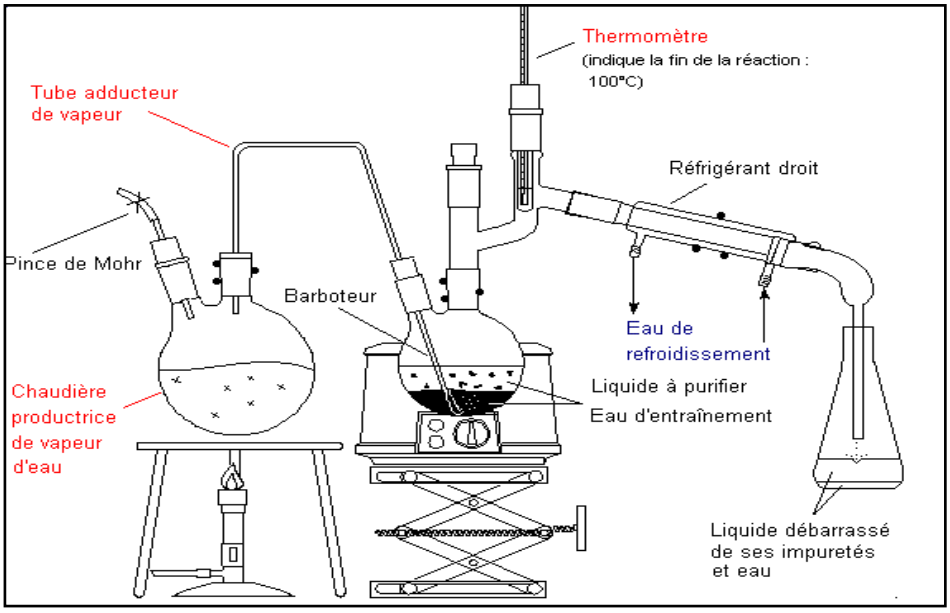


Figure II-1: Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entrainement à la vapeur d'eau [Lucchesi M.E., 2005].

b. Extraction par hydrodiffusion

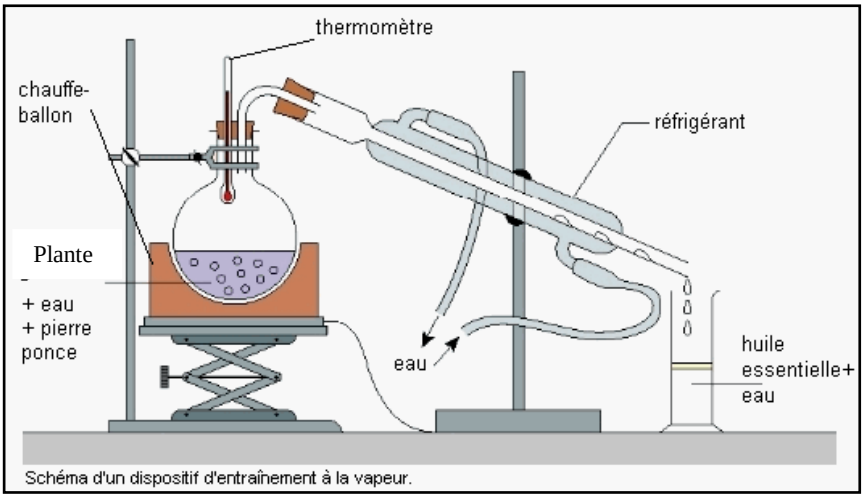
L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur, elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15 bar). Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » dispersé dans la matière végétale .La composition des produits obtenus est qualitativement sensiblement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classique [Brunetton. J., 1993].

c. Extraction par hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. Cette méthode peut facilement être reproduite en laboratoire et ne nécessite pas beaucoup de matériel [Rivera L.L., 2006]. Elle est réalisée en deux étapes.

La partie de la plante contenant la molécule à extraire est placée dans un ballon avec de l'eau. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense. Elle est ensuite récupérée dans un erlenmeyer où il est possible de distinguer deux phases bien distinctes : l'huile essentielle et, dessous, l'eau aromatique (ou hydrolat) chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée [CNDP., 2000].

Les deux phases contenues dans l'erlenmeyer sont ensuite transférées dans une ampoule à décanter. Après avoir laissé reposer le contenu quelques secondes, il est possible d'éliminer totalement l'eau aromatique [Willem J.P, 2004]. Il ne reste alors plus que l'huile essentielle dans l'ampoule à décanter (Figure II-2).



Figue II-2: Montage de l'hydrodistillation simple [Willem J.P, 2004].

d. Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement de micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle, l'huile essentielle est entraînée dans le mélange isotopique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Très rapide et peu consommateur d'énergie, ce procédé fournit un produit de qualité et de quantité supérieure à celle obtenu par l'hydrodistillation **[**Brunetton. J., 1999].

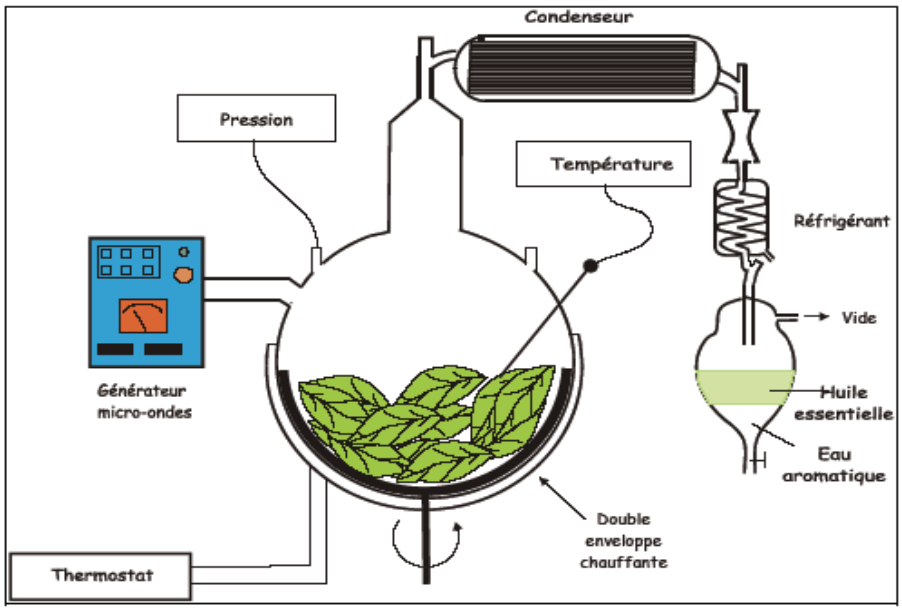


Figure II-3 : Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite **[**Lucchesi M.E., 2005].

II.3.2.2 Extraction par solvants organiques

L'extraction par solvants organique volatils reste la méthode la plus pratiquée. Le principe consiste à faire macérer la matière première avec le solvant à froid ou à chaud afin de faire passer les substances odorantes dans les solvants.

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone.

Le solvant utilisé doit satisfaire à certaines conditions, dont les plus importantes sont :

- Être un bon solvant des produits odorants.
- Avoir un point d'ébullition assez bas (de 50 à 80°C).
- Inerte vis à vis des constituants à extraire.
- Être à moindre coût.
- Ne pas être nuisible pour les humains ou les manipulateurs (Propriétés cancérigènes ou toxiques par exemple) [Richard. H et Multon J.I., 1992].

a. Extraction par macération (à froid)

La macération à froid consiste à laisser tremper un végétal dans le solvant (parfois salée) pendant plusieurs heures, jours ou semaines. L'intérêt de la macération est généralement la conservation du végétal ou au contraire son délitement. Les molécules de ces substances sont toutes solubles dans un grand nombre de solvant usuels. Une fois que le végétal est en contact avec un solvant, les substances odorantes passent par diffusions à travers les parois cellulaires du végétal vers le soluté [Blackeway. J et Salerno M., 1987].

On soutire ensuite la solution et on l'évacué à travers un décanteur filtre vers un évaporateur primaire, ou l'on distille le solvant. On obtient finalement un produit solide, ou pâteux « concrète ».

b. Extraction par Soxhlet (à chaud)

Un extracteur de Soxhlet (ou appareil de Soxhlet) est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique qui permet de faire à chaud l'extraction par solvant d'un solide avec une grande efficacité. Cet appareil (Figure II-4), porte le nom de son inventeur : Franz Von Soxhlet.

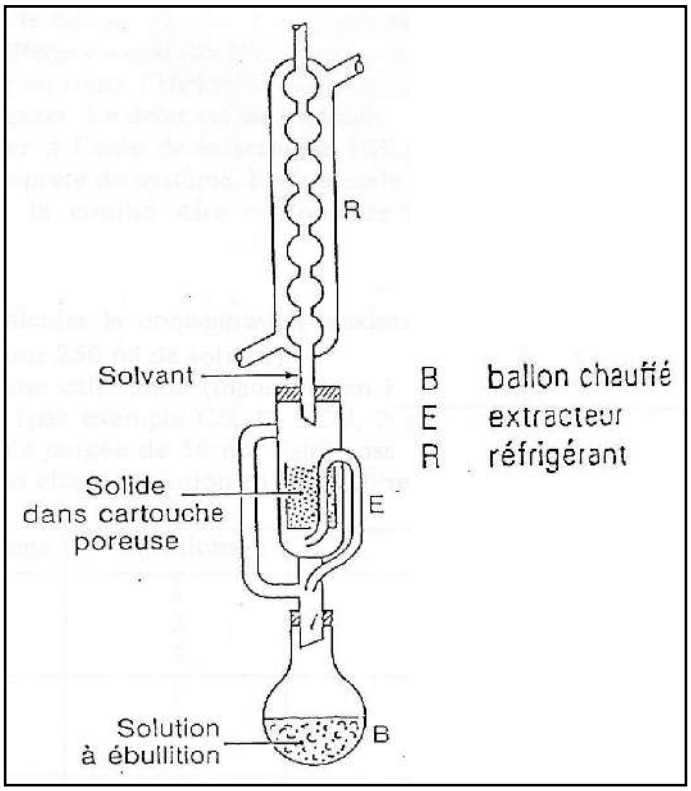


Figure II-4 : Montage de Soxhlet [Rezazi. S et Bouziani. S., 2008].

Ce montage se compose d'un corps en verre dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais, d'un tube siphon et d'un tube d'adduction. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction.

Dans l'extracteur est insérée une cartouche dans laquelle est placé le solide à extraire, puis un réfrigérant est adapté au-dessus de l'extracteur. Il est également souhaitable d'utiliser un chauffe-ballon avec agitation magnétique intégrée, afin d'éviter des à-coups d'ébullition qui provoquent une remontée du liquide contenu dans le ballon et non de vapeurs de solvant pures. À défaut on peut placer des billes de verres dans le ballon.

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous).

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles. Le cycle peut se répéter indéfiniment jusqu'a épuisement complet du solide.

II.3.2.3 Extraction par CO_2 supercritique

Une nouvelle technique d'extraction se développe utilisant le dioxyde de carbone à l'état supercritique (Pc = 72,9 atm et Tc = 31,3 °C).Le dioxyde de carbone à l'état supercritique présente un pouvoir de dissolution accru, vis à vis des divers mélanges ou de divers produits. La solubilité duCO_2 passe de l'état gazeux à l'état supercritique. Cette propriété est utilisée pour réaliser l'extraction dans le domaine supercritique d'une part, et la séparation par détente du CO_2 supercritique à l'état gazeux d'autre part.

Dans ce dernier état, le soluté extrait n'est plus soluble dans le CO_2 et se dépose dans l'extracteur. Le CO_2 gazeux récupéré subira par la suite, un cycle de transformation qui lui fera retrouver son état supercritique avant sa réadmission dans l'extracteur. Ce cycle se répète durant toute la période d'extraction [Brunetton. J., 1993].

La figure II-5 illustre l'appareillage qui convient à l'extraction des solides.

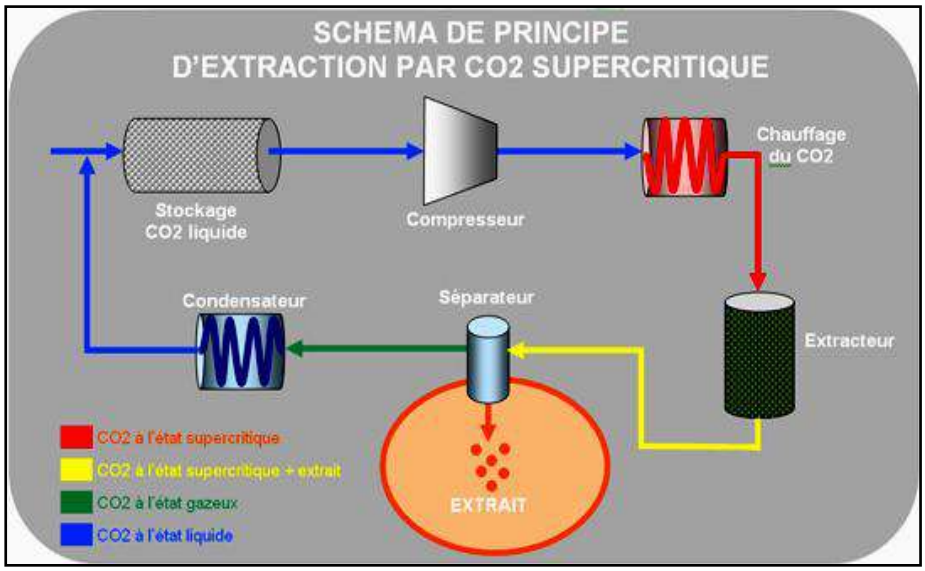


Figure II-5 : Schéma du système d'extraction par CO_2 supercritique [Brunetton. J., 1993].

II.3.3 Facteurs intervenant dans l'extraction

Ils sont liés à l'état du solide et du soluté, à la nature du solvant, à la température, au degré d'agitation des phases et à l'humidité.

II.3.3.1 Nature et état du solide et soluté

La nature de l'état physique du solide et du soluté a une importance primordiale et détermine le mécanisme de transfert de matière. Dans les matières végétales, il est généralement inclus dans les cellules d'où il est extrait par un mécanisme de dialyse ou de diffusion capillaire à travers les parois cellulaires. Plus la matière est divisée finement et plus la surface d'échange (ou interface) est grande et plus le parcours moyen du soluté est petit [Otmanine. Kh., 2007].

II.3.3.2 Nature de solvant

Le solvant doit être sélectif, possédant :

- Une grande capacité de dissolution,
- Une température d'ébullition peu élevée,
- Une faible viscosité et être, si possible non toxique, ininflammable et non explosif.
- Un bon solvant ; sélectif et volatil, fournit des solutions riches en soluté désiré tout en réduisant les opérations d'évaporation et de purification.

- Le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion du solvant, l'agitation, et la séparation mécanique.

Les principaux solvants utilisés sont : l'eau, les alcools (méthanol. éthanol), les hydrocarbures (hexane) et les solvants halogènes. Les solvants chlorés, qui sont moins sélectifs que les hydrocarbures, ont des diffusivités plus élevées [Khoudja. A., 1997].

II.3.3.3 Température

L'élévation de la température favorise généralement l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité de la solution. La température opératoire est limitée par les risques d'extraire des composés nuisibles, de dégradation thermique du soluté et de la sécurité de l'installation (risque d'incendie) [Khoudja. A., 1997].

II.3.3.4 Humidité

Lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement Proportionnelle à la teneur en eau du solide [Khoudja. A., 1997].

II.4 Caractérisation et analyse des huiles essentielles

Chaque huile essentielle est caractérisé par ses constantes physiques et chimiques dans le but d'une étude qualitative, comparative et pour prouver sa conformité aux normes internationales établies par les organismes de normalisation tel que : L'association Française de normalisation « AFNOR » ou l'organisation de standardisation international « ISO ».

Les constantes physico-chimiques, une fois déterminées, servent d'indice de qualité et permettent de donner une idée sur la composition des huiles essentielles. Par exemple, l'indice de réfraction trop élevé indique la présence de composés renfermant les doubles liaisons. D'autre part, l'utilisation de méthodes physiques d'analyses comme la chromatographie, la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masses est devenue incontournable du fait des nombreuses et précieuses informations qu'elles fournissent [Guide pratique., 1983].

II.4.1 Caractérisation des huiles essentielles

II.4.1.1 Caractéristiques organoleptiques

- L'aspect.
- L'odeur.
- La couleur [Benmerième. L et Bourguig. C., 1996].

II.4.1.2 Caractéristiques physiques

- La densité relative (d_{20}^{20}).
- Le pouvoir rotatoire (α^{20}_{D}).
- L'indice de réfraction (η_{λ}^{t}) [Pharmacopée E., 2001].

II.4.1.3 Caractéristiques chimiques

- L'indice d'acide (I_A).
- L'indice d'ester (I_E).
- La miscibilité dans l'éthanol.
- L'indice d'hydroxyle (I_{OH}).
- L'indice d'iode (I_I).
- L'indice de saponification (I_S) [Pharmacopée E., 2001].

II.4.2 Analyse des huiles essentielles par les méthodes chromatographiques

II.4.2.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de choix pour la séparation d'un mélange complexe de produits volatils. Grace à son introduction dans les laboratoires analytiques des universités ou dans ceux des industries, beaucoup de secrets de la nature concernant la composition chimique de tels mélanges ont été dévoilés.

