



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
(Constantine I)
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master II

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Métabolisme secondaire et molécules bioactives

Intitulé :

**Extraction, identification de l'huile essentielle par
CPG-SM de l'espèce *Citrus limon* et mise en
evidence de son activité antibactérienne.
Fabrication du parfum.**

Présenté par :

Boukabache Meriem

Boudjefdjouf Fatima Zohra

Soutenu Le : 19/06/2016

Jury d'évaluation :

- Président du jury : Mr Kara Youcef

Pr - UFM Constantine

- Encadreur : Mme Labbani Zelikha

Pr - UFM Constantine

- Examineur : Mme Bouchoukh Imane

M.A.A - UFM Constantine

*Année universitaire
2015-2016*

Remerciements

Avant toute chose, on tient à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

Nous commençons par exprimer notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements à Madame **Labrani Zelikha**, Professeur au Département de Biologie et Ecologie Végétale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine (Constantine 1) qui nous a honorées en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. Nous étions satisfaites de votre bonne enseignante, merci de nous avoir guidées avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; nous ne pouvons, Madame, que sincèrement vous exprimer notre respect et notre gratitude.

Nous remercions Monsieur **KARA Youcef**, Professeur au Département de Biologie et Ecologie Végétale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine (Constantine 1) d'avoir accepté de nous faire l'honneur de présider notre travail.

Nous remercions également Mme **BOUCHOUKH Imane** Maître Assistante classe A au Département de Biologie et Ecologie Végétale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine (Constantine 1) d'avoir accepté d'examiner ce travail et de participer aux membres de jury.

Nous tenons à remercier Mme **Barkat Malika** Professeur à l'Institut de l'INATAA de nous avoir accueilli au sein de son laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments, ainsi que toutes les personnes de son laboratoire.

À la fin nos remerciements vont à toute personne qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail :

A celle qui s'est toujours dévouée et sacrifiée pour moi ; celle qui m'a aidée du mieux qu'elle pouvait pour réussir ; celle qui m'a accompagnée tout au long de ce parcours périlleux ; celle qui a toujours été là dans mes moments de détresse ma très chère mère.

A celui qui m'a toujours encouragée et soutenue moralement, mon très cher père.

A mon mari le plus cher de mon cœur IMED EDDINE.

A mes chers frères et ma très chère sœur YASMINE.

A toute ma famille

A tous mes amis surtout SOUMIA, MANEL, HOUDA, NASSIMA, DJABER, WISSEM, NORA pour leur fidélité et encouragements.

A toute les personnes qui me connaissent des prés ou de loin seulement pour leur existence.

Boukabache Meriem

Je dédie ce modeste travail :

En premier à l'homme de ma vie, Aouri Ahmed.

*A la première de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie
ma mère qui m'a apporté son affection, son appui et son amour durant
toute mon existence pour ses sacrifices et soutiens qui m'ont donné
confiance et courage.*

*A mon deuxième très chère mère Kchichou Fatima à qui je lui souhaite la
guérison Incha Allah.*

A mes deux chers pères Mouhamed Laarbi et Abed El Moumen.

*A mes très chères sœurs (Meriem, Sofia, Manel et Fatima) et mes chers
frères (Lakhdar, Ismail et Mouhamed) pour leurs soutiens et leurs
encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.*

A mes chers neveux et nièces (Kenza, Lakhdar, Illine et Rahma).

A mes deux belle sœurs Sarah et Bisma.

A toute ma famille

A me meilleures amies que j'aime beaucoup.

A mes collègues de travail.

A toute personne qui me connaît.

Boudjedjout Fatima Zobra

Résumé

Les molécules bioactives extraites des plantes aromatiques par la méthode de distillation par entraînement à la vapeur d'eau pourront être une alternative plausible pour les personnes présentant une résistance à l'usage des antibiotiques, et aussi pour les personnes âgées ne supportant plus l'administration normale de ces médicaments.

Notre travail montre que l'HE du citron non mûr (citron vert) a donné 46 molécules dont 3 sont majoritaires : Limonene (47,83%), δ Terpinene (14,17%) et β Pinene (13,83%). Cependant pour le citron mûr (citron jaune) nous avons identifiés seulement 20 molécules soit une différence de 43,47 %. Ce dernier a révélé aussi 3 molécules majoritaires : Limonene (68,63%), β Pinene (11,01%) et δ Terpinene (9,73%). Ces résultats confirment ceux obtenus et décrits en littérature.

Cette huile a fait l'objet de l'évaluation de son activité biologique vis-à-vis de cinq souches bactériennes (une souche à Gram⁺ et quatre souches à Gram⁻). Ce test biologique a montré l'efficacité de l'HE (citron non mûr, citron mûr) pour l'ensemble des souches étudiées notamment pour *Listeria Monocytogenes* avec une zone d'inhibition de 32 et 12 mm de diamètre respectivement pour le citron non mûr et citron mûr. En effet *Pseudomonas aeruginosa* a montré un test négatif.

Parallèlement ce travail a été suivi par une fabrication du parfum à base de l'HE du citron mûr. Ce dernier nous l'avons attribué le nom de Citrus16.

Mots clés : Huile essentielle ; *citrus limon* ; activité antibactérienne ; CPG-SM.

Lexique :

Anti-inflammatoire : Qui calme les inflammations

Antifongique : Molécule agit contre les infections provoquées par les champignons ou les levures parasites

Antimicrobien : Détruit les micro-organismes

Antioxydant : Molécules ou ensemble de molécules capables de neutraliser des radicaux libres ayant ainsi un rôle de défense au sein de la membrane ou de la cellule

Antiparasitaire : Elimine les parasites

Antiseptique : qui détruit la prolifération des bactéries, champignons et virus

Antivirale : Ce dit d'une substance active contre les virus

Aromathérapie : C'est l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques

Aromatique : Se dit d'une plante odorante

Aseptique : Empêche la contamination bactérienne, virale ou provenant d'autres micro-organismes

Cataplasme : Préparation médicinale, en général chaude, appliquée sur les parties douloureuses du corps.

Clevanger : Un montage en verre, avec un ballon ou on mit le matériel végétal à l'ébullition et un tube ascendant qui termine avec un réfrigérant verticalement pour condenser les gouttes qui décent dans l'essencier qui se termine par un réservoir énuméré

Composée : Se dit d'une feuille dont le limbe est divisé en folioles

Composés phénoliques : Molécules aromatiques constituées d'un groupement phényle et d'un hydroxyle OH

Espèce : ensemble d'individu interfécond pouvant donner une descendance fertile

Evaporation : Opération qui consiste à séparer le solvant du filtrat aux principes actifs

Extraction : Technique chimique classique pour obtenir des composés organiques à partir du matériel végétal séché ou frais

Filtration : Etape permet de séparer un mélange liquide de la matière végétale macérée.

Flavonoïdes : Pigments rencontrés chez les végétaux qui donnent des couleurs aux fruits et légumes.

Huile essentielle : Extrait liquide obtenu par distillation à l'entraînement à la vapeur d'eau des organes des plantes aromatiques

Huile végétale : Huile constituée d'un ensemble des acides gras. Huile obtenue par pression a chaud ou à froid

Métabolite : Produit de la transformation d'une substance de l'organisme

Molécules bioactives : Molécules qui possèdent des propriétés biologiques ou des substances biologiquement actives dans un but curatif ou préventif

Persistante : Qui persiste, qui dure. Se dit des feuilles qui ne tombent pas en hiver.

Stimulant : Encourage l'activité nerveuse.

Terpène : Hydrocarbure d'origine végétale, de formule brute $(C_5H_8)_n$.

Table des matières

Introduction.....	14
Partie 1 : Synthèse bibliographique	16
Chapitre 1 : Généralités sur le citron.....	17
I. Présentation botanique :.....	18
I.1. La famille des Rutacées :.....	18
I.2. Le genre citrus :.....	18
I.3. L'espèce <i>Citrus limon</i> (citron) :.....	18
I.4. Position systématique :.....	18
I.4.a. Description botanique de la plante :.....	19
I.4.b. Composition chimique :.....	20
I.4.c. Utilisation :.....	20
Chapitre 2 : Les huiles essentielles	21
I. L'aromathérapie :.....	22
II. Histoire de l'aromathérapie :.....	22
III. Les huiles essentielles :.....	23
III.1. Définition :.....	23
III.2. Histoire et origine :.....	23
III.2.a. Le bassin méditerranéen, berceau des huiles essentielles :.....	23
III.2.b. Avicenne produit la première huile essentielle pure :.....	24
III.3. Caractéristiques et propriétés physiques :.....	24
III.4. Composition chimique :.....	25
III.5. Les vertus des huiles essentielles :.....	25
III.6. Extraction des huiles essentielles :.....	25
III.6.a. Extraction par hydrodistillation :.....	26
III.6.b. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :.....	26
III.7. Méthode de caractérisation des H. Es :.....	27
III.7.a. La Chromatographie en Phase Gazeuse :.....	27
III.7.b. La spectrométrie de masse :.....	28
III.7.c. Couplage chromatographie phase gazeuse couplée avec spectrométrie de masse (CPG-SM) :.....	28

III.8. Activité antimicrobienne :	29
III.8.a. Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré :	29
III.8.b. Le Chémotype :	30
III.8.c. Une activité antibactérienne liée à la composition chimique :	30
III.8.d. Les actifs antibactériens :	31
III.8.e. Les actifs antifongiques :	31
III.8.f. Les effets antiviraux :	31
III.8.g. Des travaux in vitro démontrent leur efficacité antibactérienne :	31
III.8.h. L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :	32
III.8.i. Action sur des bactéries responsables d'infections respiratoires :	33
III.9. L'huile essentielle de citrus limon :	34
III.9.a. Composition chimique :	34
Chapitre 3 : Le Parfum	36
I. Étymologie :	37
II. Historique :	37
III. Rôle des huiles essentielles dans le parfum :	37
IV. Les types de parfum :	38
Partie 2 : Matériel et méthode	40
I. Choix du matériel végétal :	41
II. La méthode adoptée :	41
II.1. Protocole d'extraction des huiles essentielles :	41
II.2. La conservation de l'huile essentielle :	43
III. Les analyses de l'huile essentielle :	43
III.1. Le rendement d'extraction :	43
III.2. Chromatographie en phase gazeuse :	43
III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne :	44
III.3.a. Origine et choix des souches bactériennes :	44
III.3.b. Choix des milieux de culture :	45
III.3.c. Préparation des suspensions bactériennes :	45
III.3.d. Préparation des disques :	45
III.3.e. Protocole expérimentale :	46

III.3.f. Dépôt des disques :	46
III.3.g. Incubation et lecture :	46
III.4. La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) :	47
III.4.a. Mode opératoire :	47
A. Préparation de la phase stationnaire :	47
B. Préparation de la phase mobile :	47
C. Le dépôt :	47
D. Développement des plaques :	47
E. Révélation	48
IV. Fabrication d'un parfum :	48
Partie 3 : Résultats et discussions	50
I. Description de l'huile essentielle obtenue :	51
II. Analyses physiques :	52
II.1. Le rendement :	52
III. Analyse de la composition chimique :	53
IV. L'activité antibactérienne :	59
V. Analyse de la composition chimique par CCM :	62
Conclusion :	63
Références Bibliographiques	64
Annexes.....	67

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique de l'HE du <i>citrus limon</i> d'après Djamel Djenane	34
Tableau 2: Caractéristiques des HE extraites.....	51
Tableau 3: Rendements en HE (moyenne \pm écart type) de <i>Citrus limon</i>	52
Tableau 4: Composés chimiques (%) de l'HE de Citron mûr analysée par CG-SM.....	54
Tableau 5: Composées majoritaires de l'HE de citron mûr	55
Tableau 6: Composés chimiques (%) de l'HE de Citron non mûr analysée par CG-SM.....	56
Tableau 7: Composées majoritaires de l'HE de citron non mûr	57
Tableau 8: Activité antibactérienne de l'huile essentielle de Citrus limon exprimé en mm	59

Liste des figures :

L'ensemble des figures portées dans ce travail sont des figures prises par les mêmes auteurs :
Boukabache Meriem et Boudjefdjouf Fatima Zohra.

Figure 1 : Les différents organes de l'espèce <i>citrus limon</i>	19
Figure 2: Avicenne.....	24
Figure 3: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (LUCCHESI, 2005).....	26
Figure 4: Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur (LUCCHESI, 2005).....	27
Figure 5: Les notes d'un parfum.....	38
Figure 6 : Montage de l'hydrodistillateur de citrus limon (feuilles).....	42
Figure 7 : Ampoule à décanter contient les deux phases (l'hydrolat et l'huile essentielle).....	42
Figure 8 : Les deux phases du mélange (extrait des feuilles de citrus limon)	42
Figure 9: L'appareille de cpg-sm(crbt le 31/05/2016).....	44
Figure 10: Repiquage des bactéries sur le GN.....	45
Figure 11: Tube de GN incliné	45
Figure 12: Encemencement de milieu.....	46
Figure 13 : Dépôt des disques sur la surface de gélose MH	Erreur ! Signet non défini.
Figure 14 : Dépôts des échantillons	47
Figure 15 : Plaque à UV.....	48
Figure 16 : Le parfum <i>citrus16</i>	49
Figure 17 : Fabrication du parfum	49
Figure 18 : Huiles essentielles extraites.....	51
Figure 19 : Pourcentage des HE obtenue pour le citron mûr, le Citron non mûr, et Feuilles citron mûr	52
Figure 20 : Profil chromatographique de l'H.E de Citron mûr analysée par CG/SM	53
Figure 21 : Profil chromatographique de L'H.E de Citron non mûr analysée par CG/SM.	55
Figure 22 : Activité antibactérienne des HE en fonction des souches bactériennes étudiées.....	59
Figure 23 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle du citron non mûr et citron mûr sur les souches bactériennes testées	60
Figure 24 : Plaque CCM de citron non-mûr	62
Figure 25 : Plaque CCM de citron mûr.....	62

Liste des abréviations :

AFNOR : Association Française de Normalisation

BIOQUAL : Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments

CCM : Chromatographie sur Couches Minces

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

Cpg-sm : chromatographie phase gazeuse couplé à la spectrométrie de mass

Crbt : Centre nationale de recherche en biotechnologie

GN : gélose nutritive

MH : Mueller Hinton

Mm : Millimètre.