A l'aide de la chromatographie en phase gazeuse, des produits très complexes de substances odorantes peuvent être séparés, identifiés dans un temps relativement bref (court). De plus, La chromatographie en phase gazeuse a été largement utilisée pour l'analyse profonde des différents constituants volatils des huiles essentielles.

II.4.2.1.1 Principe

En CPG, l'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de l'échantillon entre une phase gazeuse mobile et une phase immobilisée sur la surface d'un support inerte [Skoog D.A et al., 2003].

II.4.2.1.2 Appareillage

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre un pic au passage de chaque soluté séparé [Tranchant. J., 1995].

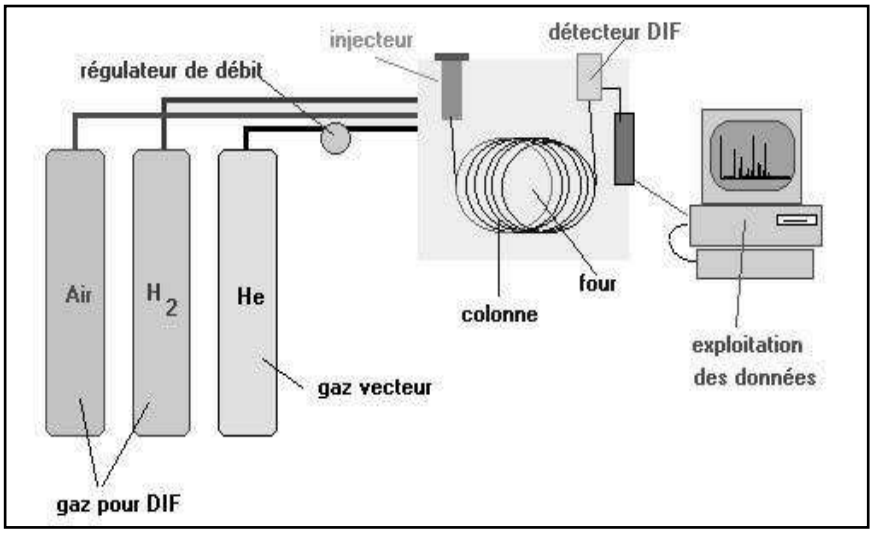


Figure II-6: Appareil de CPG, muni d'un détecteur à ionisation de flamme.

II.4.2.2 Chromatographie liquide à hautes performances (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) n'est pas une variété particulière de la chromatographie liquide. C'est une méthodologie spéciale, applicable à tous les types de la chromatographie avec élution en phase liquide.

Cette méthodologie qui nécessite un appareillage lourd et couteux, se distingue de la chromatographie classique par :

- Des colonnes, de petits diamètres, réutilisables.
- Des pressions d'entrée relativement élève.
- Des détecteurs spéciaux fonctionnant sur des débits faibles.

- Des appareils automatisés.
- La rapidité des analyses.

Les colonnes utilisées en HPLC sont généralement courtes (de 5 à 25 cm de long). Elles sont constituées le plus souvent par un tube d'acier inoxydable, [Guide pratique, 1983].

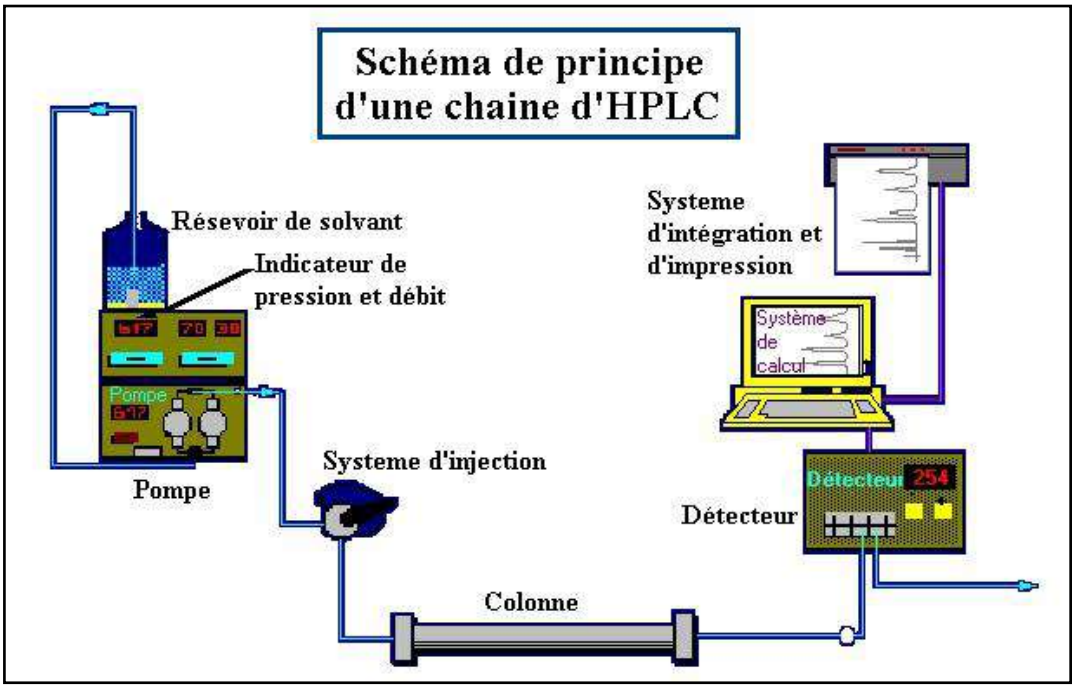


Figure II-7: Principe de fonctionnement de l'HPLC.

II.4.2.3 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique de chromatographie couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparatoire).

Elle comprend:

- Une phase stationnaire : constituée de matériau approprié, est répandue en une couche mince et uniforme sur un support (plaque) de verre, de métal ou de plastique.
- Une phase liquide, dite phase mobile ou éluent : un solvant ou un mélange de solvants qui va entrainer les composés à séparer le long de la phase stationnaire [Skoog D.A et al., 2003].

II.4.2.3.1 Principe

Avant l'étalement, la phase stationnaire est une poudre fine et elle doit donc être mélangée à un liant qui assure la bonne cohésion de la couche et une bonne adhérence au support. On utilise le plus fréquemment un liant inorganique comme du gypse, du plâtre, du sulfate de calcium hémi hydraté, ou un liant organique (par exemple l'alcool polyvinylique) notamment lorsque la phase stationnaire est hydrophobe.

On ajoute souvent un pigment fluorescent pour permettre une détection des produits à la lumière ultraviolette à 254 nm ou 366 nm ; à cette longueur d'onde, le pigment de la phase stationnaire émet une lumière, verte en général, sauf aux endroits ou un produit absorbe le rayonnement UV ce qui provoque l'apparition de taches sombres [Rouessac. F et Rouessac. A., 1995].

II.5 Pouvoir antibacterien des huilesessentielles

Les plantes aromatiques sont connues depuis longtemps et mis à profit de manière empirique pour l'assainissement de l'air (encensoir) ou pour augmenter la durée de vie des aliments (bouquet garni). Les propriétés antimicrobiennes sont essentiellement dues à la fraction d'huiles essentielles contenues dans ces plantes [Lacroix. M et Caillet. S., 2007].

En 1888, Cadeac et Meunier publient leurs recherches dans les annales de l'institut Pasteur. De nombreuses études in vitro ont été réalisées par des médecins et des pharmaciens avec des résultats concluants.

Dans son livre "Antiseptiques essentiels " publié en 1938, Rene-Maurice Gattefosse, le père de l'aromathérapie, décrit déjà la considérable avancée de la recherche dans ce domaine. Depuis de nombreux travaux, essentiellement de laboratoire, sont venus renforcer ces résultats et expliquer les modes d'actions de certains de leurs composants [Gattefossé R.M., 1938].

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaires ou au niveau de la microflore vaginale, et d'origine fongique, contre les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes [Lacroix. M et Caillet. S., 2007].

II.5.1 Bactéricide et Bactériostase

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des huiles essentielles sur les microorganismes une activité létale (bactéricide) et une inhibition de la croissance (bactériostase).

L'activité des HE est souvent assimilée à une activité bactériostatique. Cependant les études suivantes ont montré que certains constituants chimiques des huiles essentielles ont des propriétés bactéricides et fongicides [Hermal. C., 1993].

Des clichés de microscopie électronique illustrent ces études en montrant les dommages de cellules des microorganismes suivants:

- Staphylococcus aureus en contact avec des huiles essentielles riches en monoterpénols et en phénols [Franchomme P.D et Pénoël., 1990].
- Des cellules d'Escherichia coli visiblement très endommagées par l'Origan compact qui collapsent après une minute de contact,
- La lyse de cellules fongiques provoquée par la Citronnelle de Java, Cymbopogon nardus.

II.5.2 Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.

L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques. Selon la souche microbienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

- Selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeuse.
- Selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant.

Ces différentes techniques sont répertoriés et décrites dans des mémoires de thèses de doctorat [Porcher-Pimpard., 1942; Auriol., 1990; Poudevigne., 1991; Billerbeck. G., 2000] ainsi que dans différentes publications [Zaika. L., 1988; Smith M.D et Navilliat P.L., 1997; Mann C.M et Markham J.L., 1998; Lahlou. M., 2004].

II.5.2.1 Aromatogramme

L'aromatogramme est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme ou les antibiotiques sont remplaces par des huiles essentielles [Lernbaum. S., 1990].

II.5.2.1.1 Intérêt d'aromatogramme

Lorsque les antibiotiques classiques n'agissent plus ou que la sensibilité de la personne aux infections devient chronique ou tout simplement par choix, on peut avoir recours à l'aromatogramme. L'aromatogramme permet un choix judicieux, en adaptant la prescription d'essences à chaque syndrome infectieux. Il permet une aromathérapie véritablement sur mesure et appropriée à chaque cas particulier [Belaiche. P., 1979].

II.5.2.1.2 Technique d'aromatogramme

L'aromatogramme est basée sur la technique d'antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Cette méthode a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des antibiotiques testés, de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes, et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale [Fauchère J.L et Avril J.L., 2002].

La technique consiste à utiliser les disques de papier imprégnés des différents produits à tester (huile essentielle). Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier (Figure II-8).

Chaque huile diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante pour inhiber leur croissance.

On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [Fauchère J.L et Avril J.L., 2002].

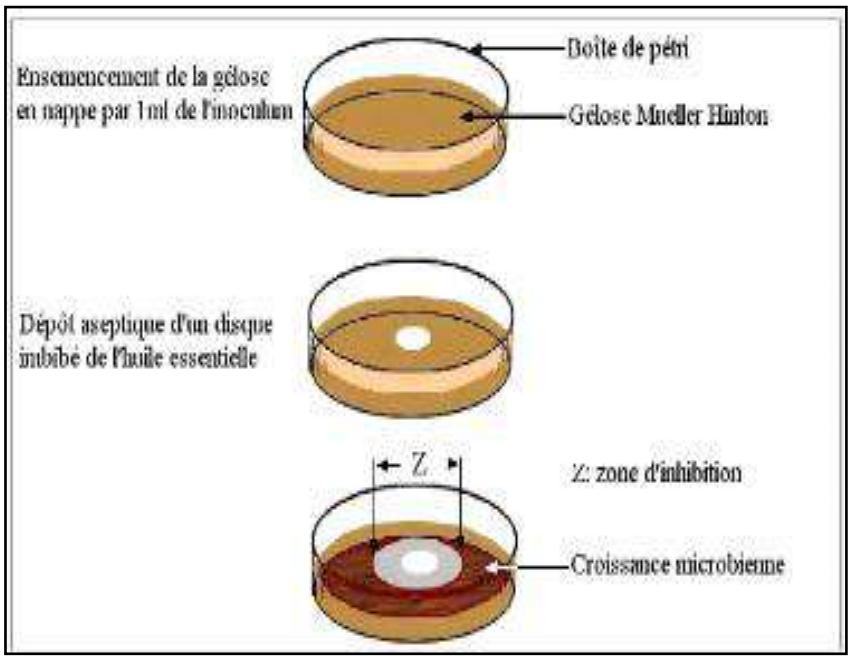


Figure II-8 : Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri [Zaika. L., 1988].

II.5.2.2 Microatmosphères

Dérivé de la méthode précédente le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromatogrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné.

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (Figure II-9).

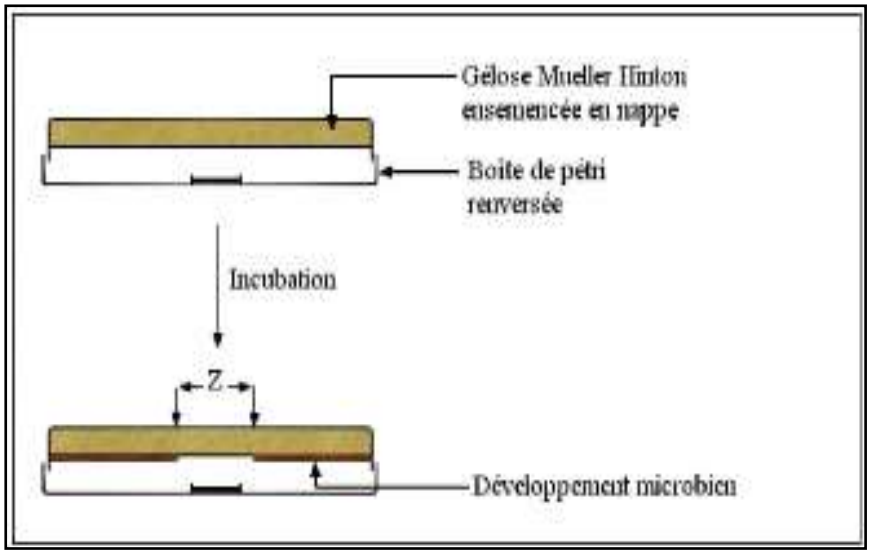


Figure II-9 : Illustration de la méthode des microatmosphères [Zaika. L., 1988].

Cette technique est utilisée dont le but est d'exploiter les propriétés de la phase volatile des huiles essentielles. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse sont encore peu nombreux [Sarbach. R., 1962; Didry. N et al., 1993; Billerbeck. G., 2000; Pibiri M.C et Seigniez., 2001].

II.6 Conclusion

L'étude des huiles essentielles est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. L'histoire de l'aromathérapie naquit ainsi et, avec les progrès de la science, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des plantes aromatiques et médicinales (PAM) d'authentiques médicaments.

L'Algérie, de part sa position géographique, jouit de plusieurs facteurs de pédogenèse et de grandes variations climatiques auxquels s'ajoutent les ressources hydriques, tous favorables au développement des cultures intensives des PAM.

Deuxième partie

Étude expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes

III.1 Matériel végétal

III.1.1 Récolte des plantes

Les trois plantes médicinales sélectionnées dans notre étude (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L) ont été récoltées pendant le mois d'Avril à Mai des régions Médéa ville, Benchicao et Berrouaghia respectivement. Ces régions sont situées dans la wilaya de Médéa qui se trouve au nord d'Algérie.

L'identification botanique des trois espèces sélectionnées pour notre étude a été faite par M^{me} Bentaoula (botaniste à la direction du développement agricole).

(A) **(B)** **(C)**



Figure III-1 : Les trois plantes utilisées dans l'extraction des huiles essentielles (**A :** *Pistacia lentiscus* L, **B :** *Marrubium vulgare* L, **C :** *Glycyrrhiza glabra* L).

III.1.2 Conservation des plantes

Les plantes fraichement récoltées, sont lavées et laissées sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant une semaine [Parthasarathy V.A et Chempakam. B., 2008]. Devenues sèches, les parties utilisées (Tableau III-1) sont récupérées dans des sacs propres. Notant qu'avant le lavage, une certaine quantité est récupérée pour la mesure du taux d'humidité.

Tableau III-1 : Organes végétaux destinés pour l'extraction.

L'espèce végétale	Les parties utilisées
Pistacia lentiscus L	Rameaux et feuilles
Marrubium vulgare L	Toute la plante
Glycyrrhiza glabra L	Tiges

III.1.3 Détermination de taux d'humidité

Le contenu en humidité des plantes à été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve (à 105°C) et de peser chaque une heure la plante jusqu'au l'obtention d'un poids constant (La différence entre deux pesées consécutives n'est pas significative) [Simpson W.T., 1999].

$$H(\%) = \left(\frac{A-B}{A}\right) * 100 \qquad \textbf{(III.1)}$$

Avec :

A : Poids de la plante fraiche.

B : Poids de la plante sèche.

H (%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage.

III.2 Procédés d'extraction des huiles essentielles

III.2.1 Extraction par Hydrodistillation

Les trois plantes médicinales (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L) sont soumises à une opération d'extraction par hydrodistillation en utilisant le montage schématisé dans la Figure III-2.



Figure III-2: Montage d'hydrodistillation.

III.2.1.1 Optimisation du rendement de l'extraction par hydrodistillation

Cette partie a pour but l'optimisation de certains facteurs influençant le rendement d'extraction par hydrodistillation, notamment :

- Le séchage.
- Le broyage.
- Le rapport pondéral (matière végétale/solution conductrice).

III.2.1.1.1 Effet de séchage

a. Matériel

- Ballon (1000 ml)
- Chauffe ballon.
- Colonne en verre.
- Réfrigérant.
- Ampoule à décanter.
- Balance analytique.

b. Réactifs

- Eau distillée.
- NaCl.
- Diéthyle éther.

c. Méthode

On pèse une quantité de 35 g de la plante choisie fraiche dans la 1ère expérience et la même quantité de la plante séchée à l'air libre et à l'ombre pendant 7 jours dans la 2ème expérience, en suite on met la matière végétale pesée dans un ballon d'un litre de volume et on verse d'environ 700 ml d'eau distillée.