Introduction

TECNOLOGIA

Introduction :

Depuis la nuit des temps, l'homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes.

Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles.

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

La popularité dont jouissent depuis longtemps les huiles essentielles et les plantes aromatiques en général reste liée à leurs propriétés médicinales en l'occurrence les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides et insectifuges, tonifiantes, stimulantes, calmantes, etc.

Ce travail est constitué de trois parties :

La première partie consiste à une synthèse bibliographique relative aux huiles essentielles ainsi la description botanique de l'espèce étudiée ; cependant la deuxième partie s'articule sur le matériel végétal et méthodes utilisées, et nous terminons par la troisième partie consacrée aux résultats, à leur interprétation et discussion.

Partie 1 : Synthèse bibliographique

ΚΣΛΙΘ Γ : 2ΛΠΠ626 ΘΙΠΠΘΔΙΣΒΙΔΙΘ6

Chapitre 1 : Généralités sur le citron

Chapitre 1 : Généralités sur le citron

I. Présentation botanique :

I.1. La famille des Rutacées :

Les Rutacées sont des plantes dicotylédones, ligneuses et rarement herbacées des régions tempérées à tropicales. Les Rutacées sont des plantes productrices des huiles essentielles.

La famille des Rutacées comprend 140 genres et de 1300 à 1600 espèces. Les Feuilles des Rutacées sont simples ou composées, sans stipules, éparses ou opposées. Les feuilles présentent des glandes oléifères qui apparaissent par transparence comme des points translucides contenant des huiles essentielles (molécules odorantes à caractère hydrophobe). Les fleurs sont généralement régulières et hermaphrodites, formées par 4 ou 5 sépales imbriqués, libres ou non, et par 4 ou 5 pétales généralement libres. Les carpelles sont soudés en un gynécée à ovaire pluriloculaire supère, parfois infère. Les fruits sont des baies, des drupes, des capsules ou des follicules.

I.2. Le genre citrus :

Le Citrus est un genre de plantes des pays chauds de la famille des Rutacées, regroupant des arbres et arbustes, dont plusieurs espèces sont cultivées pour leurs fruits. Parmi les espèces du genre Citrus, nous trouvons le citronnier, le lime, l'oranger amer, le mandarinier, le clémentinier, le pamplemoussier, etc...

I.3. L'espèce *Citrus limon* (citron) :

L'espèce *Citrus limon*, son nom commun est le citron. Cette dernière appartient au genre Citrus et à la famille des Rutacées. Le genre Citrus est d'origine asiatique précisément Asie du Sud-Est et la région indienne.

Le citron c'est d'abord appelé « limon », terme emprunté à l'italien limone, qui venait lui-même de l'arabo-persan limùn. Le mot est apparu dans la langue française en 1351. De là vient le mot «limonade». Le terme «citron», né en 1398, est dérivé du latin citrus, il a graduellement remplacé « limon » dans la langue populaire.

I.4. Position systématique :

Règne : Végétale

Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Geniales (Rutales)

Famille : Rutacées

Genre : Citrus

Espèce : *Citrus limon*

I.4.a. Description botanique de la plante :

Citrus limon est un arbuste de taille moyenne qui atteint, en pleine terre entre 3 et 6 m de hauteur. En culture, il est souvent taillé, d'une part pour limiter son encombrement, d'autre part pour optimiser son branchage. Ses feuilles sont persistantes, de couleur vertes profondes et luisantes, plus pâles sur leur revers. Elles ont une forme en fuseau, de 6 à 11 cm de long. Elles sont alternes, dentelées et leur pétiole est parfois ailé. Les feuilles sont odorantes.

Les fleurs sont plutôt de petites tailles, à 5 pétales blancs, légèrement avec un aspect cireux. Elles dégagent un parfum très agréable.

Les fruits sont de couleur verte et deviennent jaunes à maturité. Les deux couleurs sont souvent exposées au marché. Il ne s'agit ni de deux variétés différentes ni des deux espèces, mais il s'agit bien et belle de la même espèce et de la même variété, cueillie à différents stade de maturité.

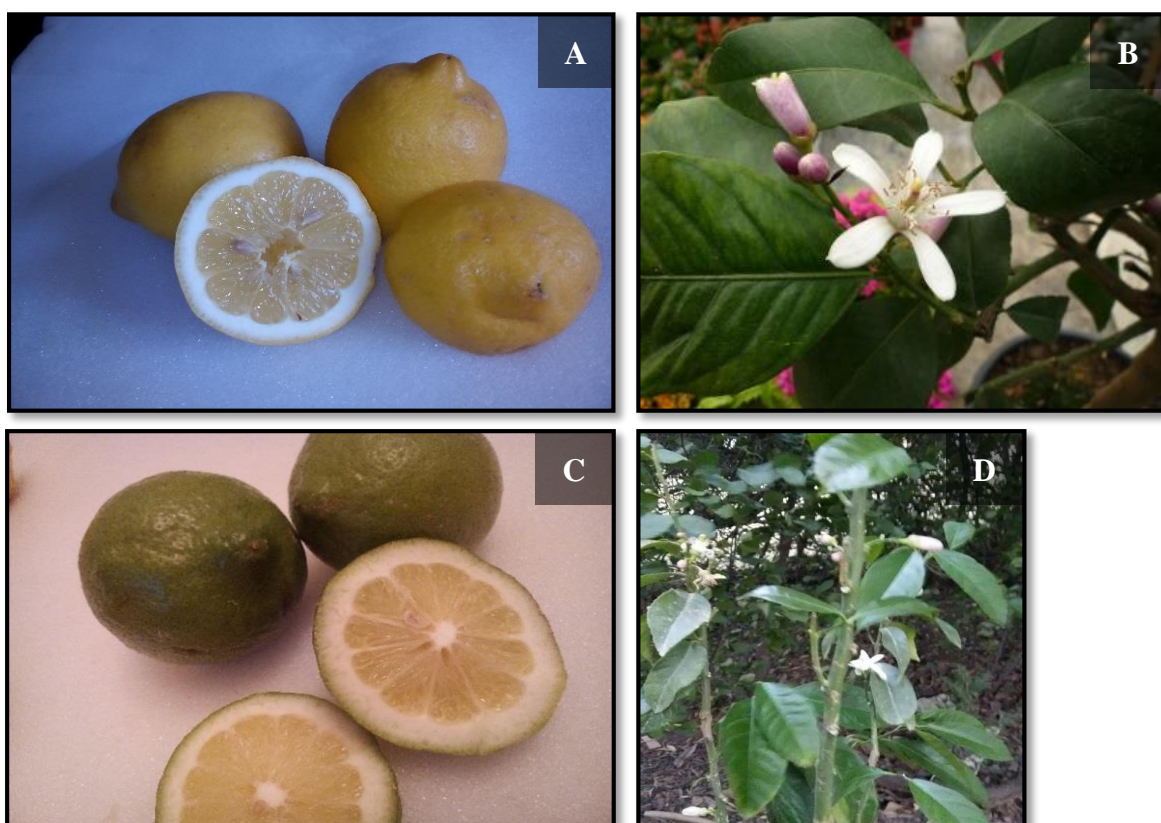


Figure 1 : Les différents organes de l'espèce citrus limon
A : fruit jaune (fruit mûr) B : fleurs C : fruit vert (fruit non mûr) D : feuilles

I.4.b. Composition chimique :

Le citron est essentiellement riche en vitamine C, mais contient aussi du potassium, du calcium, et du phosphore en assez bonne quantité. Le citron est également source de petites quantités de fer, de cuivre, de magnésium, de vitamine A, ainsi que plusieurs vitamines du groupe B en petite quantité. Sa teneur en acides organiques est particulièrement élevée, il s'agit essentiellement d'acide citrique, accompagné de faibles quantités d'acides malique, et férulique. Ces acides organiques confèrent au citron une saveur acidulée très marquée (c'est le fruit dont le pH est le plus faible, il est inférieur à 3).

Les fibres du citron représentent environ 2,1 % du poids net total. Elles sont constituées par des celluloses et des hémicelluloses formant la trame des cellules membranaires (elles représentent les deux-tiers des fibres totales), ainsi que des pectines, surtout abondantes sous l'écorce externe. Dans le jus, les fibres sont pratiquement absentes.

I.4.c. Utilisation :

Le citron est nommé le roi des fruits. Il présente de nombreux bienfaits pour la santé. C'est une plante médicinale puissante dont les très nombreuses vertus sont utilisées depuis plus de 3000 ans. Il stimule les défenses naturelles, favorise la digestion, combatte la grippe, les angines, les maux de tête, ainsi qu'un grand nombre de maladies. Par ailleurs des études ont démontré des effets anti cancer et hypocholestérolémiant du citron.

Grâce à sa teneur en flavonoïdes comme l'ériocitrine et l'hespérétine. Le citron est connu pour être un puissant antioxydant. Il permet ainsi de lutter contre l'apparition des maladies cardiovasculaires et de certains cancers comme celui de l'œsophage, de l'estomac, du côlon ou du pharynx. Les flavonoïdes et les limonoïdes du citron ainsi que sa teneur en fibres solubles comme la pectine, permettent également de réguler le taux de cholestérol dans le sang. Peu calorique, avec environ 25 kcals pour 100g, il constitue une très bonne alternative à l'orange à la clémentine.

Chapitre 2 : Les huiles essentielles

Chapitre 2 : Les huiles essentielles

I. L'aromathérapie :

L'aromathérapie est l'utilisation thérapeutique des extraits aromatiques de plantes (essences et huiles essentielles) dans un but préventif, curatif ou de mieux-être. C'est l'art de soigner par les huiles essentielles (HE) pour l'harmonisation de la santé physique et mentale. L'aromathérapie utilise les HE pour renforcer le processus naturel d'autoguérison.

II. Histoire de l'aromathérapie :

Aussi loin que l'on remonte dans son histoire, l'homme a toujours cherché dans les plantes son alimentation et ses remèdes. Toutes les civilisations les ont étudiées et utilisées. L'histoire de l'aromathérapie trouve, elle aussi, ses racines dans celle des civilisations.

Déjà, 40000 ans av. J.C., les aborigènes australiens utilisaient les plantes aromatiques pour traiter les infections par fumigations ou cataplasmes.

En Chine, et en Inde, les vertus thérapeutiques des essences aromatiques sont connues depuis fort longtemps et l'on a découvert un alambic en terre cuite au Pakistan qui semble remonter à 5 000 ans avant notre ère.

En 1918, René-Maurice Gattefossé, chimiste et parfumeur, se brûle la main lors d'une explosion dans son laboratoire. Par réflexe, il plonge sa main dans un récipient rempli d'huile essentielle de lavande vraie. Le soulagement est immédiat, la guérison de la plaie et sa cicatrisation d'une rapidité déconcertante. Ce résultat surprenant l'incite à se consacrer à l'étude des propriétés antibactériennes des huiles essentielles. Il crée en 1928 le mot « aromathérapie » et publie en 1931 un ouvrage du même nom dans lequel il décrit la relation entre la structure biochimique de l'huile essentielle et son activité. En 1929, Sévelinge, un pharmacien français, étudie les huiles essentielles en médecine vétérinaire et confirme le potentiel antibactérien élevé de ces molécules aromatiques.

Ensuite, en 1964, le docteur Valnet, chirurgien militaire, dans l'urgence, en raison d'un manque soudain de médicaments classiques, vérifie leur efficacité sur le terrain. Il publie alors des ouvrages de vulgarisation qui font connaître au grand public l'efficacité des huiles essentielles. Il en relance ainsi l'usage médical. Duraffourd, Lapraz, d'Hervincourt et Belaiche, tous les quatre médecins, prennent ensuite le relais, affinent la thérapeutique aromatique, créent des enseignements et rédigent des documents qui posent cette médecine naturelle de pointe.

En 1975, Pierre Franchomme, aromatalogue, met en évidence l'importance du chémotype (ou race chimique de l'espèce) ou, en d'autres termes, la définition des molécules biologiquement actives sur un certain nombre de pathologies étudiées cliniquement. Sa précision permet de réduire les échecs thérapeutiques et de diminuer les effets secondaires ou les risques de toxicité. Le chémotype associé à la dénomination scientifique latine permet la parfaite compréhension du mode d'action des huiles essentielles et d'obtenir un traitement naturel, puissant et efficace.

III. Les huiles essentielles :

III.1. Définition :

Ce sont des molécules volatiles odorantes et hydrophobes obtenues à partir d'une matière végétale botaniquement définie (soit à partir de racines, d'écorce, de feuilles, de fleurs ou de tubercules), soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage.

Les huiles essentielles sont des assemblages de molécules complexes. Une goutte d'huile essentielle contient en moyenne 150 molécules différentes. C'est un mélange de molécules variées, comprenant en particulier des terpènes (hydrocarbures non aromatiques), c'est-à-dire dérivés de l'isoprène et non du benzène, et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, ester).

III.2. Histoire et origine :

III.2.a. Le bassin méditerranéen, berceau des huiles essentielles :

C'est autour du bassin méditerranéen que la science médicale va vraiment s'établir avec les grandes civilisations égyptienne, babylonienne, puis grecque et romaine. Ce sont cependant les textes égyptiens qui apportent les descriptions les plus détaillées. Les plantes étaient utilisées dans tous les domaines de la vie, pour fabriquer des parfums, des cosmétiques mais, aussi, pour l'embaumement des défunts. Cette dernière utilisation révèle la parfaite maîtrise par les Égyptiens des vertus antibactériennes et antiputrides de certaines huiles essentielles. Imhotep, architecte et médecin (2700 av. J.C.) du pharaon, connaissait très bien l'emploi des plantes aromatiques et, parmi elles, le cèdre du Liban, le labdanum, Lenard, l'encens, le cumin, la myrrhe, l'anis, la cannelle...

Dans le tombeau de Toutankhamon, on a retrouvé des jarres contenant des résines, dont de l'encens, toujours odorantes après un séjour sous terre de 3 200 ans.

En Grèce, dès avant 1200 av. J.C., le commerce phénicien ramène en Orient le poivre, la cannelle, l'encens... Au Ve siècle av. J.C., Hippocrate, père de la médecine scientifique, rassemble toutes les connaissances médicales de l'époque. Théophraste (378-285 av. J.C.) effectue une classification des plantes, dans son ouvrage *Historia plantarum*, qui ne sera pas améliorée avant la Renaissance.

Quelques siècles plus tard, Dioscoride, élargissant le travail d'Hippocrate, ne recense pas moins de 529 espèces de plantes. À cette époque, les bains aromatiques, les lotions, les onguents et les crèmes parfumées étaient d'usage courant à Rome. Le texte fut ensuite traduit en arabe et en persan, et servira de base aux herbiers arabes. À l'apogée de l'empire arabe dont les frontières allaient de l'Inde à l'Espagne, tous les documents concernant les sciences et la médecine furent rassemblés à Bagdad dans la plus grande bibliothèque de l'époque. L'ouvrage sera traduit au XV^{ème} siècle sous le titre *De materia medica*.

III.2.b. Avicenne produit la première huile essentielle pure :

Les pays arabes vont faire considérablement progresser l'aromathérapie. 1 000 ans av. J.C., les Perses semblent avoir inventé la distillation, mais il faudra attendre 2 000 ans pour que ce procédé soit sensiblement perfectionné. C'est Avicenne, médecin et philosophe (980-1037), qui produit la première huile essentielle pure, c'est une huile essentielle de roses. Pour cela, il met au point un alambic. La distillation par la vapeur d'eau autorisait l'extraction d'huiles essentielles pures de très nombreuses plantes. Avicenne écrit de nombreux ouvrages médicaux dans lesquels il fait une large place aux huiles essentielles.

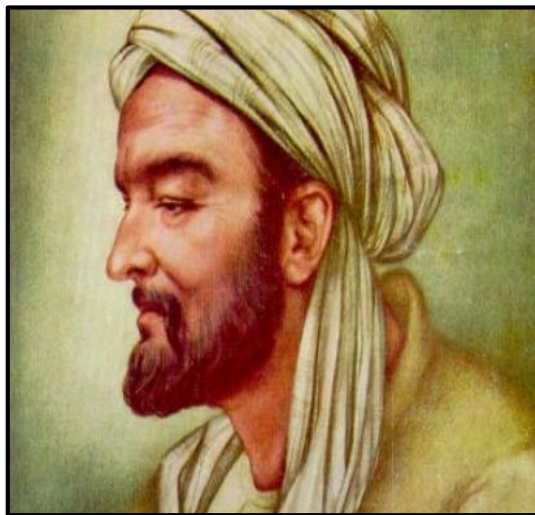


Figure 2: Photo d'Avicenne (d'après la bibliographie Internet)

En Amérique, les civilisations aztèque, maya et inca connaissent parfaitement l'emploi des drogues végétales aromatiques, baumes de styrax, de copaïba, de sassafras, qu'ils utilisent pour guérir infections et plaies.

Les romains ont ensuite permis la diffusion de ce savoir en Occident jusqu'au Moyen Âge. Les croisades ont alors facilité les échanges commerciaux d'aromates et la connaissance technique de la distillation.

Au XV^e siècle, les apothicaires s'appellent les aromatherii, soulignant d'emblée l'importance des plantes aromatiques dans les préparations galéniques de l'époque.

En Occident, on continua pendant un certain temps à utiliser des huiles aromatiques infusées. Mais avec les croisades, les huiles essentielles, ou «parfums d'Arabie» comme on les appelait alors, gagnèrent progressivement toute l'Europe. Les gommes et résines d'Asie n'étant pas toujours disponibles, on se tourna vers des plantes méditerranéennes, comme le romarin ou la lavande, pour fabriquer des huiles essentielles.

L'aromathérapie tombe ensuite dans l'oubli et il faut attendre le XX^{ème} siècle pour qu'elle réapparaisse comme médecine à part entière. En France, quelques grands noms, tous pharmaciens, médecins et chimistes, guident et construisent la nouvelle aromathérapie.

III.3. Caractéristiques et propriétés physiques :

Les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques. Elles sont constituées de molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (Degryse *et al.*, 2008).

Les HE sont en général liquides à température ambiante, volatiles, très inflammables et très odorantes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé. Les huiles essentielles sont hydrophobes. Par contre, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels (Bruneton, 1999). Entraînables à la vapeur d'eau. Elles se retrouvent dans le protoplasme sous forme d'émulsion plus ou moins stable qui tend à se collecter en gouttelettes de grosse taille (Rhayour, 2002; Benini, 2007; Benayad, 2008).

III.4. Composition chimique :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qu'appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

- Le groupe de terpénoïdes.
- Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. (Bruneton, 1999).
- Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils (qui contribuent souvent aux arômes des fruits).
- Les monoterpènes et leurs dérivés (alcools, esters, acétates, ...) sont les composés les plus abondants dans les huiles essentielles, et sont responsables des saveurs caractéristiques et de l'arôme que possède la plante. Leur étude chimique est compliquée, par la difficulté d'obtenir ces produits purs du mélange complexe dans lequel ils sont présents et les réarrangements qu'ils peuvent subir.

III.5. Les vertus des huiles essentielles :

Toutes ces molécules, très variées, qui composent les huiles essentielles sont très actives et expliquent que ces huiles essentielles soient réputées pour leurs vertus pour la santé.

- Vertus bactéricides
- Vertus antiseptiques si efficaces qu'on sert parfois pour aseptiser des locaux, dans les cliniques et hôpitaux par exemple.
- Vertus anti-inflammatoires
- Vertus analgésiques
- Vertus décongestionnantes
- Vertus antispasmodiques
- Vertus calmantes.

III.6. Extraction des huiles essentielles :

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des huiles essentielles. En générale le choix de la méthode d'extraction dépendra de la partie de la plante utilisée et la fragilité de l'huile.

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles mais, selon la définition de l'AFNOR et l'ISO, les méthodes les plus utilisées sont : L'hydrodistillation et entraînement à la vapeur d'eau.

III.6.a. Extraction par hydrodistillation :

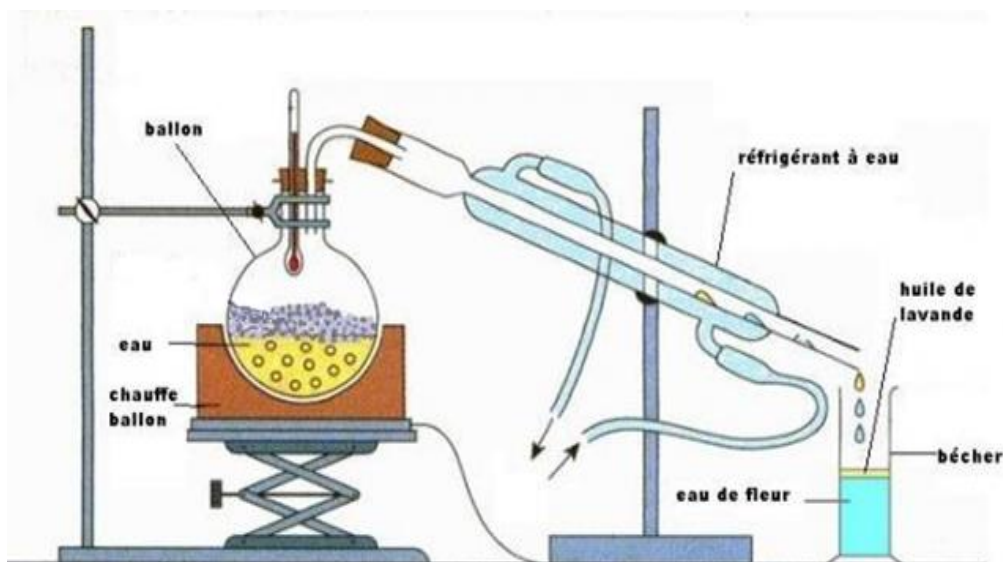


Figure 3: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (LUCCHESI, 2005)

Dans cette méthode le matériel végétal à extraire est en contact direct avec l'eau en ébullition, la vapeur d'eau produite entraîne avec elle les essences de la plante (Belleau, 1990 ; Pingot, 1998 ; Bruneton, 1999 ; Baser et Buchbauer, 2010).

III.6.b. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (Lesley, 1996 ; Marriott *et al.*, 2001 ; Lahlou, 2004 ; Lucchesi, 2005) et l'expression à froid, ce procédé est réservé surtout aux agrumes (Lesley, 1996 ; AFNOR, 1996).

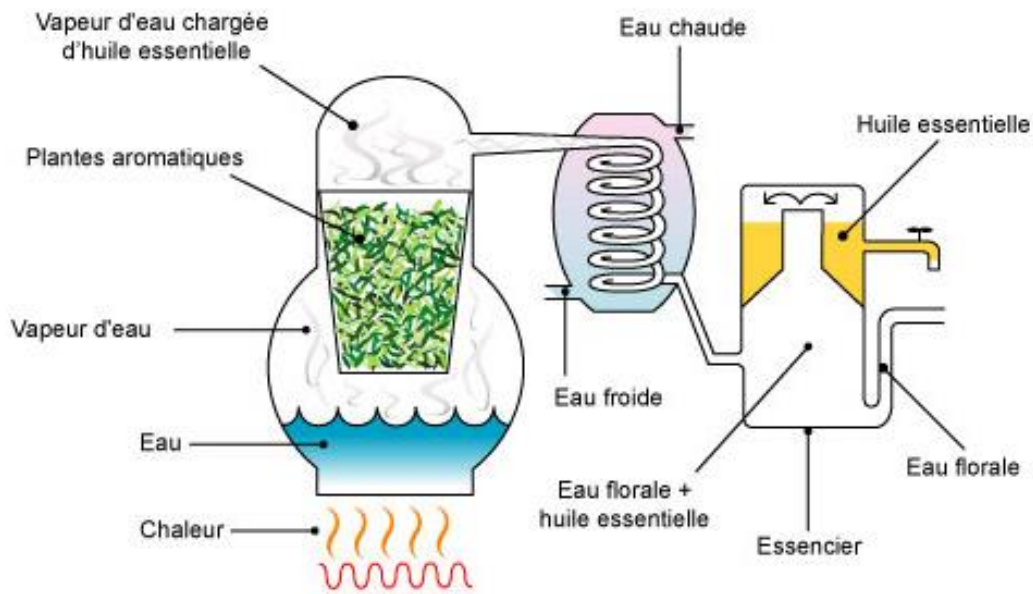


Figure 4: Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur d'eau (LUCCHESI, 2005)

III.7. Méthode de caractérisation des H. Es :

III.7.a. La Chromatographie en Phase Gazeuse :

La Chromatographie en Phase Gazeuse ou CPG (GC en Anglais) est une méthode développée pour l'analyse des mélanges très complexes dont les conditions sont différentes par leurs natures et leurs propriétés physiques.

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse comporte trois parties : injecteur, colonne et détecteur à travers lesquelles un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer. Le gaz vecteur le plus utilisé est l'hélium, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur.

Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne, qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide de gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

III.7.b. La spectrométrie de masse :

La spectrométrie de masse est une méthode destructive, qui permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que d'obtenir des données structurales : la substance ionisée se trouve dans un état excité qui provoque sa fragmentation. L'analyse de ces fragments informe sur la structure de la molécule. Chacun des ions formés est caractérisé par son rapport masse/charge (m/z) et l'appareil est capable de séparer ces ions (par un champ magnétique) et de les détecter/caractériser (qualitativement et quantitativement).

III.7.c. Couplage chromatographie phase gazeuse couplée avec spectrométrie de masse (CPG/SM) :

Le couplage chromatographie en phase gazeuse –spectrométrie de masse est aujourd'hui une technique parmi les plus utilisées de la chimie analytique. L'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant.

- **Principe CPG/SM :**

Au sortir de la colonne, les molécules entrent en collision avec un flux d'électrons. Ces électrons leur arrachent un autre électron, générant ainsi les ions moléculaires M^+ . Correspondant aux molécules. Ces ions moléculaires peuvent évoluer pour donner des ions fils. Ces cations sont focalisés et accélérés grâce aux plaques de focalisation, ils entrent dans le quadripôle avec la même vitesse. Là, ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

A la sortie du quadripôle, les cations séparés sont accélérés par les plaques de post-accélération et déviés pour entrer en collision avec le channeltron. Ce dernier est une dynode continue où ils sont convertis en électrons. Ces électrons sont multipliés tout au long du channeltron. Le cation qui arrive ainsi avec une énergie de quelques centaines de eV va générer quelques dizaines d'électrons de beaucoup plus faible énergie, qui, par la différence de potentiel entre l'entrée et la fin de la dynode, génèrent en plusieurs fois un courant de 10^7 à 10^8 e⁻.

Le tracé du chromatogramme est effectué par l'ordinateur en sommant les intensités des fragments à tout moment.