On place sur le ballon un tube coudé et un réfrigérant à eau et on porte l'ensemble à l'ébullition grâce à un chauffe-ballon et on règle le débit de refroidissement, après, on place une ampoule à décanter à la sortie de réfrigèrent pour récupérer le distillat (huile essentielle + eau aromatique) chaque 20 minutes.

Lorsque le mélange (matière végétale et l'eau distillée) arrive à son point d'ébullition, les vapeurs chargées en huiles essentielles passent par le réfrigérant pour se condenser et dés l'apparition de la première goutte on démarre le chronomètre et on fait le relargage pour le condensat recueilli (eau aromatique + HE), ce dernier consiste à rendre les huiles essentielles extraites moins solubles dans l'eau en ajoutant du chlorure de sodium (NaCl). Puis on procède à la décantation du condensat recueilli avec du di-éthyle éther, puis mettre les phases organiques séparées (di-éthyle éther + HE) dans des tubes à essais secs et laisser le di-éthyle-éther s'évaporer. Enfin, on pèse les tubes à essais, la différence du poids représente les masses des huiles extraites.

d. Calcul du rendement

Le rendement en huiles essentielles est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal sec à traiter. Il est exprimé en pourcentage par la relation suivante :

$$R(\%) = \left(\frac{m}{M}\right) * 100 \qquad \textbf{(III.2)}$$

Avec :

R : Rendement en huile essentielle exprimé en (%).

m : Masse de l'huile essentielle en (g).

M : Masse de la matière végétale en (g).

III.2.1.1.2 Effet du broyage

Dans cette partie, on étudie l'influence du broyage des plantes sur le rendement de l'HE extraite par hydrodistillation.

- **Méthode**

On réalise le même montage précédent et on suit le même mode opératoire sauf qu'on utilise dans la 1ère expérience la plante sèche entière par contre on l'utilise sous forme de poudre fine (broyée) dans la 2ème expérience (les deux expériences sont répétées pour les trois plantes).

III.2.1.1.3 Effet du rapport pondéral

Le rapport pondéral (P) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'échantillon à traiter (m) et le volume de la solution conductrice utilisée (V). Il est exprimé en pourcentage par la relation suivante :

$$P\,(\%) = \left(\frac{m}{V}\right) * 100 \qquad \textbf{(III.3)}$$

Avec :

P : Rapport pondérale exprimé en (%).

m : Masse de la matière végétale exprimée en (g).

V : Volume de l'eau distillée exprimé en (ml).

- **Méthode**

Pour tous les essais de cette section :

- Le volume de l'eau distillée introduite dans le ballon est de 700 ml.
- La masse de la plante utilisé est de est de 21g ; 35g et 49g pour différentes valeurs de rapport pondéral de 3% ; 5% et 7% respectivement.
- Le temps de distillation est conditionné par la cinétique d'hydrodistillation des huiles essentielles.

Trois essais ont été réalisés pour chaque plante.

III.2.2 Extraction par solvants volatils à chaud (Extracteur Soxhlet)

Les trois plantes médicinales (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L) sont soumises à une opération d'extraction par macération à chaud (Soxhlet).

a. Matériels

- Ballon de 250 ml.
- Colonne.
- Réfrigérant.
- Plaque chauffante.
- Cartouche cellulosique.

b. Réactifs

- Éther diéthylique.
- Acétone.
- Éthanol.

Tableau III-2 : Propriétés des solvants utilisés.

Propriétés / Solvants	Formule chimique	Densité à 20°C (d)	Point d'ébullition (°C)	Polarité	Solubilité dans l'eau
Diéthyléther	$C_4H_{10}O$	0,7134	34,6	polaire	faiblement miscible
Acétone	CH_3COCH_3	0,79	56,53	polaire	soluble
Éthanol	C_2H_5OH	0.810	78.5	polaire	soluble

c. Méthode

Premièrement, on met une quantité de 5g de la matière végétale choisie sèche entière dans la cartouche, on place cette dernière dans le Soxhlet et on remplit le ballon avec 165 ml d'éther diéthylique (P = 3%). Après, on assemble le montage (Figure III-3) et on met la chauffe ballon en marche.

Quand le solvant condensé au récipient atteint son plus haut niveau, il retourne dans le ballon en entraînant les différents constituant dissous de la plante, cette opération est appelée siphonage. L'extrait avec le solvant est recueilli dans le ballon après un nombre de siphonage = 4 (un seul siphonage dure 45 min d'environ).On prend le solvant chargé d'extrait et on procède à l'évaporation de ce dernier à l'aide d'un évaporateur rotatif (Figure III-4). Enfin, on pèse l'extrait obtenu.



Figure III-3 : Montage pour extraction par Soxhlet.



Figure III-4 : Évaporateur rotatif.

III.2.2.1 Optimisation du rendement d'extraction par Soxhlet

III.2.2.1.1 Effet du broyage

Dans cette partie, on étudie l'influence du broyage des plantes sous forme de poudre fine sur le rendement de l'HE extraite par le montage de Soxhlet.

- **Méthode**

Dans cette expérience, on utilise les trois plantes sous forme de poudre fine (Broyée) et on compare les résultats par rapport à ceux obtenue avec les plantes entières pour voir quelle nature de plante donne les meilleurs rendements en extrait.

III.2.2.1.2 Effet de la durée d'extraction (Nombre de siphonage)

Dans cette partie, on étudie l'influence de la durée d'extraction (Nombre de siphonage) sur le rendement de l'HE extraite par le montage de Soxhlet. Notant qu'on utilise la plante broyée (sous forme de poudre fine).

- **Méthode**

On réalise le même montage précédent et on suit le même mode opératoire sauf que dans l'expérience précédente le nombre de siphonage était égal à 4 et dans ces deux expériences, il est égal à 5 et 6 respectivement.

III.2.2.1.3 Influence de la nature de solvant

Dans cette partie, on étudie l'influence de la nature de solvant sur le rendement de l'HE extraite par le montage de Soxhlet. Notant qu'on utilise la plante broyée (sous forme de poudre fine).

- **Méthode**

Dans cette expérience, on utilise l'acétone et l'éthanol comme des solvants d'extraction et on compare les résultats avec ceux obtenus avec du diéthyléther pour voir quel solvant donne les meilleurs rendements en extrait.

III.2.3 Extraction par solvants volatils à froid

Les plantes médicinales ont été soumises à une opération d'extraction par macération à froid.

- **Matériels**
  - Erlenmeyers avec bouchon.
  - Balance.
  - Entonnoir.
  - Buchner.
  - Évaporateur rotatif.

- **Réactifs**
  - Diéthyléther.
  - Acétone.

- **Méthode**

On réalise un mélange de 5g de la matière végétale choisie avec 165 ml du solvant et on le laisse séjourner pendant 7 jours. Puis on fait une filtration sous vide et on procède par la suite à l'évaporation du filtrat à l'aide d'un évaporateur rotatif et finalement on pèse l'extrait obtenu.

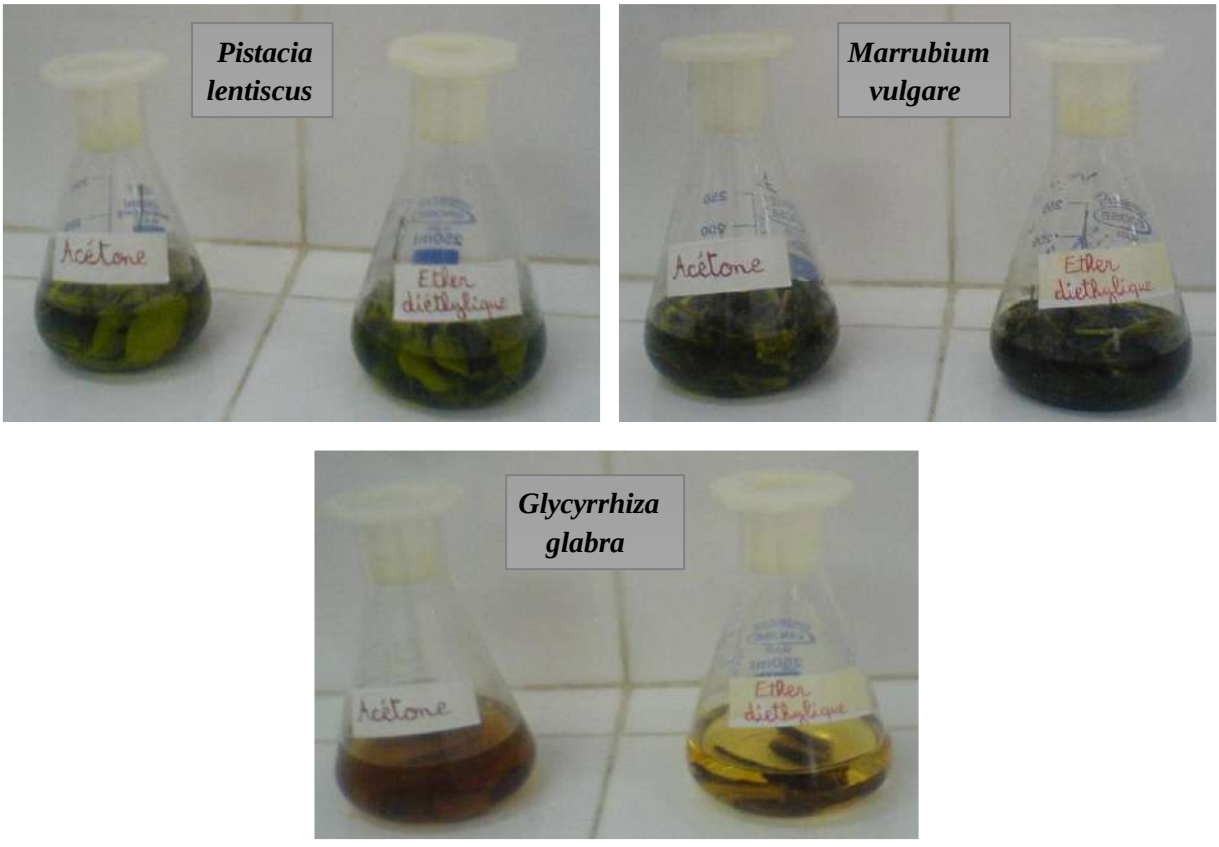


Figure III-5 : Extraction par solvants volatils à froid (macération).

III.3 Caractérisation et Analyse des huiles essentielles

III.3.1 Caractérisation des huiles essentielles

Le but de cette étude est de caractériser les huiles essentielles de (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L) par ses qualités organoleptiques et ses constantes physico-chimiques pour effectuer une étude comparative visant à vérifier sa conformité et apprécier la qualité de notre substrat végétale ainsi la détermination de la composition chimique de ces huiles.

III.3.1.1 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

On résume les caractéristiques organoleptiques des He dans le tableau III-3.

Tableau III-3 : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles.

Aspect	Odeur	Couleur
➢ L'aspect d'une HE dépend des produits qui la constituent. ➢ Il peut nous apparaitre sous forme solide, liquide, ou bien solide-liquide. ➢ Il est lié à la nature du produit désiré ainsi qu'au pouvoir de dissolution de la matière végétale.	➢ L'odeur est un sens chimique très sensible et d'après la nature du système olfactif, une substance pour être sentie doit être volatile.	➢ La couleur d'une HE dépend des produits qui constituent l'extrait. ➢ Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile.

III.3.1.2 Caractéristiques physiques des huiles essentielles

❖ **Densité relative (d_{20}^{20})**

La densité relative d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance à 20°C à la masse d'un volume égale d'eau à la même température [Pharmacopée. E., 2001].

La densité relative **(d_{20}^{20})** est donnée par la formule suivante :

$$d_{20}^{20} = \rho_{HE} / \rho_{eau} \qquad \textbf{(III.4)}$$

a. Matériel

- Fiole de 5 ml.
- Balance analytique.

b. Méthode

Au moyen d'une balance de précision et à l'aide d'une fiole de 5ml on a pesé 4ml d'HE de la plante choisie, puis on a pesé le même volume d'eau distillée (L'opération est faite pour les trois plantes).

❖ **Pouvoir rotatoire (α^{20}_{D})**

Le pouvoir rotatoire **(α^{20}_{D})** est la propriété que présentent certaines substances de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisé. L'angle de rotation optique d'un liquide est l'angle de rotation (a) exprimé en degré C^0 du plan de polarisation à la longueur d'onde λ de la raie D du sodium (avec λ = 589,3 nm) mesurée à 20°C sous une épaisseur de 1 décimètre [Pharmacopée. E., 2001].

Le pouvoir rotatoire ***(α^{20}_{D})*** est exprimé par la formule suivante :

$$\alpha^{t}_{D} = (A/L)*100 \qquad \textbf{(III.5)}$$

Avec **:**

A : Valeur de l'angle de rotation en milliradians ou degrés d'angle.

L : Longueur du tube utilisé, en décimètre,

(L = 0,1 dm).

a. Matériel

- Polarimètre.
- Cellule de 1 dm.

.



Figure III-6 : Polarimètre

b. Méthode

A une température spécifiée, introduire 20mg d'HE de la plante choisie dans la cellule de polarimètre en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée. Placer la cellule dans le polarimètre (Figure III-5), et lire l'angle de rotation dextrogyre (+) ou lévogyre (-) de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil [Pharmacopée. E., 2001].

❖ **Indice de réfraction (η_λ^t)**

L'indice de réfraction (η_λ^t) d'un milieu rapporté à l'air est égale au rapport du sinus de l'angle d'incidence d'un rayon lumineux dans l'air et le sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré [Pharmacopée. E., 2001].

a. Matériel

- Réfractomètre.

b. Méthode

On place 2 à 3 gouttes de l'HE de la plante choisie à l'aide d'une pipette dans la cellule de mesure jusqu'au trait signal, puis on referme le couvercle pendant 15 secondes (temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé à 20°C) et on règle avec les deux boutons, jusqu'à la localisation du trait signal au centre de la cellule. A la fin on lit la valeur de l'indice de réfraction sur le cercle gradué.



Figure III-7 : Refractomètre.

III.3.1.3 Caractéristiques chimiques des huiles essentielles

❖ **Indice d'acide (I_A) :**

L'indice d'acide (I_A) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un gramme de substance [Pharmacopée. E, 2001].

L'indice d'acide **(I_A)** est exprimé par la formule suivante :

$$I_A = \frac{5{,}61 \times n}{m} \qquad \textbf{(III.6)}$$

Avec :

5,61 : Équivalant de KOH.

n : Volume de V_{KOH} 0.1M consommée.

m : Masse de l'échantillon.

a. Matériel

- Fiole de 100 ml.
- Burette graduée.
- Pipette.
- Balance analytique.

b. Réactifs

- Alcool éthylique.
- Éther diéthylique.
- Hydroxyde de potassium 0,1 M.
- Phénol phtaléine.

c. Méthode

On dissolve 0,5g d'HE de la plante choisie dans 25ml d'un mélange à volumes égaux d'alcool et d'éther. Le solvant a été neutralisé au préalable par l'hydroxyde de potassium 0.1M en présence de 0.5ml de solution de phénophtaléine. Après dissolution, on titre par l'Hydroxyde de Potassium 0.1M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste pendant 15s au moins (n_{ml} d'Hydroxyde de Potassium 0.1M) (L'opération est faite pour les trois plantes) [Pharmacopée. E., 2001].

❖ **Indice de saponification (I_S)**

L'indice de saponification (I_S) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance.

a. Matériel

- Fiole 250 ml.
- Réfrigérant à reflux.
- Billes de verre.
- Bain marie.

b. Réactifs

- Hydroxyde de Potassium 0,5M Alcoolique.
- Phénolphtaléine.
- Acide Chlorhydrique 0,5M.

c. Mode opératoire

Dans une fiole de 250ml de verre borosilicaté munie d'un réfrigérant à reflux, on introduit la prise d'essai (m=0,5g) d'HE de la plante choisie. On ajoute en suite 25 ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5M et quelques billes de verre. On adapte le réfrigérant et on réalise le chauffage à reflux pendant 30min. puis on ajoute 1ml de solution de phénophtaléine et on titre immédiatement par l'acide chlorhydrique 0,5M (n_1 ml d'Acide Chlorhydrique 0,5M). à la fin on effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions (n_2 ml d'Acide Chlorhydrique 0,5M) [Pharmacopée. E., 2001].



Figure III-8 : Montage pour la détermination de l'indice de saponification.

❖ **Indice d'Ester** (I_E)

L'indice d'ester (I_E) exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification (I_S) et l'indice d'acide (I_A) selon la formule suivante :

$$I_E = I_s - I_A \qquad \textbf{(III.4)}$$

Avec :

I_E : Indice d'Ester.

I_s : Indice de Saponification.

I_A : Indice d'acide [Pharmacopée. E., 2001].

❖ **Miscibilité dans l'éthanol**

Une huile est dite miscible dans n volumes ou plus d'alcool d'un titre donné t, si la solution limpide dans n volumes demeure limpide comparée à huile essentielle non diluée, après addition progressive de nouvelles quantités d'alcool de même titre jusqu'à concurrence de 20 volumes d'alcool, (avec une température de 20 ± 0,2°C).

a. Méthode

On prend 1 ml d'HE de la plante choisies et on additionne 40 ml d'éthanol (L'ajout de l'éthanol se fait progressivement par des quantités identique égale à 1ml) et on agite à chaque fois.

❖ **Tests limites (Les métaux lourds)**

L'identification des métaux lourds est la détection de la présence de ces derniers par la comparaison (couleur) en présence d'un témoin. Cette identification suit toujours le dosage des cendres totales.

Les tests limites sont utilisés aux produits chimiques et matières premières utilisées dans l'industrie chimique et pharmaceutique, pour éviter les problèmes de toxicité et d'effets secondaires.

Cette manipulation a pour but de détecter la présence du plomb dans l'HE de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* Let *Glycyrrhiza glabra* L.

a. Matériel

- Becher.
- Six tubes en verre.
- Coton hydrophile.

b. Réactifs

- Thioacétamide (4%).
- NaOH (1N).
- Glycérine.
- Tampon acétate (PH=3,5).
- Standard de plomb.

c. Méthode

- On réalise un mélange de :
  - 3 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (1N).
  - 4 ml de glycérine.
  - 1 ml d'eau distillée.
- On ajoute au mélange 1,6 ml de thioacétatamide puis on chauffe le tout dans un bain marie pendant 20s et on refroidit.

- **Tubes échantillons**
  - **1er Tube :**
    - ✓ 12 ml d'eau distillée.
    - ✓ 0,125 g d'HE de *Pistacia lentiscus* L.
    - ✓ 2 ml du tampon acétate.
    - ✓ 1,2 ml du réactif thioacétatamide.
  - **2ème Tube :**
    - ✓ 12 ml d'eau distillée.
    - ✓ 0,099 g d'HE de *Marrubium vulgare* L.
    - ✓ 2 ml du tampon acétate.
    - ✓ 1,2 ml du réactif thioacétatamide.
  - **3ème tube :**
    - ✓ 12 ml d'eau distillée.
    - ✓ 0,056 g d'HE de *Glycyrrhiza glabra* L.
    - ✓ 2 ml du tampon acétate.
    - ✓ 1,2 ml du réactif thioacétatamide.
- **Tubes témoins :** on prend une série de 5 tubes, dans chacun on met :
  - ✓ 12 ml d'eau distillée.
  - ✓ 2 ml du tampon acétate.
  - ✓ 1,2 ml du réactif thioacétatamide.
  - ✓ Des quantités de : 1, 2, 3, 4 et 5 ppm ajoutées respectivement du plomb.

❖ **Taux d'humidité (Karl Fisher)**

La teneur en eau est déterminée par un appareil de Karl Fisher suivant la relation :

$$H = [(V^* F)/m] * 100 \quad \textbf{(III.5)}$$

Avec :

H : Teneur en eau (en %).

V : Volume indiqué sur le cadran de l'appareil (en ml).

m : Masse de l'échantillon (en mg).

F : Facteur de la solution de dosage Karl Fisher en mg/ml d'eau.

a. Matériel

La teneur en eau est déterminée par un appareil de Karl Fisher qui se compose de :

- Dosimètre.
- Électrode.
- Godet.

b. Réactifs

- Dioxyde de soufre.
- Méthanol.
- Iode.
- Pyridine.



Figure III-9 : Appareil de Karl Fisher.

c. Méthode

On met l'appareil en marche et on vérifie l'électrode et le godet et on note le volume initial après le bip sonore puis on introduit l'échantillon d'HE de la plante choisie à l'intérieur du godet (Figure III-8). On laisse se dissoudre. Après on commence la titration en appuyant sur la touche « START ». En suite on note le volume final après le bip qui indique la fin de dosage [Pharmacopée. E., 2001].

III.3.2 Analyse des huiles essentielles

III.3.2.1 Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une des méthodes utilisées pour l'identification des molécules organiques et inorganiques à partir de leurs propriétés vibrationnelles. En effet, le rayonnement infrarouge excite des modes de vibration spécifiques de liaisons chimiques. La comparaison entre rayonnement incident et transmis à travers l'échantillon suffit par conséquent à déterminer les principales fonctions chimiques présentes dans l'échantillon.

a. Méthode

- **Pour les HE extraites :**

À l'aide d'une seringue (ou pipette Pasteur) on verse une goutte de l'HE de la plante choisie dans le cône de remplissage de la cellule qui doit être tenue obliquement (pour éviter des bulles d'air). Puis on place cette cellule dans l'appareil et on obtient le spectre.

- **Pour les concrètes extraites :**

On pulvérise 1 à 3mg de la concrète avec environ de 30mg de KBr dans un mortier en agate et on mélange bien avec un broyage. Après, on remplit le moule de poudre, on place le piston et on le tourne quelque fois pour que la poudre soit bien répartie et on évacue le moule sous vide (élimination de bulle d'aire) puis on presse à haute pression. On arrête en suite le vide, on aère le moule, on lâche la pression et on sort la pastille du moule. Enfin, on attache la pastille à la fixation et la mettre sur le dispositif de fixation prévu à cet effet.

III.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles

a. Matériels

- Boite de pétri (1000 mm).
- Disques stériles (9 mm).
- Incubateur.
- Appareil pour la mesure de diamètre.

b. Milieux de cultures

- Soja Agar (gélose de soja tryptique).
- Sabouraud (gélose de dextrose de Sabouraud).

c. Solutions testées

- L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L extraite par hydrodistillation classique.
- L'extrait de *Pistacia lentiscus* L extrait par macération à froid utilisant l'acétone comme solvant d'extraction.
- L'extrait de *Marrubium vulgare* L obtenu par Soxhlet utilisant le diéthyléther comme solvant d'extraction.
- L'extrait de *Glycyrrhiza glabra* L obtenu par Soxhlet et macération à froid utilisant l'acétone et le diéthyléther respectivement comme solvants d'extraction.

d. Souches utilisées

Les souches utilisées dans notre travail son regroupées dans le tableau III-4.

Tableau III-4 : Les propriétés des souches bactériennes utilisées [Fauchère et Avril., 2002].

Souche	Type	Effet
Staphylococcus aureus **(ATCC 29737)**	Gram positif	Responsable d'infections graves communautaires et nosocomiales Responsable d'infections des plaies, de la peau et du sang.
Staphyloccocus Epidermidis **(ATCC 12228)**	Gram négatif	Responsable d'infection cutanée et d'infection nasale comme des sinusites.
Bacillus subtilus **(ATCC 10536)**	Gram positif	Elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire.
Escherichia Coli **(ATCC 6633)**	Gram négatif	E. coli peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies.
Candida albicans **(ATCC 10231)**	Une levure	Responsable de maladies dites cutanées et allergisantes.

III.4.1 Préparation des milieux de cultures

a. Soja Agar (gélose de soja tryptique) (Pour Staphylococcus aureus et epidermidis, Bacillus subtilus et E. coli)

❖ **Composition**

- Caséine : 15g.
- Farine de soja : 5g.
- Chlorure de sodium : 5g.
- Gélose : 15g.
- pH final : $7,3 \pm 0,2$.

❖ **Préparation**

- On met 40 g de poudre en suspension dans 1 L d'eau distillée et on mélange bien.
- On chauffe sous agitation fréquente et on laisse bouillir pendant 1 min jusqu'à dissolution complète
- On procède à la stérilisation en utilisant l'autoclave à 121°C pendant 15 à 20 min.

b. Sabouraud (Pour Candida albicans)

❖ **Composition**

- Peptone : 10g.
- Dextrose : 40g.
- Gélose : 15g.
- pH final : $6,5 \pm 0,2$.

❖ **Préparation**

On met 65 g de poudre en suspension dans 1 L d'eau distillée et on mélange bien, puis on chauffe sous agitation fréquente et on laisse bouillir pendant 1 min jusqu'à dissolution complète. On procède ensuite à la stérilisation en utilisant l'autoclave à 121°C pendant 15 à 20 min.

III.4.2 Réalisation d'aromatogramme

❖ **Mode opératoire**

Le mode opératoire est identique pour les différentes cultures et souches. On procède comme suit :

On met 21 ml de l'un des milieux de culture cité précédemment dans chaque boite de pétri en le répartissant uniformément dans les boites et on le laisse se solidifier un court moment. Puis, on dépose les souches bactériennes de concentration cellulaire [C] = 10^6 c/ml dans les milieux de culture appropriés par la méthode d'ensemencement.

Après, on dépose dans chaque boite des disques en papier buvard imbibés dans l'huile essentielle ou dans l'extrait obtenu par Soxhlet ou macération à froid utilisant le diéthyléther ou l'acétone comme solvant d'extraction.

Enfin, On procède les boites de pétri à une incubation de 24 heures à une température de 35°C pour Staphylococcus aureus et epidermidis, Bacillus subtilus et E. coli et une incubation de 48 heures à une température de 25°C pour Candida albicans. Et après la période d'incubation, on mesure le diamètre inhibition à l'aide d'un appareil pour la mesure de diamètre (Figure III-9).



Figure III-10 : Appareil de lecture des diamètres d'inhibitions (FICHER LILIY).

Chapitre IV

Résultats et discussion

CHAPITRE IV

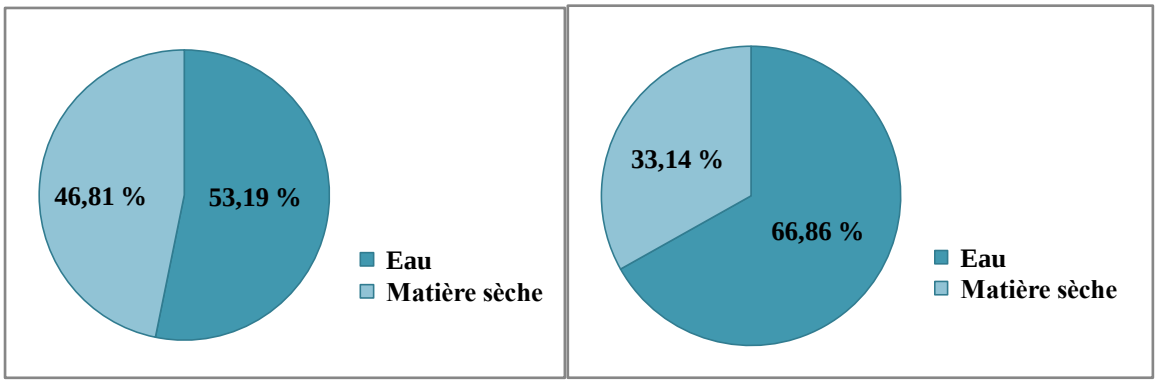
RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre tous les résultats expérimentaux obtenus lors de cette étude sont présentés et discutés, tout en démarrant par la détermination du taux d'humidité puis on entame à l'étude de l'influence des paramètres opératoires sur les différents processus d'extraction.

IV-1 Taux d'humidité

La figure IV-1 représente la teneur en eau des trois plantes médicinales. Les résultats obtenus montrent la richesse des plantes en eau, le taux d'humidité varie de 40 à 70 % ce qui signifie que l'eau constitue presque la moitié du poids total de la plante fraiche.

***Pistacia lentiscus* L** ***Marrubium vulgare* L**



***Glycyrrhiza glabra* L**

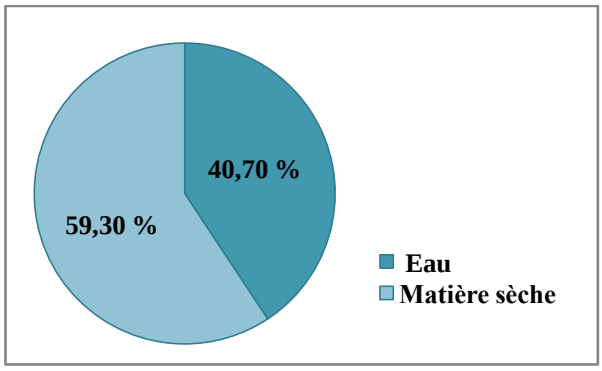


Figure IV-1 : Teneur en eau des trois plantes médicinales.

IV.2 Rendement en huile essentielle

IV.2.1 Hydrodistillation classique

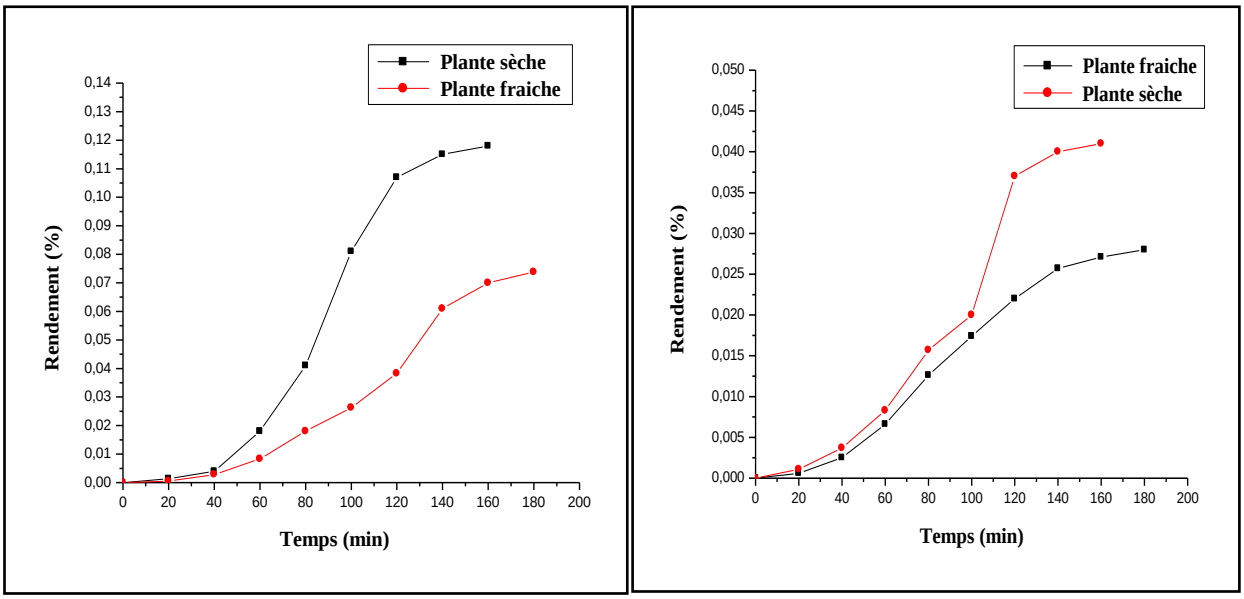
Afin d'optimiser les différents paramètres modifiants le rendement d'extraction, on a essayé d'évaluer la cinétique du procédé d'HD classique par l'étude de l'influence de séchage, de broyage ainsi que l'hydromodule (Rapport pondéral) sur la quantité d'HE obtenue.

IV.2.1.1 Effet de séchage

a. Résultats

La figure IV-2 représente les résultats trouvés en terme de rendement après réalisation de l'hydrodistillation classique sur les trois plantes (état sec et frais).

***Pistacia lentiscus* L** ***Marrubium vulgare* L**



***Glycyrrhiza glabra* L**

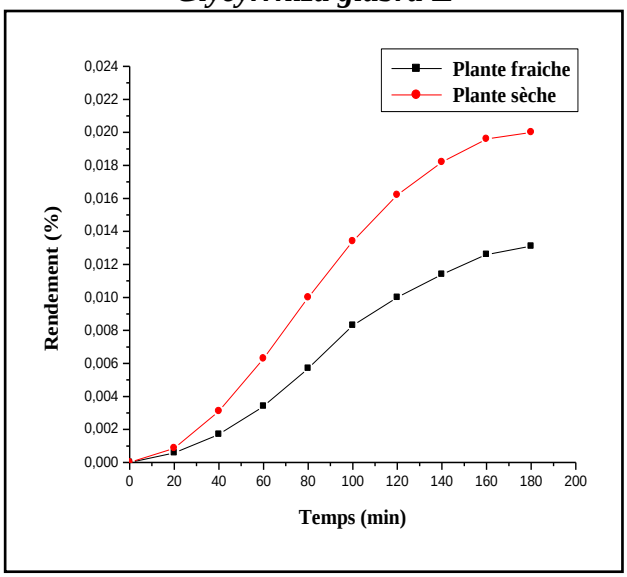


Figure IV-2 : Effet de séchage sur le rendement obtenu par HD des trois plantes médicinales.

b. Discussion

Pour les trois plantes : *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L, les rendements obtenus par utilisation de la matière végétale sèche (0.118%; 0,041% et 0,020%) sont plus quantitatifs que ceux obtenus avec la matière végétale fraiche (0.0738% ; 0.028% et 0,0131%). Et par conséquent le séchage a augmenté le rendement en HE de 59,89 % pour *Pistacia lentiscus* L, de 46,62 % pour *Marrubium vulgare* L et de 52,67 % pour *Glycyrrhiza glabra* L. Cela s'explique par le fait que la masse de la matière végétale fraiche utilisée renferme une quantité d'eau contrairement à une même masse de matière végétale sèche, donc la masse de la matière végétale traitée est pratiquement différente dans les deux cas.