Le spectromètre de masse réalise un balayage de masse de 10 u jusqu'à 1000 u en 2 à 3s. Le signal obtenu est en 3 dimensions :

- Intensité (I)
- Temps de rétention (tr)
- Masse (m) sur charge (z)

III.8. Activité antimicrobienne :

III.8.a. Les huiles essentielles un pouvoir antimicrobien avéré :

Avec la généralisation, à la fin des années 1940, de l'utilisation des antibiotiques, les médecins ont commencé à vaincre les maladies infectieuses qui ravageaient l'humanité depuis si longtemps.

Mais, ensuite, à la fin des années 1980 et dans les années 1990, les antibiotiques ont commencé à ne plus être salués comme le miracle qu'ils avaient semblé être 40 ans plus tôt. Pourtant, dès 1945, le bactériologiste britannique Alexander Fleming a lancé un avertissement dans un article publié dans le *New York Times*. Il craignait qu'un mauvais usage de la pénicilline ne conduise à sélectionner et à propager des formes mutantes de bactéries résistantes au médicament.

Il avait raison, ses paroles étaient prémonitoires : de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques. En fait, un mauvais usage des antibiotiques sélectionne les bactéries résistantes, tandis que les souches résistantes sélectionnées chez un individu – qui ne tombe pas forcément malade lui-même – peuvent se transmettre à d'autres. La personne touchée peut alors développer une forme de maladie contre laquelle les antibiotiques deviennent inefficaces.

Par ailleurs, la généralisation d'une utilisation excessive des antibiotiques à large spectre semble également avoir favorisé un nouveau problème. Elle est souvent la cause d'une infection secondaire par des levures, en particulier par *Candida albicans*. Une autre conséquence inattendue de l'utilisation des antibiotiques est l'apparition de salmonelloses. Les personnes sous antibiotique au moment où elles consomment de la viande ou du lait contaminé se trouvent prises de fortes diarrhées dues à une salmonelle résistante aux antibiotiques. Sous la pression sélective du médicament, la salmonelle s'est suffisamment développée pour déclencher une gastroentérite et, dans certains cas, une infection sanguine susceptible d'entraîner la mort. La plupart des gens ayant ingéré les mêmes aliments contaminés mais qui n'étaient pas sous antibiotique ne sont pas affectés.

Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antibiotiques. Les études montrent que les huiles essentielles pourraient bien constituer une candidature particulièrement crédible.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est connue de façon empirique depuis l'Antiquité. Des études expérimentales ont été entreprises en France dès 1885. 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, René-Maurice Gattefossé, 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, expliquer les modes d'actions de certains de leurs composants.

III.8.b. Le Chémotype :

Le chémotype, également appelé chimiotype, permet de définir la ou les molécules biologiquement actives majoritairement présentes dans l'huile essentielle. Associé à la dénomination latine, la précision du chémotype permet la compréhension précise du mode d'action des huiles essentielles.

Une huile essentielle contient souvent 50 à 100 molécules biochimiques différentes. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permet d'identifier et de quantifier chacune de ces molécules et ainsi d'obtenir la composition précise des huiles essentielles.

III.8.c. Une activité antibactérienne liée à la composition chimique :

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides.

Plusieurs études ont ainsi montré l'apparition de fuites d'ions potassium dans des cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec de l'huile essentielle d'arbre à thé (*tea tree*).

Cette fuite de potassium est la toute première preuve de l'existence de lésions irréversibles au niveau de la membrane de la bactérie. Le thymol, le carvacrol, des composants actifs d'huiles essentielles, rendent perméable la membrane des bactéries, un effet précurseur de leur mort. Les huiles essentielles ont donc bien des propriétés bactéricides.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques.

III.8.d. Les actifs antibactériens :

Les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols thymol, carvacrol et eugénol. Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation. Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent. La molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches et, parmi elles, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium. Par contre, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les alcools avec 10 atomes de carbone (ou monoterpénols) viennent immédiatement après les phénols, en terme d'activité, avec le géranol, linalol, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol pour les plus connus. Molécules à large spectre, elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes. Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisés sont le néral et le géranial (des citrals), le citronnellal et le cuminal.

III.8.e. Les actifs antifongiques :

Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique.

III.8.f. Les effets antiviraux :

De nombreuses familles de molécules ont montré *in vitro* une activité antivirale et, parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénals.

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques et de nombreuses pathologies virales sévères montrent des améliorations importantes avec leur utilisation.

III.8.g. Des travaux in vitro démontrent leur efficacité antibactérienne :

Une étude a examiné les activités antibactériennes d'huile essentielle de poivre noir, de clou de girofle, de géranium, de noix de muscade, d'origan et de thym contre 25 bactéries de genres différents. L'objectif était également de tenter de déterminer les composants présents dans les huiles essentielles susceptibles d'être responsable de leur activité antibactérienne. Les résultats ont confirmé ceux de travaux antérieurs et mis en valeur l'activité antibactérienne de ces huiles essentielles. Les composants avec des structures phénoliques comme le carvacrol, l'eugénol et le thymol étaient fortement actifs

contre les microorganismes testés. Les membres de cette famille sont connus pour être, selon la concentration utilisée, bactéricides ou bactériostatiques.

Les alcools sont connus pour avoir une action plus bactéricide que bactériostatique. Dans cette étude, les alcools terpénoïdes ont montré une activité contre les microorganismes testés et agissaient comme des agents dénaturant les protéines ou des agents déshydratants. Cet essai démontre clairement les propriétés antibactériennes des Huiles essentielles, même si leurs mécanismes d'action sont encore loin d'être totalement compris. Elles sont efficaces contre un large spectre de microorganismes pathogènes et non pathogènes.

Le lemon-grass est utilisé depuis de nombreuses années en Afrique de l'Ouest pour soigner. On extrait l'huile essentielle de ses feuilles. Les propriétés antibactériennes de l'huile essentielle ont été étudiées. Elles sont principalement dues à deux de ses trois principaux composants, l'alpha-citral (le géranial) et le bêta-citral (le néral), qui produisent individuellement une action antibactérienne sur les organismes Gram⁺ et Gram⁻. Seul le troisième composant, le Myrcene, ne montre pas d'activité antibactérienne. Par contre, mélangé à l'un des deux autres, il stimule son activité.

L'activité antibactérienne et antifongique de constituants aromatiques d'huiles essentielles a été évaluée. L'activité antibactérienne du cinéole, du citral, du géranol, du linalool et du menthol a été évaluée sur 18 bactéries Gram⁺ et Gram⁻ ainsi que sur 12 champignons.

En terme d'activité antibactérienne, c'est le linalool qui s'est montré le plus efficace et a inhibé 17 bactéries. Il était suivi par le cinéole et le géranol (chacun d'eux inhibant 16 bactéries), puis par le menthol et le citral qui ont inhibé respectivement 15 et 14 bactéries. Contre les champignons, le citral et le géranol étaient les plus efficaces (inhibant les 12 champignons), suivis par le linalool (inhibait 10 champignons) puis par le cinéole et le menthol qui en inhibaient.

III.8.h. L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :

La technique utilisée est celle de l'aromatogramme, identique à celle de l'antibiogramme utilisé pour tester les antibiotiques. C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles chémotypées. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide ou gazeux, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible. Les prélèvements effectués dans les cavités ou muqueuses (crachat, selles, urine, mucus, pus, frottis vaginal...) sont préparés puis mis en contact avec différents milieux nutritifs (géloses enrichies) sur boîtes de Pétri. Placés dans une étuve à 37,5°C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif.

Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries (6 à 8 par boîte) de petits disques de papier buvard imprégné de différentes huiles essentielles à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une

zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des huiles utilisées.

Une classification des huiles essentielles chémotypées en rapport avec leur spectre d'activité antimicrobienne peut être établie en fonction de l'importance du halo d'inhibition.

Une soixantaine d'huiles essentielles chémotypées sont ainsi testées sur un grand nombre de germes de classes différentes. La limite de ces tests est bien sûr celle de l'*in vitro*. L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques.

III.8.i. Action sur des bactéries responsables d'infections respiratoires :

Une étude a examiné les effets antibactériens d'un certain nombre d'huiles essentielles sur les principaux microbes pathogènes du système respiratoire. L'activité de 14 huiles essentielles et de leurs principaux composants a été évaluée. Parmi les souches des quatre principales bactéries responsables d'infections respiratoires, l'*Haemophilus influenzae* était la plus sensible aux huiles essentielles, suivie par *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*. Le *Staphylococcus aureus* y était moins sensible. Les huiles essentielles contenant des aldéhydes ou des phénols montraient l'activité antibactérienne la plus forte, suivies par celle contenant des alcools terpéniques.

D'après ces résultats, les huiles essentielles de thym, d'écorce de cannelle, de lemon-grass, de périlla et de menthe poivrée ont été sélectionnées pour faire d'autres évaluations sur leurs effets sur les infections du système respiratoire.

- Activités contre *Escherichia coli* :

Les propriétés antibactériennes de cinq huiles essentielles ont été évaluées et quantifiées sur une souche non toxigénique d'*Escherichia coli*. Cinq huiles essentielles connues pour leurs propriétés antibactériennes ont été examinées et les plus actives ont été sélectionnées pour d'autres essais.

L'origan et le thym avaient les propriétés bactériostatiques et bactéricides les plus fortes, suivis par le laurier et le clou de girofle. *In vitro*, l'origan et le thym possèdent des propriétés colicides et colistatiques significatives qui se manifestent dans le cadre d'une large gamme de température et qui sont améliorées par l'addition d'agar-agar comme stabilisateur. Les huiles essentielles de clou de girofle et de laurier sont moins actives.

-Mécanisme d'action :

Une étude a examiné le mécanisme d'action des huiles essentielles de clou de girofle et d'origan simultanément avec ceux de deux de leurs composants, le thymol et l'eugénol, sur des bactéries. *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* ont été utilisés respectivement comme modèles de bactérie Gram⁺ et Gram⁻. Les deux huiles essentielles tout comme leurs deux composants ont été capables d'induire

une lyse cellulaire. La lyse des bactéries a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm.

Pour *E. coli*, les résultats étaient similaires à ceux obtenus avec de la polymyxine B. Cette libération de substances associée à la rapide mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. L'utilisation d'un microscope électronique a permis de montrer que les huiles essentielles attaquaient en même temps les membranes et les parois cellulaires.

Une autre étude confirme ce mécanisme d'action. L'action fongicide des huiles essentielles de clou de girofle et d'origan a été testée sur un modèle de levure *Saccharomyces cerevisiae*. La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm. Des analyses au microscope électronique ont montré que la surface des cellules traitées par les huiles essentielles d'origan et de clou de girofle était significativement endommagée.

III.9. L'huile essentielle de citrus limon :

L'huile essentielle de citron (*Citrus limon*) dont l'odeur très agréable est vivifiante, est un antibactérien puissant qui permet entre autres, de désinfecter et cicatrifier la peau, et de tonifier l'organisme.

L'huile essentielle de citron est un dépuratif qui agit sur le sang, les reins, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas en stimulant leur action. Elle active les globules blancs ce qui renforce le système immunitaire contre les attaques pathogènes internes et/ou externes de l'organisme, en l'occurrence celles liées à l'alimentation qui peuvent entraîner des troubles digestifs. L'huile essentielle de citron facilite l'évacuation de la bile vers l'intestin, les graisses se digèrent ainsi plus facilement. Elle permet également de réduire voire d'éliminer les gaz intestinaux.

III.9.a. Composition chimique :

Composition des HE du Citrus limon (d'après [Djenane, 2015](#)) .

Tableau 1: La composition chimique de l'HE du citrus limon
(d'après Djenane 2015, 4, 208-228 ; doi : 10.3390/foods4020208)

N°	Composants	%
1	Limonène	51.40
2	β -Pinene	17.04
3	γ -Terpinene	13.46
4	α -Pinene	03.07

5	Geraniol	02.43
6	β -Myrcene	02.37
7	Nerol	01.50
8	Isocaryophyllene	01.23
9	Neryl acétate	01.05

Chapitre 3 : Le Parfum

Chapitre 3 : Le Parfum

I. Étymologie :

Le mot parfum viendrait de l'expression per fume, qui signifie « par la fumée », probablement suite aux usages traditionnels et anciens de fumigations sacrées, médicinales ou rituelles (par exemple d'encens ou de différentes substances végétales).

Un parfum est une odeur ou plus souvent une composition odorante plus ou moins persistante naturellement émise par une plante, un animal, un champignon, ou un environnement. Dans la nature, les parfums sont souvent des messages chimiques et biochimiques, et notamment des phéromones ou phytohormones.

Il peut aussi s'agir de l'émanation d'une substance naturelle (un extrait de fleur par exemple) ou créée ou recrée à partir de différents arômes, solvants et fixatifs destinés à un usage cosmétique ou à parfumer des objets, des animaux ou l'air intérieur. Il est alors généralement fabriqué à partir d'essences végétales et/ou de molécules synthétiques. L'usage de parfums par l'Homme est très ancien, remontant à la plus haute Antiquité.

La notion de parfum désigne aujourd'hui le plus souvent une composition olfactive particulière, fortement concentrée, proposée conditionnée et à forte concentration olfactive par différentes marques de parfums : on dit aussi « extrait ». La personne qui crée un parfum est appelée parfumeur, ou plus familièrement nez et cette activité est la parfumerie. Par abus de langage, « parfum » est aussi utilisé aujourd'hui pour désigner une eau de toilette, une eau de parfum ou une eau de Cologne. L'industrie des parfums est un élément important du secteur économique de la mode et du luxe¹, souvent associée à l'image de la France dans le monde, pour les parfums de luxe.

II. Historique :

Grasse (prononcé [gʁas]) est une commune française provençale, située dans le département des Alpes-Maritimes en région Provence-Alpes-Côte d'Azur. Sous-préfecture des Alpes-Maritimes, Grasse est la quatrième ville du département en termes de population. Ses habitants sont appelés les Grassois.