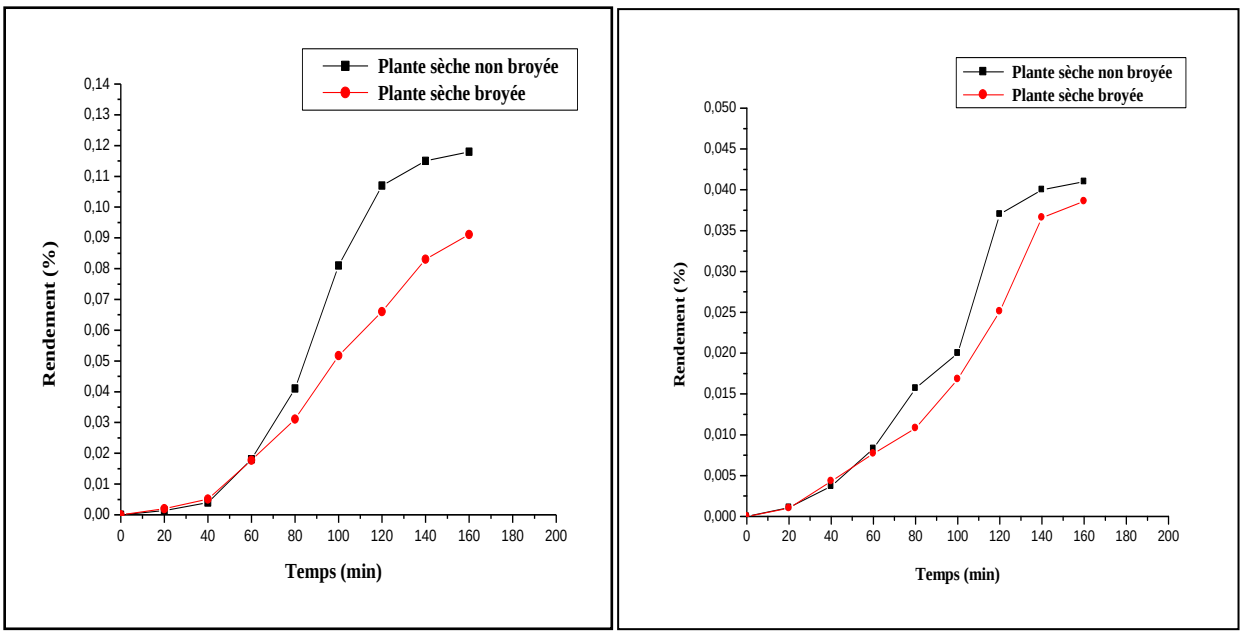
Et d'autre part, selon Zrira. S et Benjilali. B, (1991), la plante après sa récolte continue à vivre et son activité de biosynthèse des terpènes et dérivés s'accentue pour quelques jours donc le séchage de la plante, avant sa mise en distillation, est un traitement qui a des effets très nets sur le rendement en huile essentielle.

IV.2.1.2 Effet du broyage

a. Résultats

Les résultats de la cinétique d'extraction obtenues après réalisation de l'hydrodistillation classique sur les trois plantes (broyées et non broyées) sont illustrées dans la figure IV-3.

***Pistacia lentiscus* L** ***Marrubium vulgare* L**



***Glycyrrhiza glabra* L**

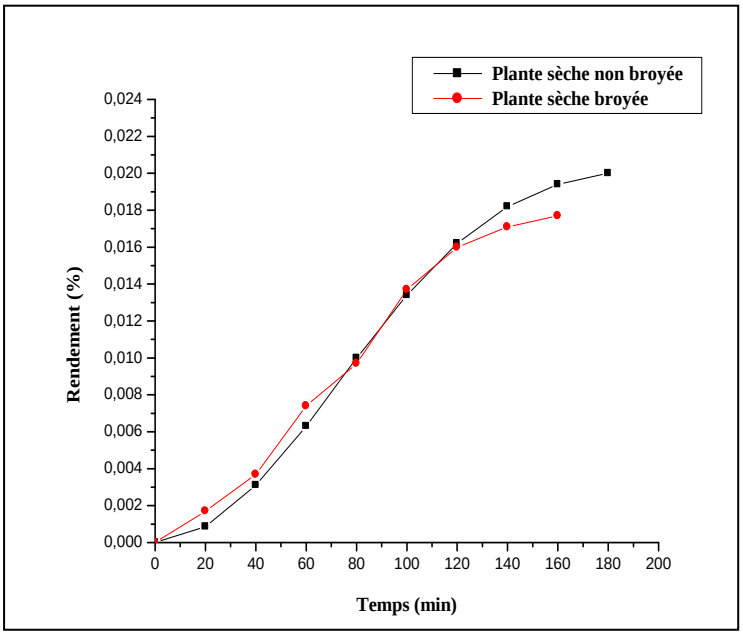


Figure IV-3 : Effet de broyage sur le rendement obtenu par HD des trois plantes médicinales.

b. Discussion

Pour les trois plantes : *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L, les plantes non broyées ont donné des rendements en HE (0.118%; 0,041% et 0,02%) supérieurs à ceux obtenus dans le cas des plantes broyées sous forme de poudre fine ($0{,}1\ mm < \phi < 0{,}63mm$) (0,0911%; 0,0386% et 0,0177%). On peut noter que le broyage a diminué le rendement en HE de 29,53 % pour *Pistacia lentiscus* L, de 6,22% pour *Marrubium vulgare* L et de 12,99 % pour *Glycyrrhiza glabra* L.

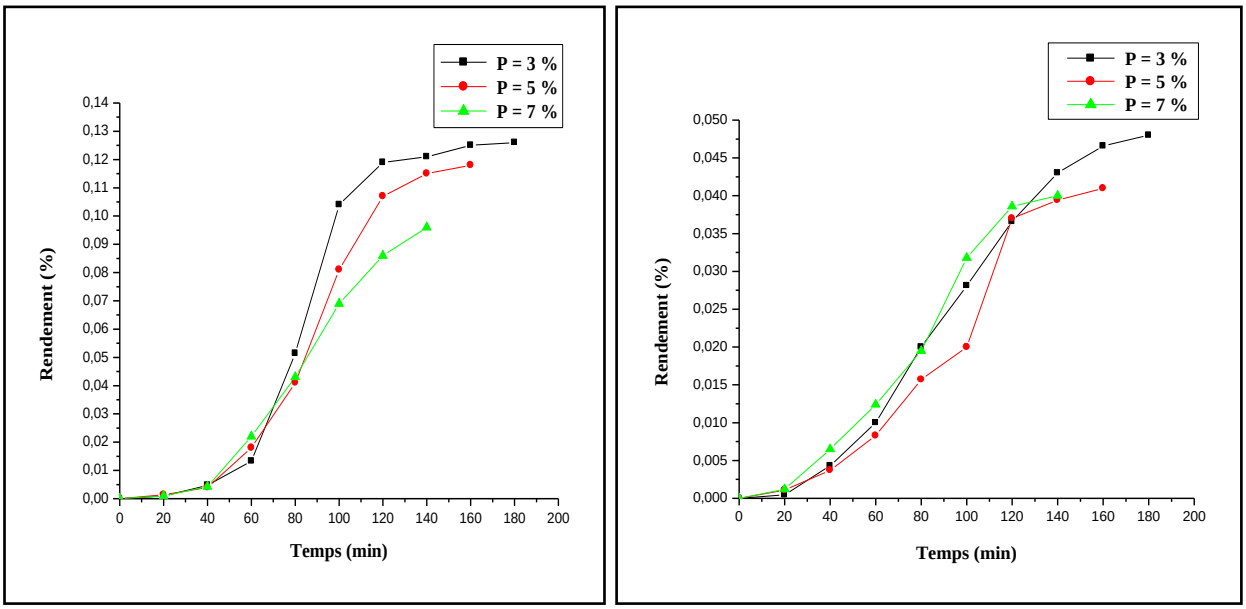
Selon les travaux de Zrira. S et Benjilali. B., (1991), un broyage trop fin risque de provoquer un colmatage ce qui ralentit la vitesse de distillation. Il peut également entraîner l'apparition des chemins préférentiels pour la vapeur et réduire par conséquent, les rendements en huile essentielle. Donc on voit nettement l'effet négatif de cette granulométrie sur le rendement de distillation.

IV.2.1.2 Effet du rapport pondéral

a. Résultats

Les résultats en terme de rendement des procédés d'extractions effectués sur les plantes médicinales en utilisant des différents rapports pondéraux sont représentés dans les graphes suivants :

***Pistacia lentiscus* L** ***Marrubium vulgare* L**



***Glycyrrhiza glabra* L**

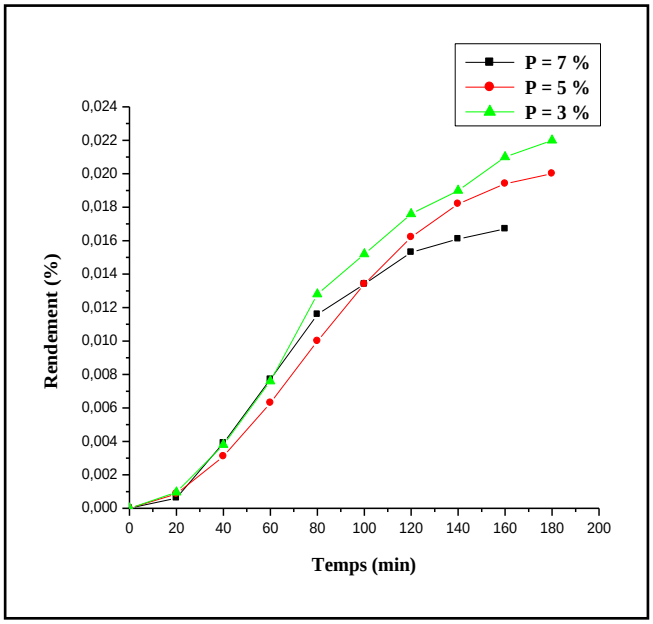


Figure IV-4 : Effet du rapport pondéral sur le rendement obtenu par HD pour les trois plantes médicinales.

b. Discussion

La figure IV-4 montre les cinétiques d'HD menées pour différents valeurs de rapport pondéral (3%, 5 % et 7%). Les rendements en HE obtenus à différents rapports pondéraux (3%, 54% et 7%) sont (0,126%; 0,118% et 0,096%) pour *Pistacia lentiscus* L, (0,048%; 0,041% et 0,040%) pour *Marrubium vulgare* L et (0,022% ; 0,02% et 0,0167%) pour *Glycyrrhiza glabra* L.

D'une manière individuelle on peut observer que le rapport pondéral de 3% donne toujours le rendement le plus intéressant par rapport à ceux obtenus avec les rapports pondéraux les plus grands (5% et 7%).

En termes de rendement, un rapport pondéral faible conduit aux meilleurs résultats. Plus le rapport matière végétale/eau est faible plus que le rendement est important. Cela peut être interpréter comme suit : plus que le rapport matière (végétale/eau) est faible plus la surface de contact entre la plante et la solution extractive est importante se qui facilite l'hydrodiffusion et les échanges liquide-solide et augmente par conséquent le rendement en HE.

D'autre part, et selon Muñoz. F., (1987), plus la quantité de matière végétale dans la solution est importante, plus la phase aqueuse devient de plus en plus chargée en matière organique au cours du temps, ce qui limite par conséquent le phénomène de diffusion de l'HE. En plus un tassement trop fort risque de provoquer un "colmatage" de la masse végétale ce qui ralentit la distillation.

IV.2.2 Extraction par solvants volatils à chaud (Extracteur Soxhlet)

Après réalisation de l'extraction par Soxhlet et l'évaporation du solvant on observe que l'extrait est un mélange de différents composés de la plante (concrète) et pour séparer l'huile essentielle à partir de ce dernier on doit utiliser des techniques spéciales et couteuses (non disponibles). Donc l'étude de rentabilité du procédé étudié sera purement quantitative.

IV.2.2.1 Effet du broyage

a. Résultats

Les résultats du rendement d'extraction obtenus après réalisation de l'extraction par solvants volatils à chaud sur les trois plantes (broyées et non broyées) sont illustrées dans la figure IV-5.

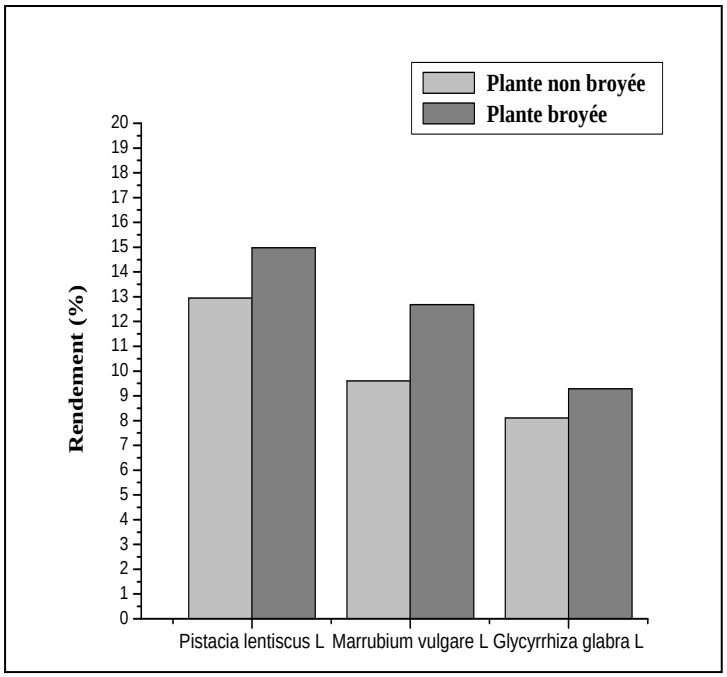


Figure IV-5 : Influence de broyage sur le rendement en extrait obtenu par Soxhlet.

Après l'évaporation du solvant on observe que l'extrait est un mélange de différents composés de la plante. Donc on n'a pas pu séparer l'huile essentielle à partir de ce mélange, et on constate que cette méthode demande des techniques spéciales et plus couteux.

b. Discussion

Les résultats illustrés dans la figure IV-5 montre que la plante *Pistacia lentiscus* L présente toujours le rendement en extrait (concrète) le plus élevé en comparant avec celui de *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L. Les rendements en extrait obtenus pour *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L en utilisant les plantes non broyées sont (12,94%; 9,6% et 8,10%) respectivement. Par contre les rendements en extrait obtenus en utilisant les plantes broyées sont (14,98%; 12,68% et 9,28%) respectivement.

Le broyage a augmenté le rendement de 15,76% ; 30,08% et de 14,56 % pour *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L respectivement.

Pour le montage de Soxhlet, il n'ya pas un risque d'agglomération de la plante donc le broyage a un effet positif sur le rendement en extrait obtenu par Soxhlet. D'après les auteurs, le broyage assure une extraction de l'huile essentielle par l'augmentation de la surface d'échange.

IV.2.2.2 Effet de nombre de siphonage

a. Résultats

Les résultats obtenus à l'issue de la procédure visant à déterminer la durée d'extraction optimale sont présentés ci-dessous :

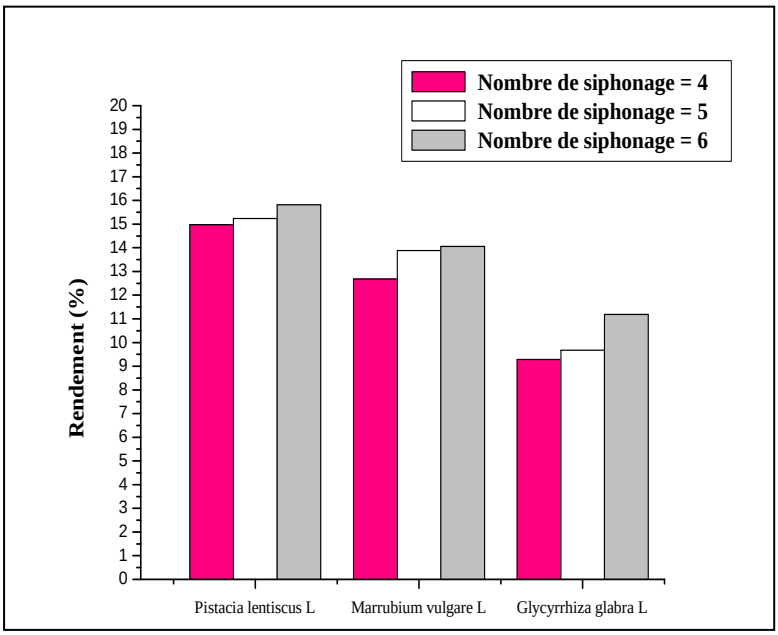


Figure IV-6 : Influence de la durée d'extraction sur le rendement obtenu par Soxhlet.

b. Discussion

Pour les trois plantes médicinales (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L), le rendement augmente avec l'augmentation de nombre de siphonage. L'augmentation de la durée d'extraction de 90 min (qui correspond à 2 siphonage en plus) a augmenté le rendement de 5,6% ; 10,88 % et 20,47 % pour *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L respectivement. C'est à dire pour augmenter le rendement est mieux d'augmenter le nombre de siphonage le plutôt possible.

Par ailleurs, la composition de l'extrait obtenue n'est pas nécessairement constante pendant toute la durée d'extraction. En effet, la diffusion à travers les membranes ou les tissus où est stockée l'huile ou l'extrait dans le végétal varie d'une molécule à l'autre.

A titre d'approximation, et d'après Deslauriers. H et Collin. G., (1992), on peut imaginer que les monoterpènes, molécules plus petites et plus légères que les sesquiterpènes, diffuseront plus vite que ces dernières et donc extrairont plus vite. Par ailleurs, il ya des cas où les constituants de l'huile ou d'extrait ne sont pas tous situés dans les mêmes organes. Si les terpènes par exemple sont extraits dans les premières 30 min, d'autres constituants demandent plusieurs heures d'extraction.

IV.2.2.3 Effet de la nature de solvant

a. Résultats

Les résultats de l'étude de la répercussion de la nature de solvant utilisé dans l'extraction de l'huile des trois plantes sont représentés dans l'histogramme suivant :

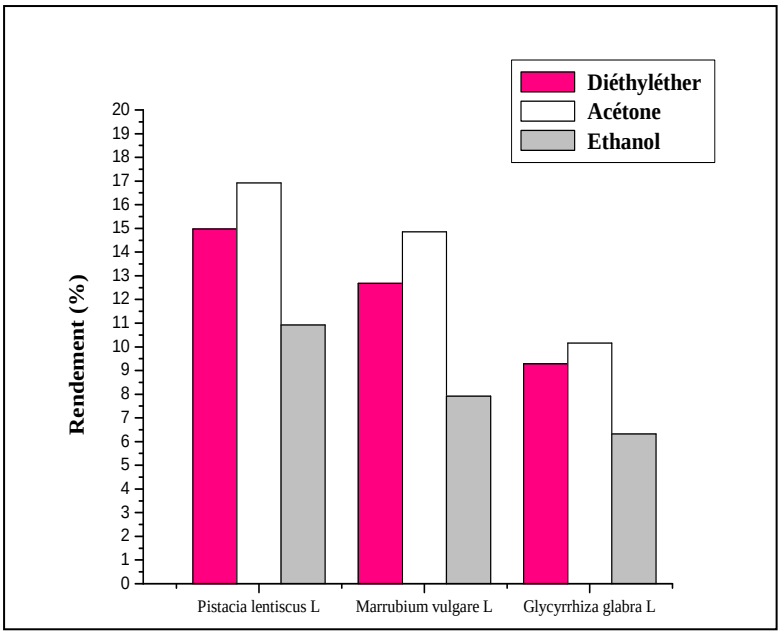


Figure IV-7 : Influence de la nature de solvant sur le rendement obtenu par Soxhlet.

b. Discussion

Dans l'étude de la répercussion de la nature du solvant utilisé dans le procédé d'extraction par solvants volatils à chauds, comme le montre la figure (IV-7). Il s'avère des résultats obtenus, que pour les trois plantes médicinales (*Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L), l'acétone a donné toujours le meilleur rendement par rapport à L'éther diéthylique. Ce dernier a donné un rendement supérieur en comparaison avec l'éthanol.

Les rendements en extrait obtenus en utilisant l'acétone, le diéthyléther et l'éthanol comme des solvants d'extraction sont (16,92% ; 14,98% et 10,92%) respectivement pour *Pistacia lentiscus* L, (14,86% ; 12,68% et 7,92%) respectivement pour *Marrubium vulgare* L et de (10,16% ; 9,28% et 6,32%) respectivement pour *Glycyrrhiza glabra* L.

L'acétone a augmenté le rendement de 12,95 % ; 17,19 % et de 9,48 % par rapport à l'éther diéthylique pour *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L respectivement. Donc on peut dire que l'acétone est le meilleur solvant d'extraction parmi les solvants utilisés dans l'extraction par Soxhlet.

IV.2.3 Extraction par solvants volatils à froid (Macération à froid)

a. Résultats

Les résultats du rendement du procédé (macération) effectué sur les plantes médicinales en utilisant deux solvants différents sont représentés dans l'histogramme suivant :

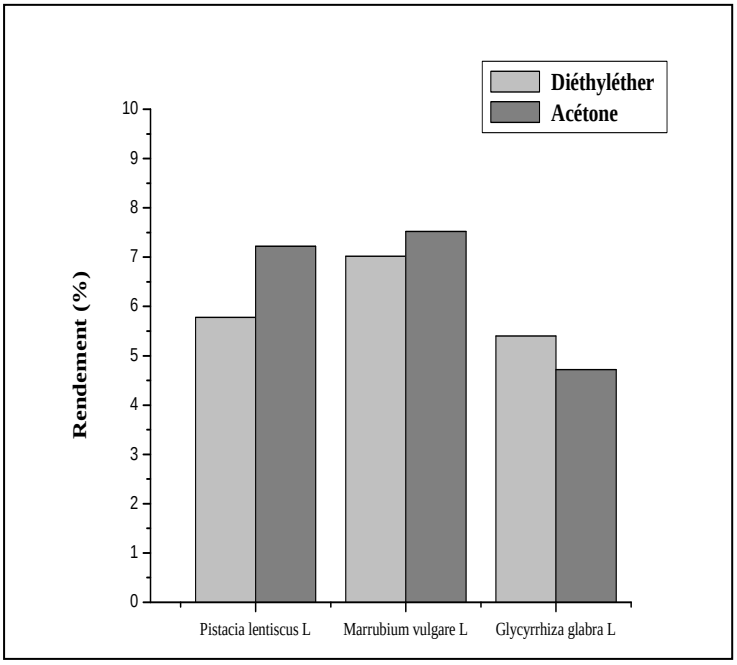


Figure IV-8 : Variation de rendement des trois plantes médicinales en fonction de la nature du solvant utilisé.

b. Discussion

Dans les méthodes précédentes : *Pistacia lentiscus* L a donné le meilleur rendement dans toutes les expériences. Par contre *Marrubium vulgare* L présente dans cette méthode un rendement le plus élevé par rapport au *Pistacia lentiscus* L et *Glycyrrhiza glabra* L. L'acétone donne le meilleur rendement par rapport à l'éther diéthylique sauf pour *Glycyrrhiza glabra* L ou on remarque le contraire. Cela du peut être par des erreurs lors de l'extraction.

En comparent les rendements de toutes les méthodes d'extraction précédentes, on constate que le meilleur rendement est celui d'extraction par Soxhlet, en prenant la plante broyée (sous forme de poudre fine) et en utilisant l'acétone comme solvant d'extraction.

IV.3 Caractérisation et Analyse des huiles essentielles

IV.3.1 Caractérisation des huiles essentielles

IV.3.1.1 Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques de L'HE et de concrète des trois plantes médicinales sont regroupées dan les tableaux IV-1 et IV-2 respectivement.

Tableau IV-1 : Caractéristiques organoleptiques de L'HE extraite par hydrodistillation des trois plantes médicinales.

Caractéristiques Organoleptiques / Plante	Aspect	Couleur	Odeur
Pistacia lentiscus L	Liquide mobile limpide	Incolore à jaune pâle	Intense, herbacée
Marrubium vulgare L	Liquide mobile limpide	Jaune très pâle	Intense, herbacée
Glycyrrhiza glabra L	Liquide visqueux	Jaune pâle	Intense, herbacée



Figure IV-9 : L'HE extraite par HD de des trois plantes médicinales.

Tableau IV-2 : Caractéristiques organoleptiques de concrète extraite par macération à chaud (Soxhlet) et macération à froid des trois plantes médicinales.

Caractéristiques Organoleptiques / Plante	Aspect	Couleur	Odeur
Pistacia lentiscus L	Pate grasse	Vert	Intense, herbacée
Marrubium vulgare L	Pate grasse	Vert trop foncé	Intense, herbacée
Glycyrrhiza glabra L	Pate grasse	Marron	Intense, herbacée

Après dilution des concrètes obtenues par extraction à chaud (soxhlet) on obtient les echantillons illustrés dans la figure IV-10.



Figure IV-10 : Les concrètes (diluées) extraites par macération à chaud (Soxhlet).

IV.3.1.2 Caractéristiques physiques des huiles essentielles

❖ **Densité relative (d_{20}^{20})**

a. Résultats

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Résultats de la densité relative.

	***Pistacia lentiscus* L**	***Marrubium vulgare* L**	***Glycyrrhiza glabra* L**
La densité relative	0,864	0,890	0,901

b. Discussion

Les valeurs obtenues de la densité de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et de *Glycyrrhiza glabra* L appartiennent aux normes.

❖ **Pouvoir rotatoire (α^{20}_{D})**

a. Résultats

L'analyse de l'HE des trois plantes médicinales donne les pouvoirs rotatoires mentionnés dans le tableau IV-4.

Tableau IV-4 : Résultats du pouvoir rotatoire.

	***Pistacia lentiscus* L**	***Marrubium vulgare* L**	***Glycyrrhiza glabra* L**
Le pouvoir rotatoire	-47,53	-10,63	+34,66

b. Discussion

D'après les résultats obtenus expérimentalement nous constatons que l'HE de *Pistacia lentiscus* L *et de Marrubium vulgare* L a la propriété de faire dévier le plan de polarisation de la lumière (lévogyre -) vers la gauche et que L'HE de *Glycyrrhiza glabra* L a la propriété de faire dévier le plan de polarisation de la lumière (lévogyre +) (quand on fait face à la lumière).

❖ **Indice de réfraction (η_λ^t)**

a. Résultats

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV-5.

Tableau IV-5 : Résultats d'indice de réfraction.

	***Pistacia lentiscus* L**	***Marrubium vulgare* L**	***Glycyrrhiza glabra* L**
Indice de réfraction	1,4725	1,4538	1,5040

b. Discussion

Les valeurs obtenues de l'indice de réfraction obtenu de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et de *Glycyrrhiza glabra* L appartiennent aux normes.

IV.3.1.3 Caractéristiques chimiques des huiles essentielles

❖ **Indice d'acide (I_A)**

a. Résultats

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV-6.

Tableau IV-6 : Résultats d'indice d'acide.

	***Pistacia lentiscus* L**	***Marrubium vulgare* L**	***Glycyrrhiza glabra* L**
Indice d'acide	2,085	3,071	2, 406

b. Discussion

L'indice d'acide déterminé renseigne sur la qualité d'HE, en effet plus l'indice d'acide est élevé plus la qualité de l'HE est moins bonne, car l'I_A représente la concentration totale en acide gras se trouvent libres.

Les valeurs de l'indice d'acide de l'huile extraite de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et de *Glycyrrhiza glabra* L est moins élevées ce qui montre la bonne qualité d'HE obtenue.

❖ **Indice de saponification (I_S)**

a. Résultats

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV-7.

Tableau IV-7 : Résultats d'indice d'acide.

	***Pistacia lentiscus* L**	***Marrubium vulgare* L**	***Glycyrrhiza glabra* L**
Indice de saponification	9,110	176,531	27,139

b. Discussion

- L'indice de saponification rend compte de la langueur des chaines hydrocarbonées des acides gras.
- Il caractérise le poids moyen de la matière grasse auquel il est inversement (plus le poids moléculaire est élevé plus l'indice de saponification est faible).
- D'après les résultats obtenus expérimentalement nous estimons que le poids moléculaire de l'HE de *Pistacia lentiscus* L *et Glycyrrhiza glabra*Lest élevé par contre le poids moléculaire de *Marrubium vulgare* L est faible.

❖ **Indice d'Ester (I_E)**

a. Résultats

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV-8.

Tableau IV-8 : Résultats d'indice d'ester.

	***Pistacia lentiscus* L**	***Marrubium vulgare* L**	***Glycyrrhiza glabra* L**
Indice d'ester	7,025	173,46	25,63

❖ **Miscibilité dans l'éthanol**

a. Résultats

Pour les trois plantes médicinales **(***Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L), on obtient une seule phase.

b. Discussion

L'obtention d'une seule phase implique que les HE de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L sont totalement miscible dans l'éthanol.

❖ **Tests limites (Les métaux lourds)**

a. Résultats

Après un certain temps (5min) et sur un fond blanc on remarque que la couleur des solutions examinées dans le tube échantillon est moins intense par rapport à celle du tube témoin de 1ppm du plomb. Ce résultat est pour une masse de 0,125g d'HE de *Pistacia lentiscus* L, 0,099g d'HE de *Marrubium vulgare* L et 0,056g d'HE de *Glycyrrhiza glabra* L.

b. Discussion

La coloration intense du témoin de 1ppm du plomb par rapport à celle de la solution d'échantillon montre que la présence des métaux lourds dans 1g d'HE de *Pistacia lentiscus* L est inférieure à 8ppm, dans 1g d'HE de *Marrubium vulgare* L est inférieure à 10 ppm et dans 1g d'HE de *Glycyrrhiza glabra* L est inférieur à 18 ppm.

❖ **Taux d'humidité (Karl Fisher)**

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau IV-9.

Tableau IV-9 : Résultats de taux d'humidité de l'HE des trois plantes médicinales.

	***Pistacia lentiscus* L**	***Marrubium vulgare* L**	***Glycyrrhiza glabra* L**
Taux d'humidité (%)	0,178	0,318	0,097

IV.3.2 Analyse des huiles essentielles

❖ **Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge**

a. Résultats

Les résultats de l'étude par spectrophotomètre infrarouge des huiles extraites par hydrodistillation et par Soxhlet (en utilisant l'acétone comme solvant d'extraction) sont donnés dans les figures (IV-11, IV-12, IV-13, IV-14, IV-15, IV-16).

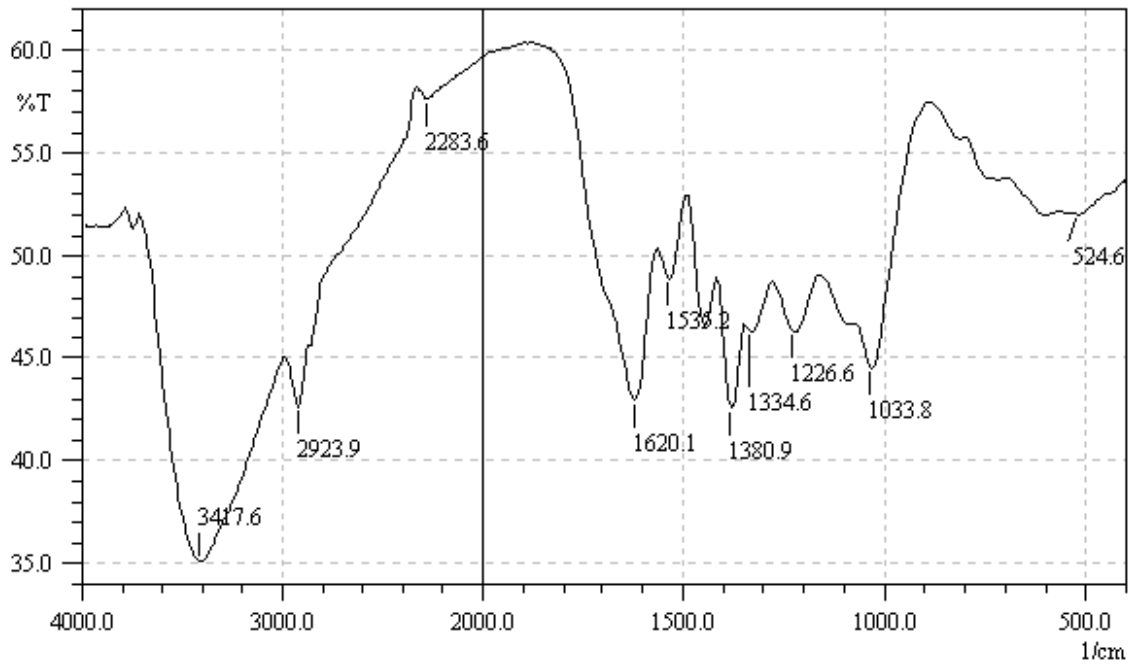


Figure IV-11 : Spectre infrarouge d'HE de *Pistacia lentiscus* L.

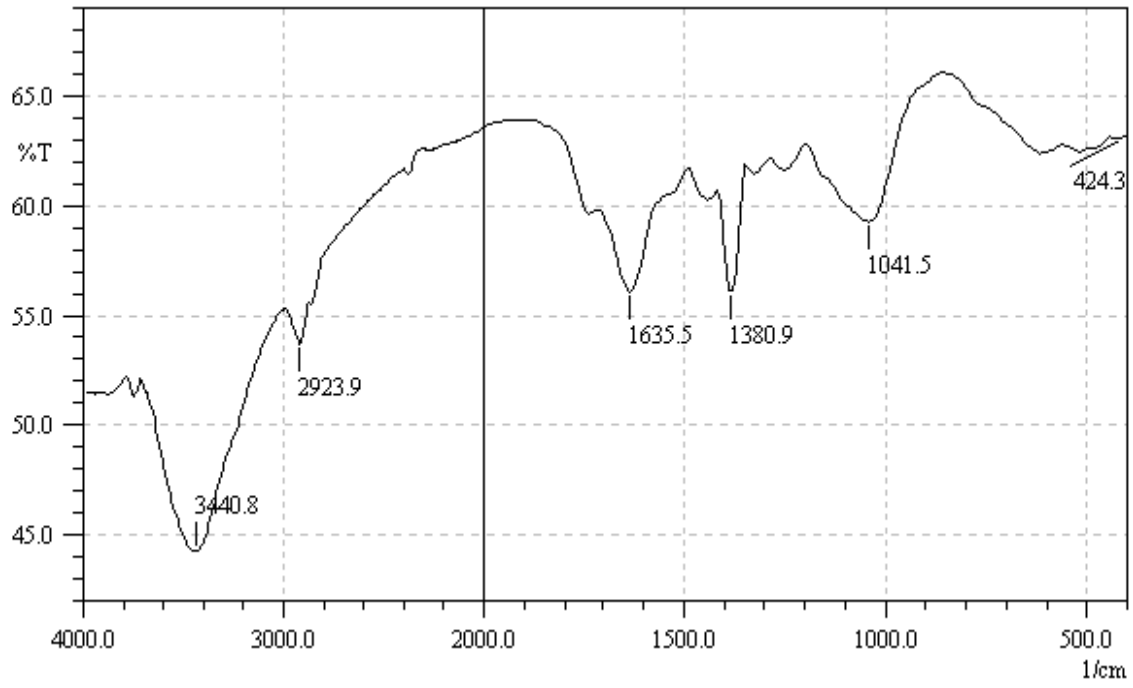


Figure IV-12 : Spectre infrarouge d'HE de *Marrubium vulgare* L.