Depuis le XVIII^e siècle la ville est considérée comme la capitale mondiale du parfum. Elle a obtenu trois fleurs au Concours des villes et villages fleuris et a été promue « Ville d'Art et d'Histoire ». Elle est également « Ville Internet ».

III. Rôle des huiles essentielles dans le parfum :

Toutes les huiles essentielles entrent dans la composition de base des parfums.

On appelle « base » le mélange des huiles essentielles avec un fixateur ou non. Cette base est ensuite associée à de l'alcool dans des proportions différentes qui définiront l'appellation : « Parfum », « Eau de toilette » ou « Parfum de toilette ».

Les huiles essentielles utilisées dans les parfums sont classées en fonction de la volatilité, ou le taux qu'ils diffusent dans l'air :

- Les notes de fond : sont les moins volatils et dureront pendant une période de temps plus long. (Molécules lourdes ou molécules de bois).
- Les notes de cœur ont tendance à être florale ou épicée. Ceux-ci peuvent durer de 30 minutes à environ une heure.
- Les notes de tête : sont les plus volatiles et sont d'abord les odeurs perceptibles d'un parfum. Les notes de tête sont généralement de courte durée de quelques minutes à peut-être 30 minutes.



Figure 5: Les notes d'un parfum

IV. Les types de parfum :

Les types de parfum dépendent de la concentration de composés aromatiques dans un solvant, qui est dans la parfumerie fine l'éthanol ou un mélange d'eau et d'éthanol.

Les prix des parfums varient en fonction de la réputation du produit, mais aussi selon le taux de concentration du parfum proprement dit dans l'excipient (alcool type éthanol, etc.) :

- L'extrait de parfum : il est composé selon les fabricants de 20 à 40 % d'huiles essentielles et d'un alcool presque pur (à 96 %). Il contient généralement 20 % de notes de tête, 30 % de notes de cœur et 50 % de notes de fonds. Son odeur reste très fidèle et tient en principe 4 à 6 heures sans retouche.
- L'eau de parfum : elle est très proche de l'extrait de parfum, c'est un mélange de 7 à 14 % d'huiles essentielles dissoutes dans de l'alcool à 90 %. Elle contient 40 % de notes de tête, 30 % de notes de

cœur et 30 % de notes de fond. Elle est assez intense au départ et tient moins longtemps que l'extrait de parfum.

- L'eau de toilette : Elle est nettement moins concentrée en essence avec 3 à 10 % d'huiles essentielles dissoutes dans de l'alcool à 80 %. Sa perception est précise pour celle qui la porte, mais moins pour les autres, parce que 50 % de ses notes de tête s'échappent tout de suite, les 30 % de notes de cœur durent 15 minutes et ses 20 % de notes de fond ne tiennent pas toute la journée.
- L'eau fraîche : elle est composée de 3 à 5 % d'huiles essentielles dans de l'alcool à 70 %. Elle contient 60 % de notes de tête, 30 % de notes de cœur et 10 % de notes de fond.
- L'eau de Cologne : c'est une solution fraîche très diluée avec 2 à 3 % d'huiles essentielles et de l'alcool à 60 %. Elle contient 80 % de notes de tête qui s'échappent très rapidement, 10 % de notes de cœur et 10 % de notes de fond.

Partie 2 : Matériel et méthode

LSLIG 7 : AISIIGLI 6E IIGUODG

L'extraction de l'huile essentielle de *Citrus limon* a été réalisée au Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), INATAA, Université des Frères Mentouri Constantine ; cependant, l'étude de L'activité antibactérienne a été réalisée au laboratoire de Microbiologie, Tronc commun, Université des Frères Mentouri Constantine.

L'huile essentielle de *Citrus limon* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) au Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBT), Ali Mendjeli Constantine.

I. Choix du matériel végétal :

Les fruits et les feuilles d'espèce *Citrus limon* proviennent d'une exploitation agricole privée, située dans la région de Hamma Bouziane dans la wilaya de Constantine. La récolte a été réalisée durant la période allant du mois de février jusqu'au mois d'avril 2016. avant l'extraction des HE que ce soit pour le citron mûr et le citron non mûr Les fruits sont nettoyés, lavés séchés. Le zeste (épicarpe d'agrume) est récupéré à l'aide d'un couteau.

II. La méthode adoptée :

II.1. Protocole d'extraction des huiles essentielles :

L'huile essentielle est extraite par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau, dans un appareil de type clevanger (1928). Un poids de 900g de zeste d'agrumes frais est introduit dans un ballon de 2 litres en verre imprégnés d'eau distillée (900 ml). Le mélange est porté à l'ébullition à l'aide d'une chauffe ballon pendant 2-3 heures.

Nous avons utilisé 900g de zeste pour le citron mûr (citron de couleur jaune) et le même poids est employé aussi pour le citron non mûr (citron de couleur vert) ; cependant pour les feuilles de citron mûr 300 g ont été utilisés. Après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur ; l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur, qu'est fixé par un support approprié en position inclinée pour faciliter l'écoulement du distillat (figure 6). Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter (figure 7), dans laquelle le mélange précédent se sépare en deux phases non miscibles (figure8). Une phase aqueuse, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant l'huile essentielle.



Figure 6 : Montage de l'hydrodistillateur de *Citrus limon* (feuilles)

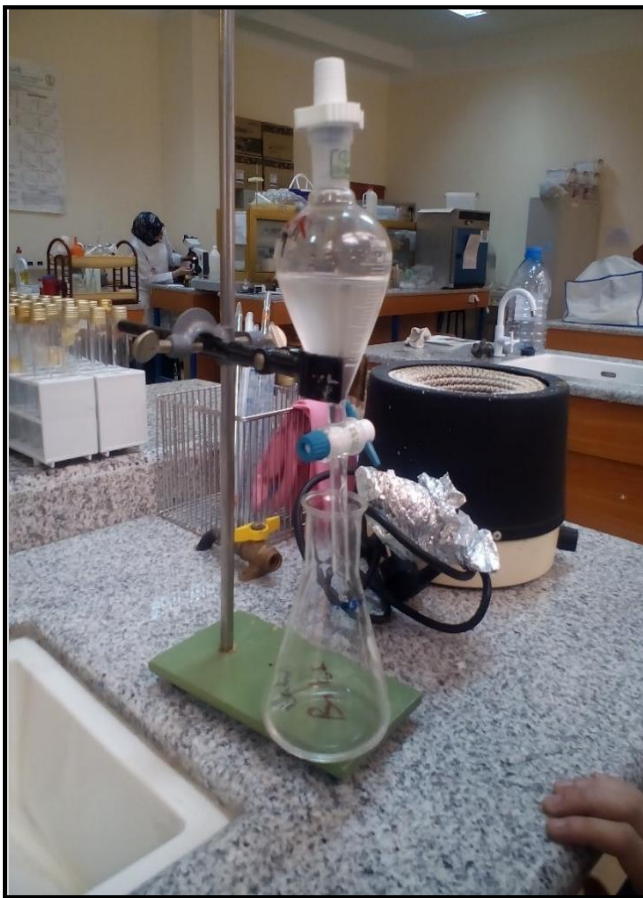


Figure 7 : Ampoule à décanter contient les deux phases (l'hydrolat et l'huile essentielle)

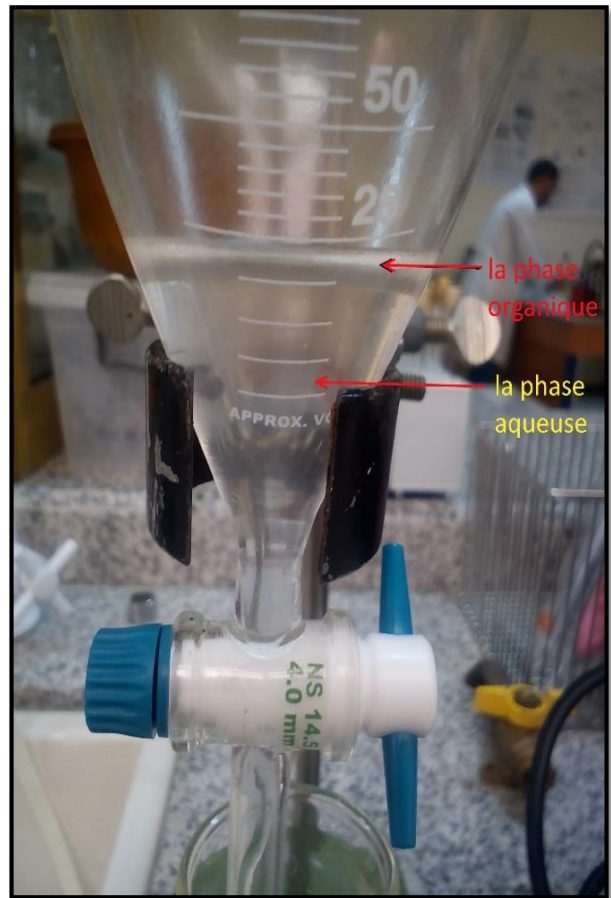


Figure 8 : Les deux phases du mélange (extrait des feuilles de *Citrus limon*)

II.2. La conservation de l'huile essentielle :

Les HE extraites sont placées dans des flacons en verre opaques bien scellé et conservées à des températures (4°C), à l'abri de la lumière. Il faut également éviter le contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée des flacons).

III. Les analyses de l'huile essentielle :

III.1. Le rendement d'extraction :

Le rendement de l'HE est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé (Akrouf, 2001). Le rendement est exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante :

$$R = (Ph / PV) \times 100$$

R : rendement de l'huile en pourcentage, Ph : poids de l'huile en grammes, PV : poids du matériel végétal en grammes.

III.2. Chromatographie en phase gazeuse :

Nos échantillons d'HE ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse Couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), Cette technique est très utilisée dans L'analyse qualitative et quantitative des HE, l'analyse de la composition chimique des HE été faite au niveau du Centre National de Recherche en Biotechnologie, Ali Mendjeli Constantine.

La chromatographie phase gazeuse (CPG) est un appareil du type GC 7890 B (HP Agilent Technologies) avec deux banques de donnée NIST et wiley, équipé d'une colonne capillaire HP 5-MS, de longueur : 8 m et Couplé à un spectromètre de masse (SM) de type : MS-5977 A (HP Agilent Technologies) avec un détecteur Scan à impact d'électron. Les conditions Analytiques sont les suivantes :

Le gaz vecteur qui constitue la phase mobile est l'Hélium réglé à un débit de 1ml/mn. Programmation de la température : La température de l'injecteur est de 250°C, et d'injection se fait en mode « Split ». Initialement la température du four est maintenue à 35°C en isotherme pendant 5mn, puis augmentation de la température se fait graduellement à raison de 5°C/mn jusqu'à 250°C. Pour le spectromètre de masse la température de détection est de 250°C. La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV, et une pression de 6,75 Psi ; volume injecté est de : 0,2 µl. L'appareil est relié à un Système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse.

L'identification des constituants des huiles essentielles extraites est basée sur :

- La comparaison des spectres de masses des molécules inconnues à ceux des composés purs cités par la littérature.
- En tenant compte de l'ordre d'éluion du composé sur la colonne considérée.
- En tenant compte de la proposition et du pourcentage de probabilité de présence du composé fournis par la base de données du micro-ordinateur couplé au spectromètre de masse.



Figure 9: Appareil de CPG-SM (CRBT Constantine, le 31/05/2016)

III.3. Evaluation de l'activité antibactérienne :

III.3.a. Origine et choix des souches bactériennes :

L'activité antibactérienne a été évaluée sur différents microorganismes. Cinq (05) souches bactériennes ont été utilisées dont quatre bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus mirabilis*) et une bactérie à Gram positif (*Listeria monocytogenes*). Ces souches bactériennes nous ont été fournies par le service de bactériologie du centre hospitalo-universitaire Ben Badis de Constantine.

Ces 05 souches bactériennes sont à l'origine de plusieurs infections (urinaire, intestinale, respiratoire, etc..).

III.3.b. Choix des milieux de culture :

Le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne est la gélose de Muller Hinton parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens (Gachkar et al., 2006 ; Mayachiew et Devahastin, 2008 ; Hussain et al., 2010).

III.3.c. Préparation des suspensions bactériennes :

Pour obtenir une culture jeune, les cinq souches ramenées de CHU sont entretenues par repiquage sur des tubes à essai remplis de gélose nutritive incliné propre à leur croissance pendant 24 h, à l'obscurité et à 37 °C. Figures 10-11



Figure 10: Repiquage des bactéries sur le GN

A partir de ces tubes et à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5ml de bouillon nitraté on agite en vortex pendant quelques seconds. La suspension bactérienne est bien homogénéisée.



Figure 11: Tube de GN incliné

III.3.d. Préparation des disques :

Les disques ont été préparés à partir du papier Wattman N°40 avec un diamètre de 6mm par l'emporte-pièce. Puis, ces disques ont été stérilisés à 120°C pendant 20 min dans un autoclave.

III.3.e. Protocole expérimentale :

Nous avons coulé aseptiquement le milieu de culture gélosé Müller Hinton dans les boîtes de pétrie de 90 mm de diamètre (20ml) par boîte.