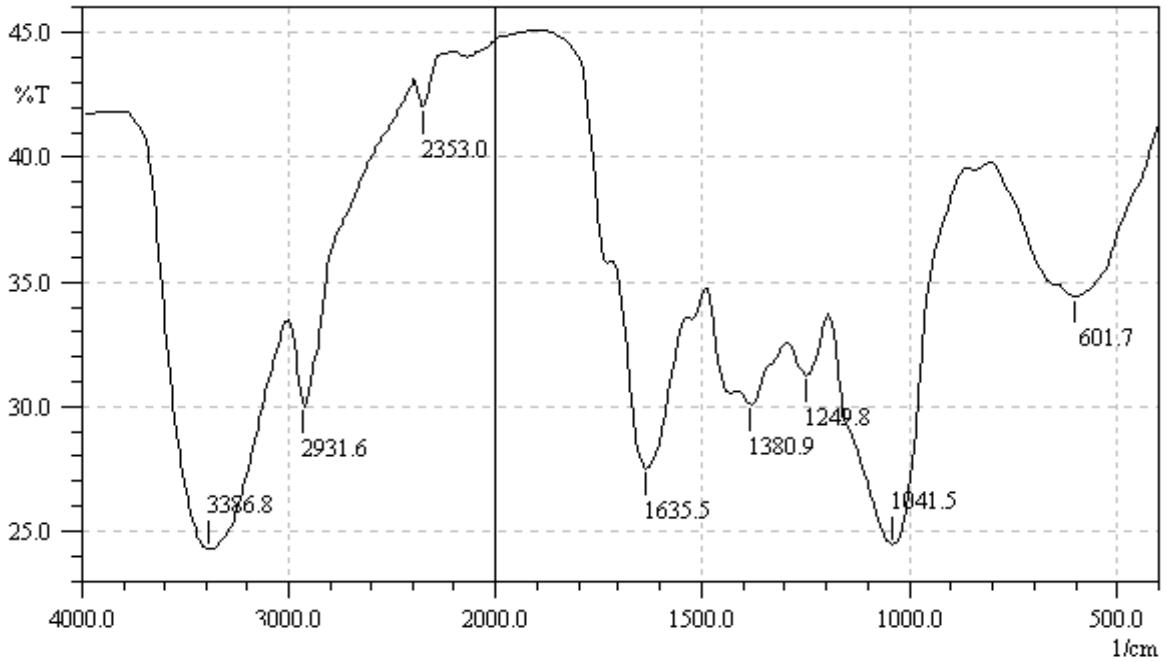


Figure IV-13 : Spectre infrarouge d'HE de *Glycyrrhiza glabra* L.

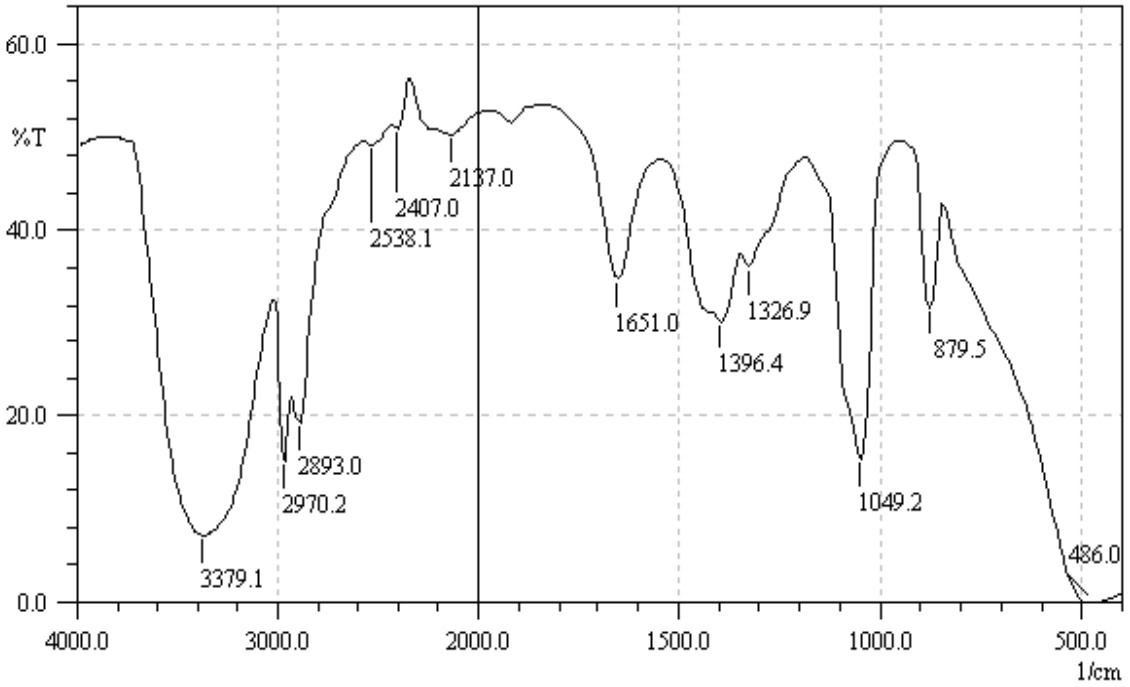


Figure IV-14 : Spectre infrarouge de concrète de *Pistacia lentiscus* L.

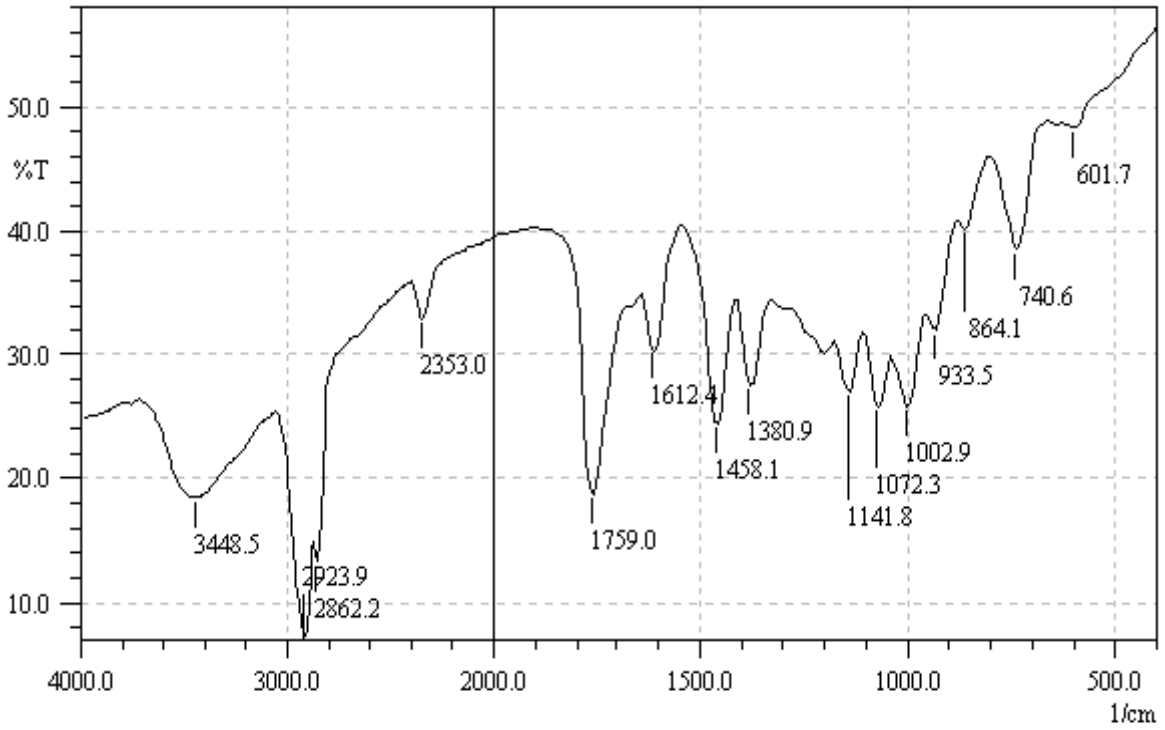


Figure IV-15 : Spectre infrarouge de concrète de *Marrubium vulgare* L

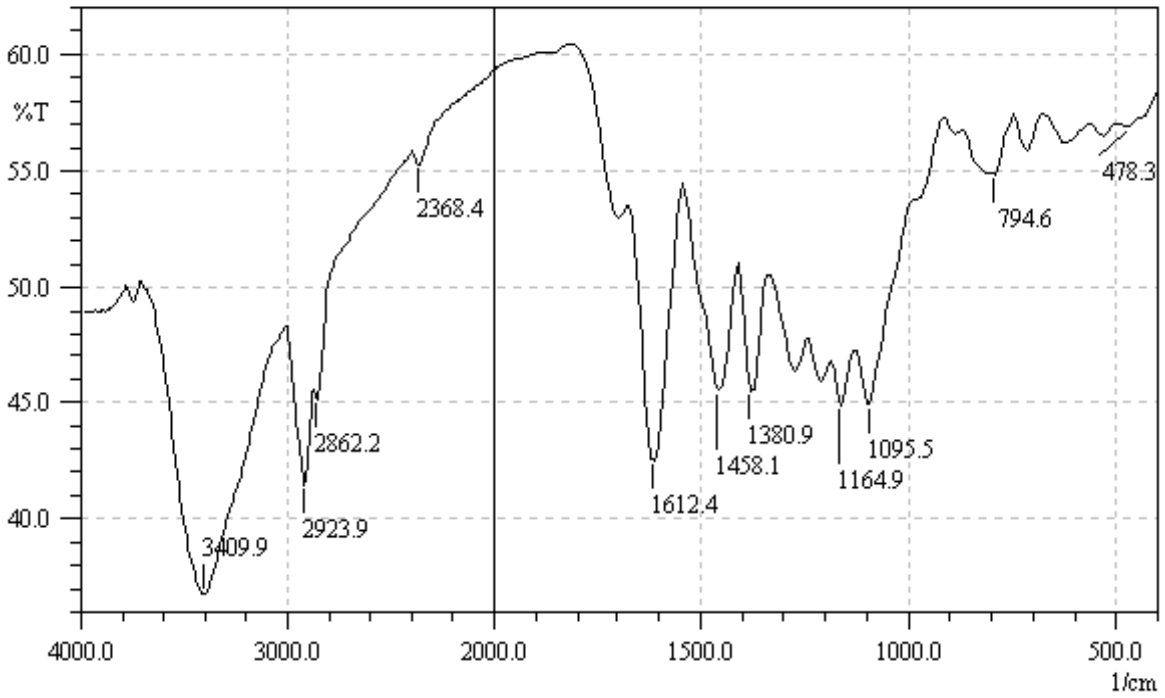


Figure IV-16 : Spectre infrarouge de concrète de *Glycyrrhiza glabra* L.

Les principaux pics des spectres Infrarouges sont cités dans le tableau IV-10.

Tableau IV-10 : Résultats d'infrarouge.

	Nombres d'ondes (cm^{-1})					
Liaisons chimiques	HE de *Pistacia lentiscus* L	HE de *Marrubium vulgare* L	HE de *Glycyrrhiza glabra* L	Concrète de *Pistacia lentiscus* L	Concrète de *Marrubium vulgare* L	Concrète de *Glycyrrhiza glabra* L
O-H	3417.6	3440.8	3386.8	3379.1	3448.5	3409.9
(C-H)CH2	2923.9	2923.9	2923.9	2970.2 à 2893	2862.2 à 2923.2	2923.9 à 2862.2
C = O	-	-	-	-	1759.5	-
C = C	1620.1	1635.5	1635.5	1651.0	1612.4	1612.8
(C-H)CH3	1535.2	-	1458.1	1458.1	1452.8	1458.1
(C-O)Ar-OH	1380.9	1380.9	1380.9	1396.4	1380.9	1380.9
C-OH	1033.8	1041.5	1041.5	1049 .5	1148.2	1095.5
Cycle aromatique	-	-	601.7	879.5	740	794.6

b. Discussion

Bien que la spectroscopie IR ne permette pas d'identifier la composition chimique de notre HE, les pics du spectre obtenu ont affirmé l'existence de différentes liaisons chimiques caractéristiques des constituants de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L.

Les résultats de l'étude par spectrophotomètre infrarouge des huiles extraites par différents procédés pour les trois plantes médicinales sont donnés dans le tableau (IV-10).

Il est intéressant de noter d'après les résultats du tableau, qu'il existe une certaine ressemblance entre les valeurs de nombres d'ondes des différents échantillons d'huiles extraites par hydrodistillation avec une légère différence pour les valeurs de la concrète extraite par Soxhlet avec l'acétone.

D'une manière plus précise et à propos des résultats obtenus dans le tableau, on peut noter les remarques suivantes :

- D'après les spectres correspondants à l'huile extraite par hydrodistillation, on note une indication sur la présence de la liaison O-H (3379.1) cm^{-1}; ce résultat peut être expliqué par l'existence des composés phénoliques qui comportent dans leurs structures chimiques une liaison O-H, en se basant sur l'étude de SABA et al (2000).

- Pour les différents échantillons obtenues: on note une indication sur la présence du liaison $(C\text{-}O)_{Ar\text{-}OH}$ (1377.1) cm^{-1} , ce résultat peut être expliqué par l'existence d'une extraction sélective des stérols présents dans les trois plantes.

IV.4 Activité antibactérienne des huiles essentielles

❖ Aromatogramme

a. Résultats

Les résultats obtenus des diamètres des zones d'inhibition obtenus des HE de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L sont regroupés dans le tableau IV-11.

Tableau IV-11 : Résultats des diamètres des zones d'inhibition des HE des trois plantes médicinales.

	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)		
Plante / **Souches bactériennes**	**HE de *Pistacia lentiscus* L**	**HE de *Marrubium vulgare* L**	**HE de *Glycyrrhiza glabra* L**
Staphylococcus aureus	17	11,5	14
Staphylococcus epidermidis	13	19	13,5
Bacillus subtilus	15	15	22
Candida albicans	14	17	16,5
Escherichia coli	16	20	27

(A) **(B)** **(C)**

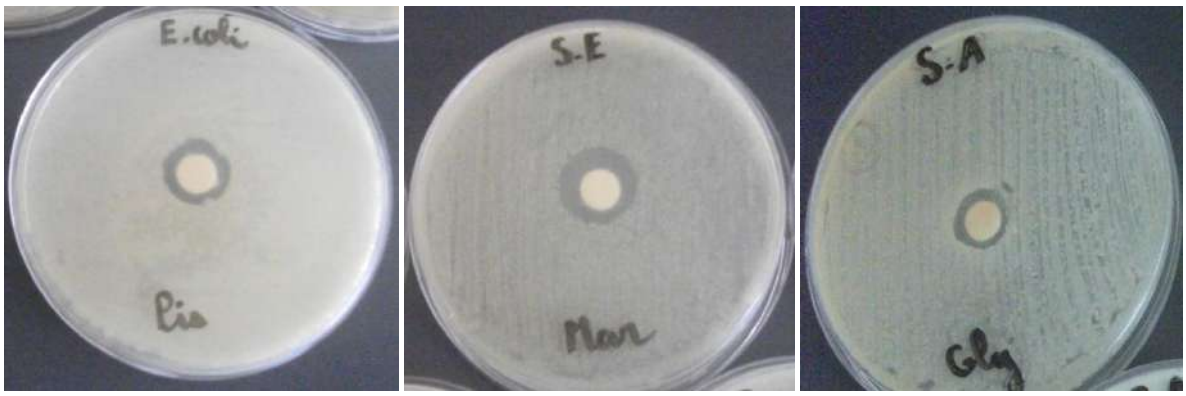


Figure IV-17 : Aromatogramme des huile essentielles de
(**A:** *Pistacia lentiscus* L, **B:** *Marrubium vulgare* L et **C:** *Glycyrrhiza glabra* L).

Les résultats obtenus des diamètres des zones d'inhibition obtenus des concrètes de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L sont regroupés dans le tableau IV-12.