Après solidification du milieu de culture, nous avons étalé 1ml de chaque suspension bactérienne à la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'une pipette pasteur stérile. (Figures12)

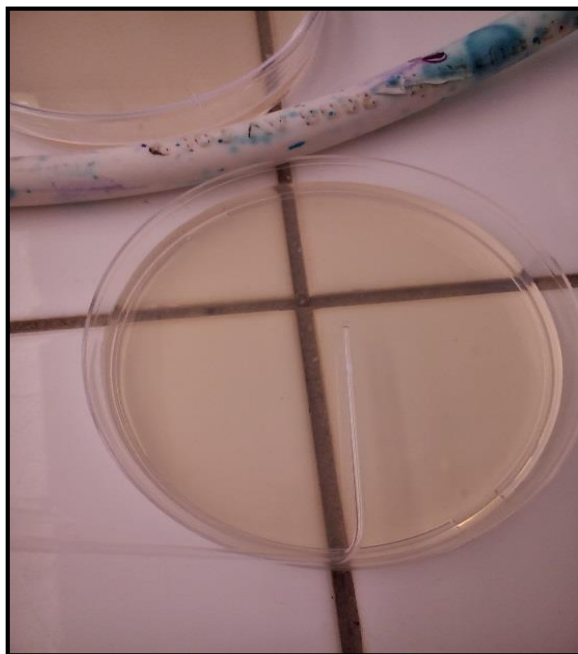


Figure 12: Encemencement de milieu

III.3.f. Dépôt des disques :

Une fois les géloses MH sontensemencées, les disques imbibés de chaque Huile essentielle (citron mur et citron non mur) sont disposés sur la surface de la gélose (2disques/boîte) À l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. (Figures13)

III.3.g. Incubation et lecture :

Les boîtes ont été incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h.

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

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

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse.

III.4. La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) :

III.4.a. Mode opératoire :

A. Préparation de la phase stationnaire :

La phase stationnaire, est une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice, fixée sur une plaque d'aluminium.

B. Préparation de la phase mobile :

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques : éluant : Cyclohexane/acétone : 90/10 d'après (itarride.free.fr/2002-200)

C. Le Dépôt :

Dans un premier temps, nous avons tracé un trait horizontal (la ligne de base) à environ 2 cm du bas de la plaque de CCM.

Pour déposer les solutions nous avons utilisé des pipettes pasteur en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire qui va nous permettre de déposer juste une petite quantité de chacune des solutions dans le puits correspondant. Nous avons effectué plusieurs dépôts successifs du même échantillon en même endroit, cette pratique permet de concentrer la tâche déposée.

D. Développement des plaques :

-La plaque est déposée en position verticale dans une cuve de chromatographie contenant l'éluant.

-La plaque de CCM est retirée lorsque les taches atteignent la ligne frontale.

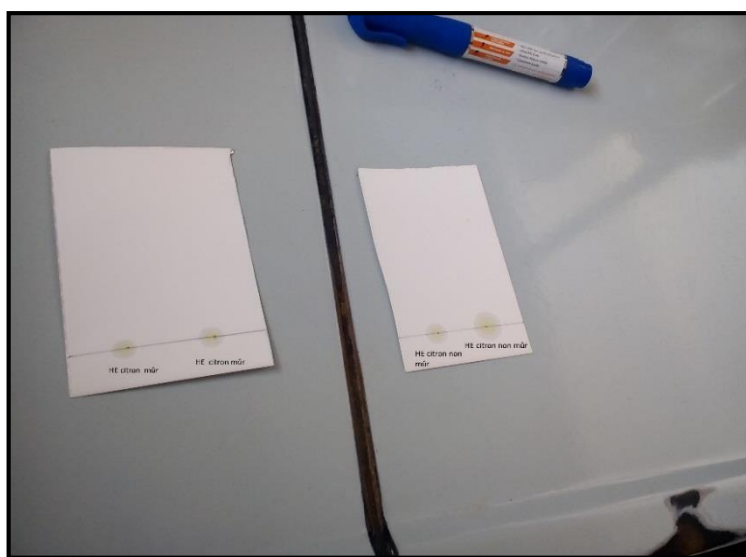


Figure 13 : Dépôts des échantillons

E. Révélation

Si les constituants sont colorés, ils seront directement visibles sur la plaque, sinon la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques.

Révélation aux UV : elle permet de mettre en évidence sous forme des tâches des substances qui absorbent les UV 254nm.



Figure 14 : Plaque à UV

IV. Fabrication d'un parfum :

Dans un flacon en verre de 22 ml nous avons réalisé trois types de parfum ; dont la différence réside dans le dosage entre note de cœur et celle de tête.

Au total nous avons mis 24 gouttes (0.6 ml) d'HE dans 15 ml d'éthanol 70 ° pour chaque flacon de parfum réalisé.

Le protocole général est le suivant :

- Dans un flacon en verre de 22 ml.
- Verser 15 ml d'éthanol 70 °
- Additionner 12(0,3 ml) ou bien 8(0,2 ml) ou bien 14 (0,35 ml) Gouttes note de cœur HE de jasmin.
- Première agitation manuelle (2 minutes).
- Additionner 12(0,3 ml) ou bien 16 (0,4ml) ou bien 10(0,4 ml) gouttes note de tête HE de citron mur.
- Deuxième agitation manuelle.
- Placer les trois flacons au froid (0°) pendant quatre semaines.
- Retirer les flacons.
- Filtrer le parfum.
- Prêt à utiliser.
- Note de fonds a été remplacé par les notes de tête et cœur par manque de ce produit.



Figure 16 : Fabrication du parfum



Figure 15 : Le flacon du parfum *Citrus16*

Partie 3 : Résultats et discussions

Partie 3 : Résultats et discussions

I. Description de l'huile essentielle obtenue :

Nous rappelons que l'huile essentielle a été extraite de zeste de citron mur et non mur et des feuilles de citron mur par un Hydrodistillateur de type Clevanger (1928).

Le tableau 2 nous montre une comparaison entre les caractéristiques de notre huile essentielle des trois types.

Tableau 2: les caractéristiques des HE extraites

	Aspect	Couleur	Odeur
Huile essentielle Citron mur	Liquide mobile	Jaune citronné	Aromatique Frais citronné
Huile essentielle Citron non mur	Liquide mobile	Jaune vert olive	Aromatique Frais citronné
Huile essentielle Feuilles	Liquide mobile	Jaune citronné	Aromatique Frais citronné

La figure dessous nous montre les huiles essentielles extraites :

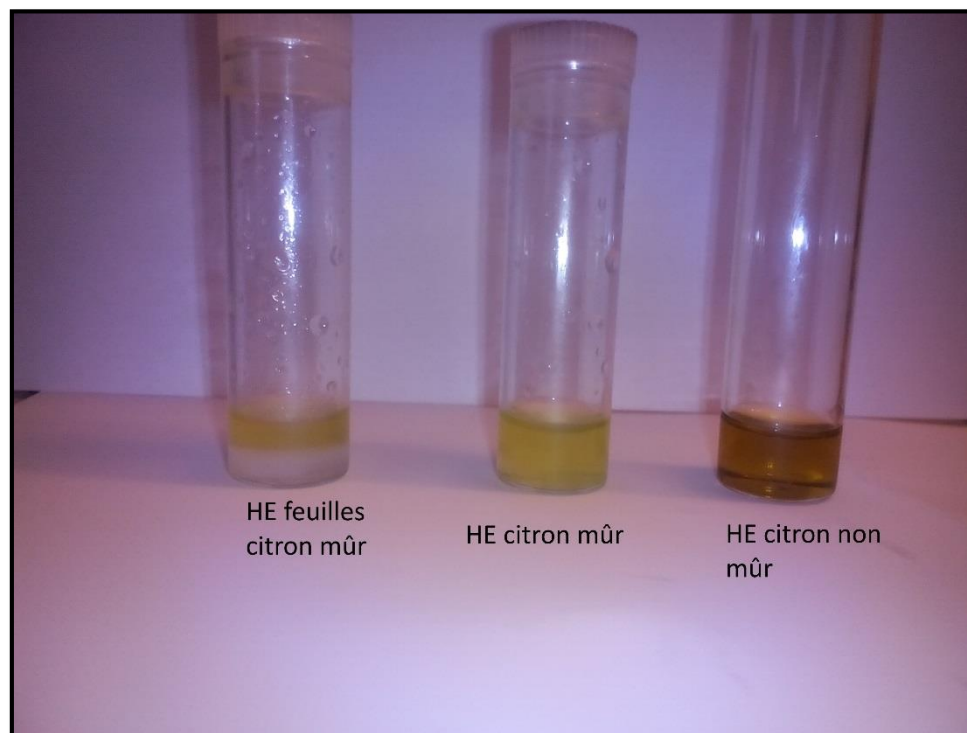


Figure 17 : Huiles essentielles extraites

II. Analyses physiques :

II.1. Le rendement :

L'hydrodistillation est réalisée sur les zestes de citron mûr, les zestes de citron non mûr et les feuilles de citron mûr placées dans un hydrodistillateur. Le tableau(4) résume les rendements moyens en HE extraits (moyenne \pm écart type).

Tableau 3: Rendements de l' HE (moyenne \pm écart type) de *Citrus limon*

Huile essentielle	Citron mûr	Citron non mûr	Feuilles
Rendements (%)	1,52 \pm 0,05	0,98 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01

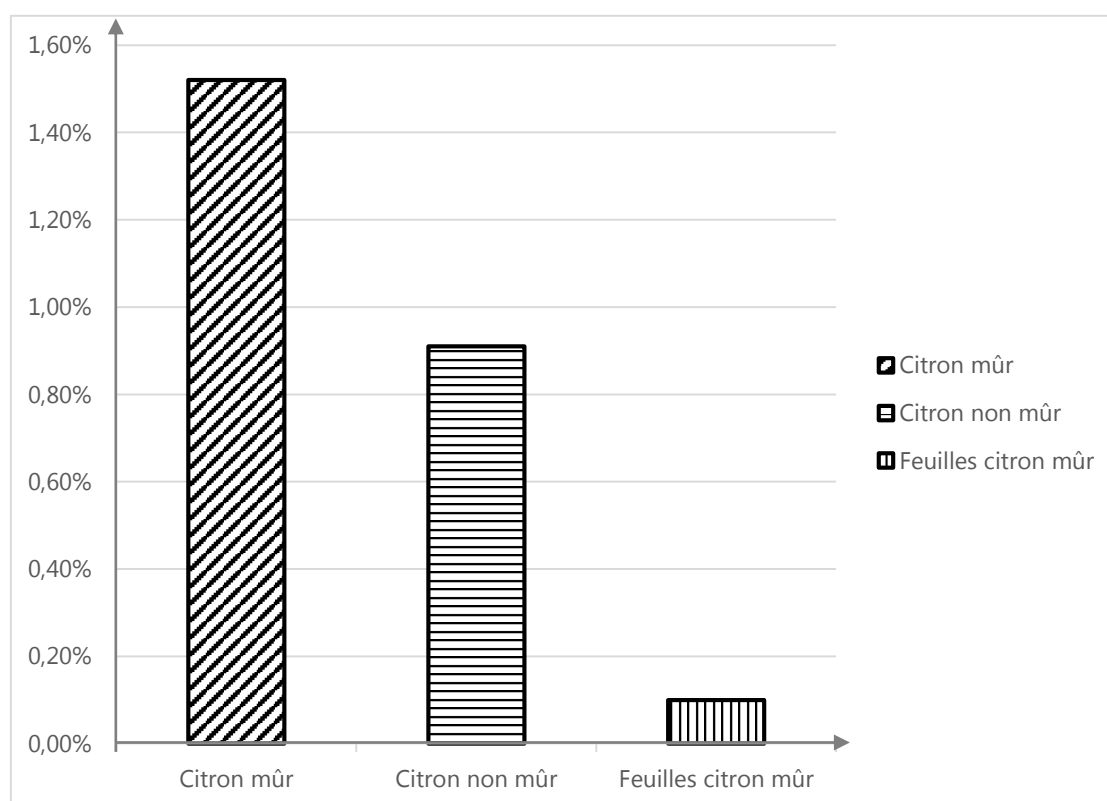


Figure 18 : Pourcentage des HE obtenue pour le citron mûr, le Citron non mûr, et Feuilles

Les résultats représentés sur la figure, montrent que les rendements moyens en HE de citron mûr, citron non mûr, et feuilles sont à l'ordre de 1,52, 0,98 et 0.41 % respectivement.

Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs notamment Le choix de la période de récolte, le climat la zone géographique, la génétique de la plante l'organe de la plante utilisé et les degrés de fraîcheur. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement en HE (VEKIARI *et al.*, 2002).

Nous avons récupéré une quantité huileuse importante de l'huile essentielle de citron mûr par rapport à la quantité obtenue de citron non mûr car le degré de maturité des fruits joue un rôle important sur le

rendement de l'HE (l'huile extraite d'un fruit mûre au printemps et en été aura des propriétés organoleptiques meilleures que celle venant d'un fruit récolté en hiver).

On peut dire que les quantités obtenues des HE pour le citron mûr et citron non mûr dans la pratique restent satisfaisantes pour faire notre étude car les quantités des HE nécessaires sont généralement de l'ordre des microlitres, par contre nous avons obtenu une très faible quantité de l'HE des feuilles (pas assez pour faire notre études), il faut utiliser des grandes quantités des feuilles pour obtenir une quantité huileuse importante.

III. Analyse de la composition chimique :

Les résultats de l'analyse de la composition des huiles testées sont obtenus par comparaison des données de la masse des spectres et des temps de rétention sont résumés dans les Tableaux

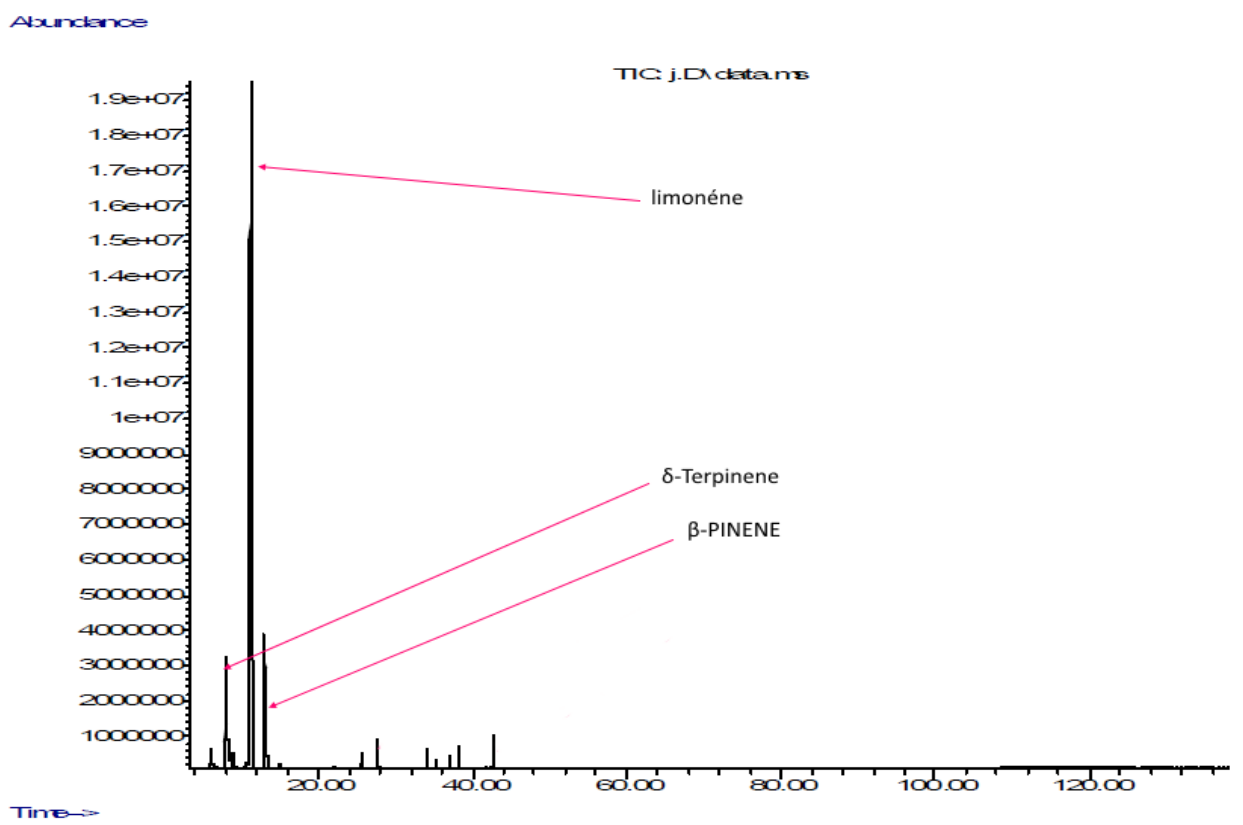
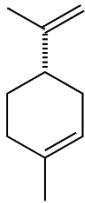
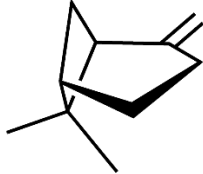
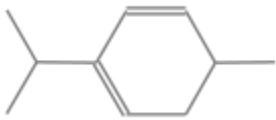


Figure 19 : Profil chromatographique de l'HE de Citron mûr analysée par CPG-SM

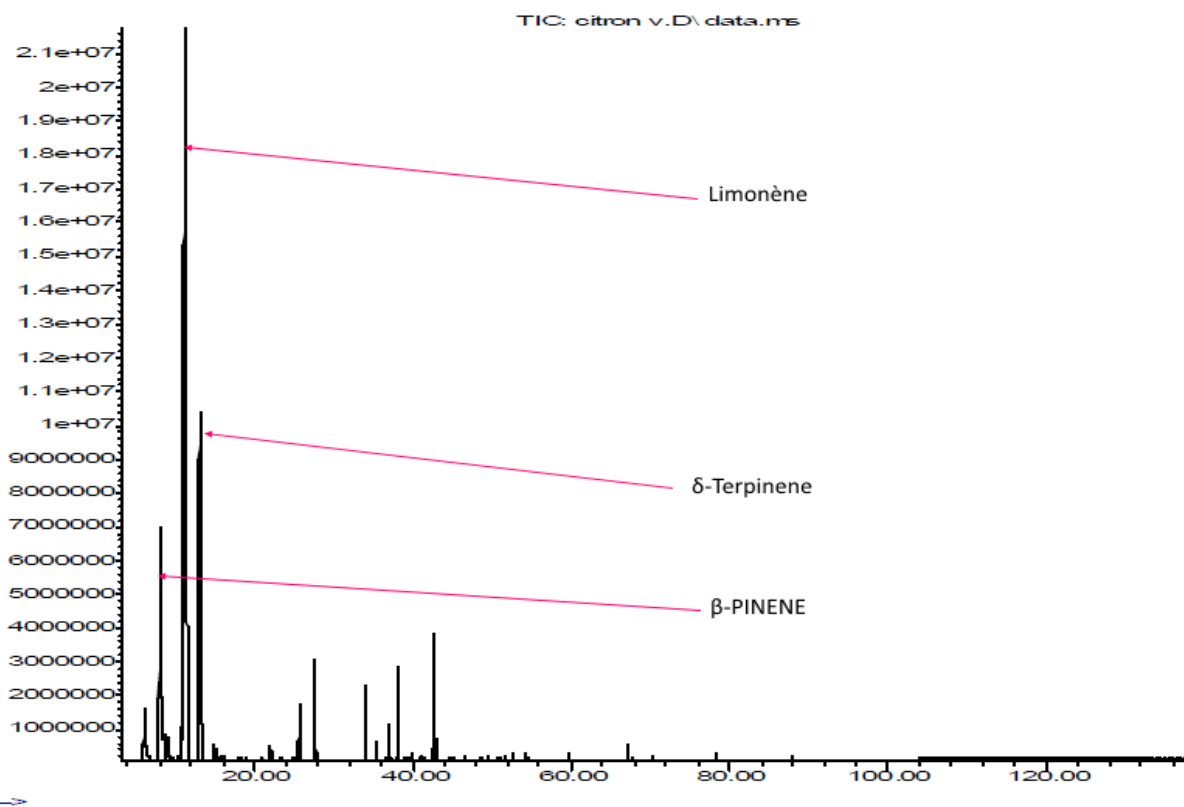
Tableau 4: Composés chimiques (%) de l'H.E de Citron mûr analysée par CPG-SM.

N°	Molécules	Temps de rétention	%
1	α -Thujene	5,758	0,14
2	α -Pinene	6,007	0,71
3	Sabinene	7,811	0,60
4	β-Pinene	7,942	11,01
5	β -Myrcene	8,850	1,54
6	α -Terpinene	10,263	0,08
7	β -Cymene	10,779	0,31
8	Limonène	11,177	68,63
9	δ-Terpinene	12,993	9,73
10	α -Terpinolene	14,922	0,45
11	α -Terpineol	21,985	0,14
12	Citral	25,605	0,75
13	Neryl acétate	34,063	0,76
14	Geranyl acétate	35,316	0,37
15	Caryophyllene	36,895	0,56
16	α -Bergamotene	38,206	0,82
17	α -Elemene	41,696	0,10
18	Bicyclogermacrene	42,400	0,08
19	Humulene	42,426	0,09
20	β -Bisabolene	42,735	1,16

Tableau 5: : les molécules majoritaires de l'HE de citron mûr

N°	Molécules	Structure chimique	%
1	Limonène C ₁₀ H ₁₆	 Cyclohexane,1-methyl-4-(1-methylethenyl)	68,63
2	β-PINENE C ₁₀ H ₁₆	 Bicyclo[3.1.1]heptane,6,6-dimethyl-2-methylene-	11,01
3	δ-Terpinene C ₁₀ H ₁₆	 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	9,73

Abundance



Time →

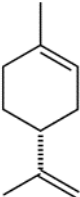
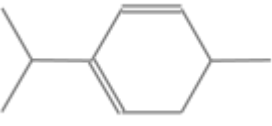

Figure 20 : Profil chromatographique de L'H.E de Citron non mûr analysée par CPG-SM.

Tableau 6: Composés chimiques (%) de l'H.E de Citron non mûr analysée par CG-SM.

N°	Molécules	Temps de rétention	%
1	α -Thujene	5,752	0,22
2	α -Pinene	6,001	1,08
3	Sabinene	7,811	0,69
4	β-Pinene	7,948	13,83
5	β -Myrcene	8,850	0,57
6	α -Terpinene	10,263	0,22
7	Cymene	10,785	1,01
8	Limonene	11,224	47,83
9	Ocimene	12,435	0,22
10	δ-Terpinene	13,052	14,77
11	α -Terpinolene	14,916	0,73
12	Sabinene hydrate	15,581	0,09
13	Linalool	15,907	0,24
14	Limonene oxide	17,990	0,11
15	Menthone	20,080	0,08
16	Terpineol	21,000	0,10
17	α -Terpineol	21,985	0,44
18	Decanal	23,303	0,10
19	Nerol	24,792	0,11
20	Cyclogeraniolene	25,143	0,06
21	Citral	25,617	1,46
22	Neryl acetate	34,069	1,57
23	Geranyl acetate	35,316	0,53
24	Caryophyllene	36,895	0,84
25	α -Santalene	37,162	0,06
26	δ -Elemene	38,016	0,05
27	α -Bergamotene	38,218	1,99
28	α -Humulene	39,002	0,08
29	β -Farnesene	39,750	0,23
30	β -Curcumene	40,925	0,06
31	β -Farnesene	41,133	0,11

32	α -Selinene	41,578	0,05
33	α -Bisabolene	42,432	0,26
34	β -Bisabolene	42,759	2,79
35	Santolina triene	42,883	0,40
36	Germacrene B	45,151	0,07
37	Caryophyllene oxide	46,641	0,15
38	Cyclododecane	48,896	0,04
39	Ledene oxide	49,442	0,15
40	α -Bisabolol	52,718	0,16
41	Herniarin	54,285	0,32
42	Hexadecanal	59,799	0,17
43	Citriptene	67,058	0,47
44	Bergapten	70,406	0,18
45	Isopimpinellin	78,341	0,19
46	Oxypeucedanin	87,927	0,13

Tableau 7: les composés majoritaires de l'HE de citron non mûr

N°	Molécules	Structure chimique	%
1	Limonene C ₁₀ H ₁₆	 Cyclohexane,1-methyl-4-(1-methylethenyl)	47,83
2	δ -Terpinene C ₁₀ H ₁₆	 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	14,77
3	β -Pinene C ₁₀ H ₁₆	 Bicyclo[3.1.1]heptane,6,6-dimethyl-2-methylene-	13,83

L'analyse chimique a fait ressortir un nombre déterminé de constituants pour les deux HE représentant 98.04% et 94.96 % respectivement pour le Citron mûr et le citron non mûr. Cette analyse montre que la plupart des molécules identifiées sont des hydrocarbures monoterpéniques. Le limonène est le composé majoritaire que ce soit pour l'HE de Citron mûr (68.63%) ou pour l'HE de Citron non mûr (47.83%) voir tableaux 5 et 7, nos résultats sont en accord avec ceux publiés sur le citron notamment (Djenane, 2015; Barkat *et al.*, 2016 ; Pierre Michel *et al.*, 2013) .

En plus du limonène qui est le composé majoritaire de l'HE de Citron mûr et même pour l'HE de citron non mûr, d'autres composés majoritaires sont représentés par β -pinène, δ -Terpinene avec des différents pourcentages voir tableaux 6 et 8.

Au total nous avons identifiées 46 molécules pour l'HE du citron vert et 20 molécules pour le citron jaune ; dont 3 molécules sont des molécules majoritaires pour les 2 types de citron. Notre travail montre que les parties jeunes (citron non mûr) sont plus riches en métabolites secondaire que les parties âgées. Le résultat vient de confirmer les résultats obtenus par d'autres chercheurs sur le citron (Djenane, 2015 ; Barkat *et al.*, 2016 ; Samer Jomaa *et al.*, 2012)

La maturité du fruit à un impact important sur la composition chimique et le nombre des métabolites secondaires de l'huile essentielle. Ainsi, les terpènes sont beaucoup plus présents dans l'HE du fruit non mûr. Cependant au fur et à mesure que le fruit mûrisse les concentrations en aldéhydes, les terpènes oxygénés et sesquiterpènes aliphatiques augmentent. (Minh *et al.*, 2002).

Selon (Senatore *et al.*, 2000), les variations rencontrées dans la composition chimique des HE, du point de vue qualitative et quantitative, peuvent dépendre de l'un ou de la combinaison des facteurs biotique et abiotique. En effet, (Woldford *et al.*, 1971 ; Shaw, 1979 ; Boelens, 1991 ; Smith *et al.*, 2001) ont distingué que les HE de *C. limon* pourrait être de chimiotypes β -pinène, limonène, linalol, acétate de linalol, citral, et citronellal.

Il est à noter que la température joue également un rôle sur la composition de l'huile. Des températures basses pendant la maturation entraînent un faible taux de linalol. Des températures moyennes favorisent la concentration de l'huile en composés oxygénés. Les étés chauds et secs donnent à l'huile un degré élevé en esters, ce qui est d'autant plus intéressant que les transactions financières se font sur le taux d'esters de l'essence. De plus, ceux-ci renforcent les propriétés olfactives de l'huile. Trop d'humidité entraîne un fort taux de terpènes carbonés.

Toujours dans le même sens, les auteurs comme (Belletti *et al.*, 2004; Rehman *et al.*, 2004) ont démontré que, généralement les HE de *Citrus limon* sont constituées principalement de composés monoterpéniques (avec un pourcentage de 97%). Alors que les autres composés comme Les alcools, les aldéhydes et, les esters ne sont représentés que sous forme de trace (avec des teneurs faibles allant de 1,8 à 2,2%).