Tableau IV-12 : Résultats des diamètres des zones d'inhibition des concrètes diluées des trois plantes médicinales

	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)		
Plante / **Souches bactériennes**	**Concrète diluée de *Pistacia lentiscus* L**	**Concrète diluée de *Marrubium vulgare* L**	**Concrète diluée de *Glycyrrhiza glabra* L**
Staphylococcus aureus	14,5	13	13
Staphylococcus epidermidis	16	14,5	12,5
Bacillus subtilus	12,5	14,5	17
Candida albicans	15	13,5	15
Escherichia coli	14	20	14



Figure IV-18 : Aromatogramme des concrètes diluées de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et Glycyrrhiza glabra L.

b. Discussion

D'après les résultats illustrés dans le tableau IV-11 et IV-12 et si on considère les diamètres des zones d'inhibitions on peut dire que :

- Les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L obtenues par hydrodistillation sont actives sur les souches : *staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis, bacillus subtilus, candidas albicans* et *E. coli.*

- Les concrètes diluées de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L obtenues par extraction par solvant volatiles (macération à chaud et macération à froid) sont actives sur les souches : *staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis, bacillus subtilus, candidas albicans* et *Escherichia coli.*

- On peut noter ainsi que les diamètres des zones d'inhibitions des extraits obtenus par hydrodistillation (huiles essentielles des trois plantes étudiées) sont plus importants que ceux obtenus dans le cas de l'extraction par utilisation des solvants volatils (à chaud et à froid). Cela peut etre expliquer d'une part, par la différence des concentrations en composés actifs de divers extraits (les huiles essentilles sont utilisées sous leur forme concentrées cepandant les concrètes ont été diluées préalablement). Et d'autre part, cette différence peut etre expliquer ainsi par le fait que l'activité biologique d'une huile essentielle est en relation directe avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques), la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

Conclusion générale

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'industrie des extractions depuis toujours s'est intéressée au rendement et à la qualité des extraits. Ces efforts sont focalisés dans la modification ou le développement des méthodes efficaces de production, de concentration et de purification des extraits aromatiques.

Au cours de ce travail, on s'est concentré sur l'optimisation du rendement des HE et d'extraits de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L obtenues par différentes méthode (Hydrodistillation, extraction par solvant volatil à chaud (Soxhlet) et macération à froid).

Un certain nombre de résultats ont été obtenus :

- L'étude quantitative a prouvé que :
  - *Pistacia lentiscus* L donne un rendement en HE élevé par rapport au *Marrubium vulgare* L qui donne un rendement en HE supérieur en comparaison avec *Glycyrrhiza glabra* L.
  - Les trois plantes sélectionnées après séchage donnent un rendement plus élevé par rapport à celui obtenu en utilisant les plantes fraiches.
  - Le rapport pondéral matière végétal/solution conductrice et le rendement en HE est inversement proportionnelle. Plus qu'on diminue ce rapport plus le rendement en HE augmente (un rapport de 3% était le plus rentable).
  - Le broyage des plantes sélectionnées (sous forme de poudre fine) a diminué le rendement en utilisant l'hydrodistillation, par contre il a augmenté le rendement en utilisant l'extraction par solvant volatil à chaud (Soxhlet).
  - Les trois plantes sans broyage donnent un rendement plus élevé par rapport à celui obtenu avec broyage en utilisant l'hydrodistillation et moins élevé en utilisant l'extraction par solvant volatil à chaud (Soxhlet).
  - La durée d'extraction (le nombre de siphonage) est proportionnelle avec le rendement en extrait dans l'extraction par solvants à chaud (Soxhlet). Plus qu'on augmente le nombre de siphonage plus le rendement en extrait augmente.
  - Le rendement obtenu en utilisant l'acétone comme solvant d'extraction est plus important par rapport à celui obtenu en utilisant le diéthyléther ou l'éthanol comme solvant d'extraction.

- L'extrait obtenu par hydrodistillation est sous forme liquide (HE) et celui obtenu par macération à chaud (Soxhlet) et à froid est sous forme semi solide (concrète).

- Des études sur les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles extraites de *Pistacia lentiscus* L, *Marrubium vulgare* L et *Glycyrrhiza glabra* L (indice de réfraction, d'acide, d'ester,…etc.) ont prouvées que les HE sont conformes.
- Des études de l'effet antibactérien ont montré la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis les HE et les concrètes obtenues.

A la fin, notant que cette étude constitue une partie d'une thèse de doctorat. On a essayé dans ce travail d'appliquer certaines méthodes récentes d'extraction (extraction par fluide supercritique), les échantillons ont été préparés et envoyés vers un laboratoire en Turque afin d'appliquer l'extraction par CO_2 supercritique ainsi les analyses chromatographiques CG-SM, mais les résultats ne sont pas encore prêtes pour les présenter dans ce mémoire.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Afnor., 2000, Association Française de normalisation, Normes Français : huile essentielle, ED Afnor, Paris.

Bahorun. T., Gressier. B., Trotin. F., Brunete. C., Dine. T., Vasseur. J., Gazin J.C., Pinkas. M., Luycky. M et Gazin. M., 1996, Oxigen species scavenging activity of phenolic extract from howthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. Arzneim Forsh / Drug Res.1-6.

Barazani. O., Dudai. N et Golan-Goldhirsh. A., 2003, Comparison of Mediterranean Pistacia lentiscus genotypes by random amplified polymorphic DNA, chemical, and morphological analysis ». Journal of Chemical Ecology 29, 1939-1951.

Belaiche P., 1979, L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M. S. A. Editeur, Paris. Tome 1, 204.

Belazzougui. K., 2000, Utilisation des méthodes chromatographiques (GC et HPLC) et du couplage GC/MS a l'étude d'HE de cypres extraite par hydro distillation, thèse d'ingéniorat, Centre universitaire Yahia Fares de Médéa, spécialité: chimie industrielle.

Belfadel F.Z, 2009, Huie de fruits de Pistacia lentiscus. Caractéristiques physico-chimiques et effets biologiques (Effet cicatrisant chez le rat), thèse de magister, université Mentouri, Constantine. Spécialité: chimie organique.

Benmerième. L et Bourguig. C., 1996, Extraction des essences de la sauge officinale, P.F.E, université de Blida.

Bentley R.Y et Trimen. H., 1980, Medicinal plants. London, p 68.

Billerbeck G., 2000, Activité fongique de l'huile essentielle de cymbopogon nardus sur l'Aspergillus niger. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, 236

Biogassendi., 2003, http://biogassendi.ifrance.com. Date dernière consultation le 06-03-2012.

Blackeway J et Salerno M., 1987, Pour la science. Institut des renseignements scientifiques et techniques, Paris.

Bouzouita. N., Kachouri. F., Ben Halima. M et Chaabouni M.M., 2008, Composition chimique et activitées antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. Journal de la société chimique de Tunisie, vol. 10, pp. 119-125.

Brunetton J., 1999, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème édition, Lavoisier Tec et Doc, Paris.

Brunetton. J., 1993, Phytochimie plantes médicinales pharmacologie, 2éme édition.

Castola. V., Bighelli. A et Casanova. J., 2000, Intraspecific chemical variability of the essential oil of Pistacia lentiscus L. from Corsica. Biochemical Systematics and Ecology » 28, 79-88.

Chiron. F., 1996, Synthèse d'hydroperoxydes de terpènes, relation avec l'activité anti microbienne et application a la synthèse depolyterpénes hydroperoxydes, mémoire présenté en vue d'obtention du diplôme d'ingéniorat, CNAM.

Clevely. A et Richmond. K., 1997, Plantes et herbes aromatiques : Connaitre er préparer, Larousse, Paris.

CNDP., 2000, http://www.cndp.fr/gtd_phychim/pdf/ESEPC002.pdf .

Deslauriers. H et Collin. G., 1992, Caractérisation des produits naturels extraits du bois de Thuja occidentalis L. à l'échelle pilote, Rapport interne, LASEVE-UQAC, 72 Pages.

Didry. N., Dubreuil. L et Pinkas M., 1993, Activité antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldehyde cinnamique seuls ou associés. Pharmacize, 48, 301-304.

Dob. T., Dahmane. D et Chelghoum. C., 2005, Chemical Composition of the Essential Oils of Pistacia lentiscus L. From Algeria. Journal of Essential Oil Research, 17, 642

Duru. M.E., Cakir. A., Kordali. S., Zengin. H., Harmadar. M., Izumi. S et Hirata. T., 2003, Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species. Fitoterapia 74, 170

Elberling. J et Skov P.S., 2007, Increased release of histamine in patients with respiratory symptoms related to perfume, 676-80.

Erika. L., 2001, livre des plantes aromatiques et médicinales.

Fauchère J.L et Avril J.L., 2002, Bactériologie générale et médicale: Ellipses Editions Paris, 365.

Franchomme P.D et Pénoël., 1990, Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique : matière, énergie, information. Limoges.

Gardeli. C., Papageorgiou. V., Mallouchos. A., Theodosis. K et Komaitis. M., 2008, Essential oil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methalonic extracts. Food Chemistry 107, 1120

Gattefosse R. M., 1938, Antiseptiques essentiels, Publie en Nutra news sciences, nutrition, prévention et santé.

Giner-Larza E.M., Manez. S., Giner-Pons R.M., Recio M.C., Prieto J.M et Cerda-Nicolas. M., 2000, Anti-inflammatory triterpenes from Pistacia terebinthus galls. Planta Medica, 68. 311-315.

Guenther. E., 1972, The essential oils, Vol.3, Ed. Robert Krieger publishing co, Huntingtons, New York.

Guide pratique., 1983.

Hennebelle. T., Sahpaz. S., Skaltsounis A. L et Bailleul. F., 2007, Phenolic compounds and diterpenoids from Marrubium peregrinum, Biochemical Systematics and Ecology, 35.624-626.

Hermal. C., 1993, Activité bactériostatique de sept émulsions d'huiles essentielles et de deux associations d'émulsions d'huiles essentielles. Faculeté de pharmacie, université de Montpellier.

Iauk. L., Ragusa. S., Rapisarda. A., Franco. S et Nicolosi. V.M., 1996, In vitro antimicrobial activity of Pistacia lentiscus L. extracts: preliminary report. Journal of Chemotherapy 8, 207-209.

Iserin., 2001, Encyclopédie des plantes médicinales.

Kameoka. H et Nakai K., 1987, Components of essential oil from the root of Glycyrrhiza glabra. Nippon Nogeikagaku Kaishi [J Ag Chem Soc Japan], 61: 1119 –1121.

Karioti. A., Skopeliti. M., Tsitsilonis. O., Heilmann. J etSkaltsa. H., 2007, Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from Marrubium cylleneum and Marrubium velutinum », Phytochemistry, 68

Khoudja. A., 1997, Cours de module chimie industrielle », Université de Blida.

Kivçak. B et Akay. S, 2005, Quantitative determination of _-tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia, and Pistacia terebinthus by TLC-densitometry and colorimetry, Fitoterapia 76, 62-66.

Kordali. S., Cakir. A., Zengin. H et Duru M.E., 20003, Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in turkey. Fitoterapia 74, 164.

Lacroix. M et Caillet. S., 2007, Recherche en sciences appliquées à l'alimentation, P.1-3, France.

Lahlou. M., 2004, Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Research, 18, 435-448.

Larousse., 2001, Encyclopédie des plantes médicinales, Identification, préparations, soins,p. 28- 31.

Leprieur. M., 1860, Journal de médecine, chirurgie et de pharmacie, 3éme volume, Publié par la société de science médicale et naturelle de bruscelles, p. 614-615.

Lev. E et Amar. Z., 2000, Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in Israel at the end of the 20th century. Journal of Ethnopharmacology 72, 191-205.

Lev. E et Amar., 2002, Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan ». Journal of Ethnopharmacology 82, 131-145.

Lucchesi M.E., 2005, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes, conception et Application à l'extraction des huiles essentielles, thèse de doctorat, université de la réunion, faculté des sciences et technologies.

Magiatis. P., Melliou. E., Skaltsounis A.L., Chinou I.B et Mitaku. S., 1999, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. chia. Planta Med ». 65, 749-751.

Mann C.M et Markham J.L., 1998, A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal of Applied Microbiology, 84, 538-544.

Meyndier J. M et Raison-Peyron N., 1997, Allergie aux parfums. Re. Fr. Allergol. 641- 650.

Meyre-Silva. C., Yunes R.A., Schlemper. V., Campos-Buzzi. F et Cechinel-Filho. V., 2005, Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene presentin Marrubium vulgare (Lamiaceae) », 321–326, 2005.

Miething. H., Speicher-Brinker. A et Neolicuroside. A., 1989, New chalcone glycoside from the roots of Glycyrrhiza glabra. Arch Pharm (Weinheim), 322: 141 –143. 4.

Mitscher L.A et al., 1980, Antimicrobial agents from higher plants. Antimicrobial isoflavanoids and related substances from Glycyrrhiza glabra L. var. typica . J Nat Prod 43: 259–269.

More. D et White. J., 2005, Encyclopédie des arbres plus de 1800 espèces et variétés du monde, flammarion, pp 18 ; 797.

Muñoz. F., 1987, Plantas medicinales y aromaticas. Estudio, cultivo y procesado, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, pp. 365.

Nostro. A., Germanò M.P., D'Angelo. V., Marino. A et Cannatelli M.A., 2000, Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity ». Letters en Microbioloie Appliquée 30, 379.

Otmanine. Kh., 2007, Zingiber officinale étude physicochimique, microbiologique avec l'évaluation du potentiel hypoglycémiant et antioxydant, thèse d'ingéniorat, Centre universitaire Yahia Fares de Médéa, spécialité: Génie des procédés pharmaceutiques.

Ouelmouhoub. S., 2005, Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier : cas des subéraies du Parc National d'El Kala (Algérie).

Ozenda. P., 1977, Flore du sahara, Ed. CNRS, Paris, France, 250-259.

Palevitch. D et Yaniv. Z., 2000, Medicinal plants of the Holy Land. Modan Publishing House, Tel Aviv, Istrael.

Papachristos D.P et Stamopoulos D.C., 2002, Repellent, Toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on Acanthoscelidesobtechus (Say) (ColeopteraBruchidae). Journal of Stored Products Research 38, 117-128.

Paraschos. S., Magiatis. P., Mitaku. S., Petraki. K., Kaliaropoulos. A., Maragoudakis. P., Mentis. A., Sgouras. D et Skaltsounis A.L., 2007, In vitro and in vivo activity of chios mastic gum extracts and constituents against Helicobacter pylori. Antimicrob. Agents Chemother, 51, 551-559.

Parf Cosmet, 1983, 2- IX ème congrès International des Huiles Essentielles de Singapour, Arômes, 53, 63-73.

Parthasarathy V.A et Chempakam. B., 2008, Chemistry of spices, Edition CABI North American Office, USA.

Pharmaceutical Press., 2007, Glycyrrhiza glabra liquorice. Page de Barnes-Herbal medicines.

Pharmaceutical Press., 2007, Horehound white Marrubium vulgare page de Barnes-Herbal medecines.

Pharmacopée Européenne., 2001.

Pibiri M.C., Seigniez. C et al ., 2001. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles et leurs effets sur le bien-être des occupants. CISBAT, Lausanne, LESO, EPFL.

Polleti. A., 1982, Fleurs et plantes médecinales, Editions Delachia et Niestele.

Rezazi. S et Bouziani. S., 2008, Extraction et caracterisation de l'huile essentielle de lepidum sativum, évaluation d'aromatogramme, microatmosphère, l'activité hypotensive et hypoglycémiante, thèse d'ingéniorat. Centre universitaire de Médéa.

Richard. H et Multon. JI., 1992, Les aromes alimentaires. Edition Ter et Tor Movoisir.

Rivera L.L., 2006, Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières

végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe », thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse, spécialité : Sciences des Agroressources.

Romani. A., Pinelli. P., Galardi. C., Mulinacci. N., 2002, Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. Phytochemical analysis 13, 79-86.

Rouessac. F et Rouessac. A., 1995, Analyse chimique : « Méthodes et techniques instrumentales modernes ». Ed. Masson, Paris.

Said. O, Khalil. K, Fluder. S et Azaizeh. H, 2002, Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. Journal of Ethnopharmacology 83, 251-265.

Sanz M.J, Terencio M.C et Paya. M, 1992, Isolation and hypotensive activity of a polymeric procyanidin fraction from Pistacia lentiscus L. Pharmazie 47, 466-471.

Sarbach. R., 1962, Contribution à l'étude de la désinfection chimique des atmospheres. Faculté de Pharmacie, Université de Rennes, 181.

Scherrer A.M., Motti. R et Weckeerie C.S., 2005, Traditional plant use in the areas of montevesole and ascea, cilento national park (compania, southern Italy). Journal of Ethnopharmacology 97, 129-143.

Seguin. E., Axel. G., Michel. P et Orecchioni. A., 2001, Le préparateur en pharmacie dossier 2, p : 108 ,143-206.

Simpson W.T., 1999, Drying and control of moisture content and dimensional changes, Gen. Tech. Rep. FPL-GTR-113. Madison, Forest Products laboratory. 463 p.

Skoog D.A., Holler F.J et Naiman T.A., 2003, « Principes d'analyse instrumentale », 1ére édition de Boeck université, 945.

Smith M.D et Navilliat P.L., 1997, A new protocol for antimicrobial testing of oils. Journal of microbiological methods, 28,21-24.

Tawata M et al., 1990, Anti-platelet action of GU-7, a 3-aryl coumarin derivative, purified from Glycyrrhizae radix. 56: 259–263.

Tranchant. J., 1995, Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Ed. Masson, Paris.

Verdrager. J, 1978, Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Ed. Maloine S.A. p. 12-15.

Willem J.P., 2004, Les huiles essentielles, médecine d'avenir, 318p.

Zaika. L., 1988. Spices and Herbs-Their antimicrobial activity and its dermination. Journal of food safety.

Zrira. S et Benjilali. B., 1991, Effect of drying leaf oil of Moroccan E. camaldulensis, J. Ess. Oil Res . 3, 443-444.