IV. L'activité antibactérienne :

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de citron vis-à-vis de cinq bactéries. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le tableau. D'après la classification de Ponce et *al.* ; (2003), Les zones d'inhibition, variant entre 8 et 13mm, indiquent que les souches sont sensibles à l'huile essentielle de citron.

Tableau 8: activité antibactérienne de l'huile essentielle de Citrus limon exprimé en mm

N°	Souches	Nature	Paroi	Activité /HE		Origine	Type
				Non mûr	Mûr		
1	<i>Escherichia Coli (E.Coli)</i>	Gram ⁻	Double	13	11,2	CHU	Pathogène
2	<i>Klebsiella Pneumonies</i>	Gram ⁻	Double	8	7	CHU	Pathogène
3	<i>Listeria Monocytogenes</i>	Gram⁺	Simple	32	12	CHU	Pathogène
4	<i>Proteus Mirabilis</i>	Gram ⁻	Double	7	6	CHU	Pathogène
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram ⁻	Double	6	6	CHU	Pathogène

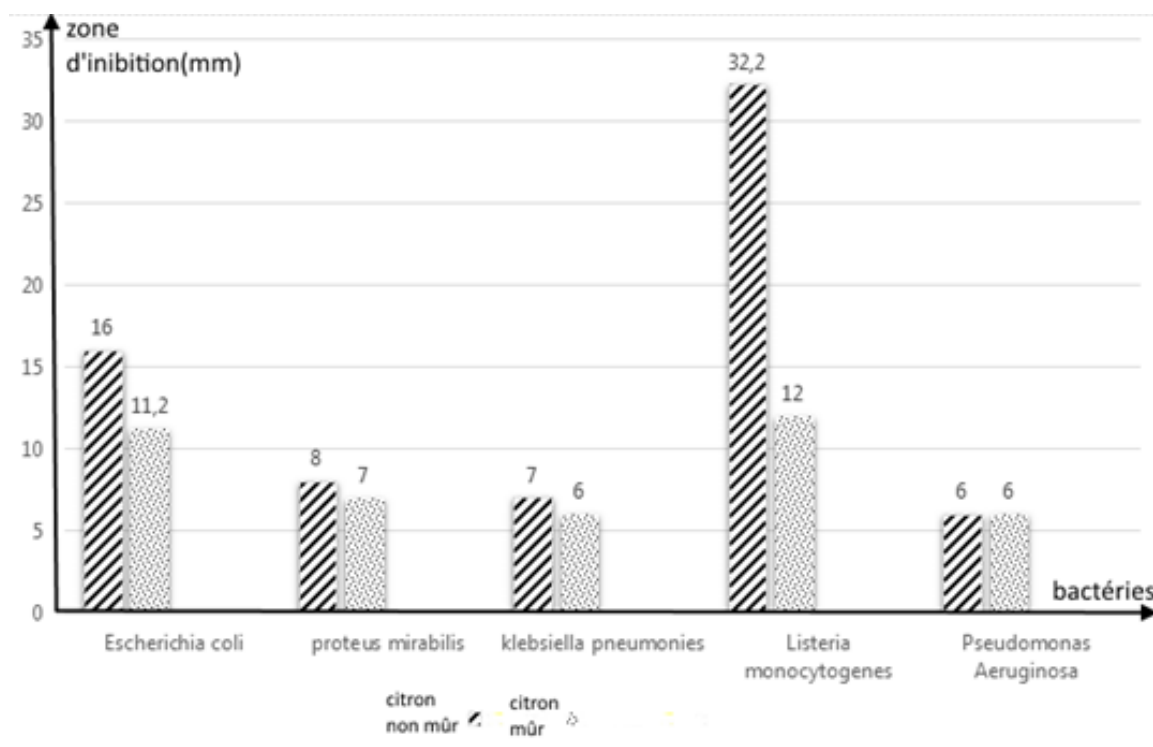
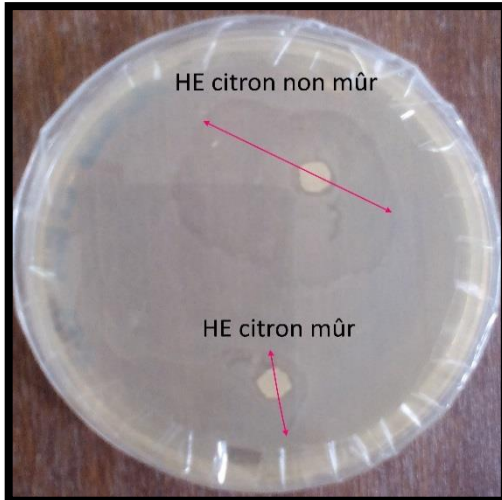
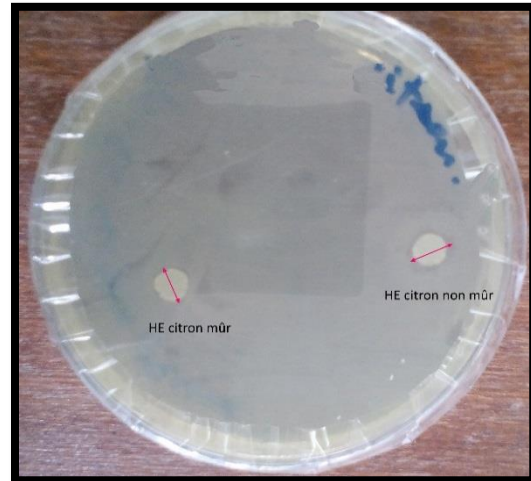


Figure 21 : Activité antibactérienne des HE en fonction des souches bactériennes étudiées

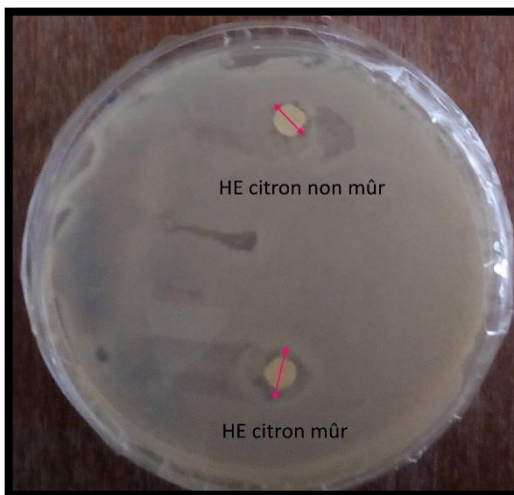
Listeria monocytogene



Proteus mirabilis



Klebsiella Pneumonies



E.coli



Pseudomonas aeruginosa



Figure 22 : Effet inhibiteur de l'huile essentielle du citron non mûr et citron mûr sur les souches bactériennes testées

D'après nos résultats, nous constatons que l'HE pour les deux types a un effet inhibiteur efficace contre quatre espèces bactériennes mais avec des diamètres variables. Nous constatons aussi que la bactérie Gram positif *Listeria monocytogenes* est la bactérie la plus sensible par rapport aux bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *klebsiella pneumonies*, *Pseudomonas aeruginosa* et *proteus mirabilis*) avec un diamètre de 32mm pour le citron non mûr et 12mm pour le citron non mûr.

Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à Gram⁺ sont dépourvues de paroi ce qui facilite l'entrée des molécules des HE à l'intérieure et aura comme conséquence l'inhibition de la croissance bactérienne.

Néanmoins les souches à Gram⁻ (*Escherichia coli*, *klebsiella pneumonies*, *Pseudomonas aeruginosa* et *proteus mirabilis*) sont pourvues de couche lipopolysaccharide (paroi) qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quel intrant.

On peut résumer que l'effet antibactérien de l'HE de *Citrus Limon* selon le diamètre de la zone d'inhibition comme suit :

***Listeria monocytogenes* > *E. Coli* > *Klebsiella Pneumonies* > *Proteus Mirabilis* > *Pseudomonas aeruginosa*.**

Il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie possède un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne des HE des deux types de citron.

Il est à noter que l'activité antimicrobienne la plus élevée a été enregistré avec l'HE de citron non mûr avec une valeur moyenne de l'auréole d'inhibition de 32, 20 mm ceci peut être expliqué par le fait que l'HE de citron non mûr est plus riche en métabolites secondaire que l'HE de citron mûr ainsi que le nombre des molécules.

Les principaux composants actifs des H.Es contre les agents pathogènes contiennent généralement des composés phénoliques (Cristiani et *al.*, 2007). Les propriétés antibactériennes de ces molécules sont en Partie liées à leurs caractères lipophiles menant à l'accumulation au niveau des parois Bactériennes, Ainsi perturbant le fonctionnement et la perméabilité des membranes cellulaires ; dégradation de la paroi cellulaire (Helander et *al.*, 1998), dommages de la membrane cytoplasmique.

V. Analyse de la composition chimique par CCM :

L'analyse par CCM à montrer la présence de 7 taches pour le citron non mûr, et 6 taches pour le citron mûr.



Figure 23 : Plaque CCM de citron non-mûr

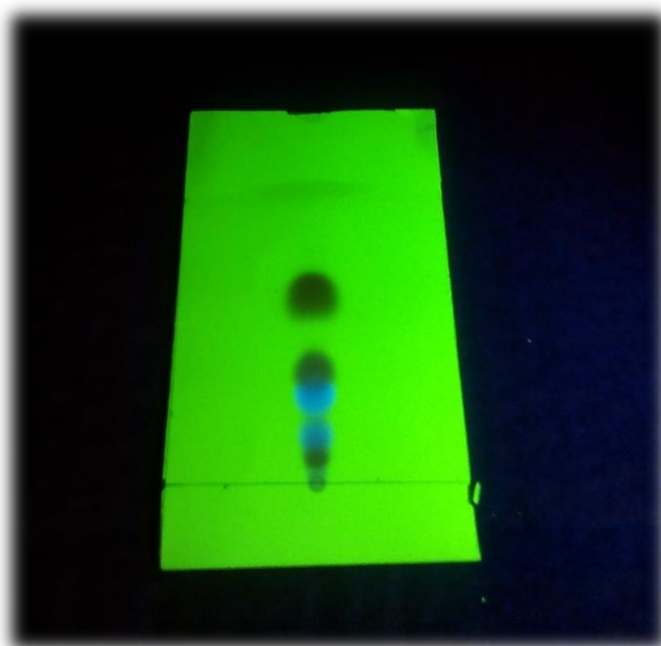


Figure 24 : Plaque CCM de citron mûr

Conclusion :

Notre travail a montré que l'HE du citron non mûr (citron vert) a donné 46 molécules dont 3 sont majoritaires : Limonene (47,83%), δ Terpinene (14,17%) et β Pinene (13,83%). Cependant pour le citron mûr (citron jaune) nous avons identifiés seulement 20 molécules soit une différence de 43,47 %. Ce dernier a révélé aussi 3 molécules majoritaires : Limonene (68,63%), β Pinene (11,01%) et δ Terpinene (9,73%).

Cette huile a fait l'objet de l'évaluation de son activité biologique vis-à-vis de cinq souches bactériennes (une souche à Gram⁺ et quatre souches à Gram⁻). Ce test biologique a montré l'efficacité de l'HE (citron non mûr, citron mûr) pour l'ensemble des souches étudiées notamment pour *Listeria Monocytogenes* avec une zone d'inhibition de 32 et 12 mm de diamètre respectivement pour le citron non mûr et citron mûr. En effet *Pseudomonas aeruginosa* a montré un test négatif.

Parallèlement ce travail a été suivi par une fabrication du parfum à base de l'HE du citron mûr. Ce dernier nous l'avons attribué le nom de Citrus16.

Références Bibliographiques

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΩΝ

- Abdesselam. Z. (2006).** Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.*, pp 6-16.
- Bouguerra .A. (2012).** Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. *Mémoire Magister.*,pp 3-9.
- Himed. L, Merniz. S et Barkat. M. (2016).** Evaluation des activités antioxydantes et antibactériennes de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation. *Algerian Journal of Natural Products.*, pp 256-257.
- Benjelali .B., Tantaoui E.A. et Esmaili-Alaoui .M. (1986).** Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie.* (Ed) vol, pp 20, 155-167.
- Berset. C. et Cervelier M.E. (1996).** Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments.* (Ed) vol, pp16, 219-245.
- Besombes.C. (2008).** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *Thèse de Doctorat de l'Université de la Rochelle. France*, pp 67-68.
- Beuchat. L.R.(1976).** Sensitivity of vibrio parahaemolyticus to spices and organic acids. *Food science*, pp 899-902.
- Djenane .D. (2015).** Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian Citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods* **2015**, *4*, 208-228; doi:10.3390/foods4020208
- Idir. L. (2010).** Activité antibactérienne de quelques huiles essentielles extraites à partir des espèces végétales de la région de la Kabylie. *Mémoire de Magister*, pp.12-13.
- Lidianne .M. (2011).** Evaluation of central nervous system effects of *Citrus limon* essential oil in mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, pp 671-672.
- Neeraj .K. (2010).** Isolation and characterization of total volatile components from leaves of *Citrus limon* linne. *Thèse Magister*, pp.68.
- Jomaa. S, Rahmo. A, Alnori.A.S et Chatty. M.E (2012).** The cytotoxic effect of essential oil of Syrian *Citrus limon* peel on human colorectal carcinoma cell line (Lim1863). *Middle East Journal of Cancer.* 3 (1): 15-21.
- Teusher .E., Anton .R. et Lobstein.A. (2005).** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. *Tec et Doc*, Paris, pp 522.

Ultee. A., Kets. E.P.W. et Smid. E.J. (1999). Mechanism of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 174 (4), 233-238.

Ultee. A., Bennik. M.H.J. et Moezelaar. R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, pp.1561-1568.

Utree A., Slump .R.A., Steging .G. et Smid .E.J. (2002). Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of food protection*.63, pp. 620-624.

Verzele .L., Moudachirou .S. et Ramanoelina .G. (1988). Perfumer and flavorist. *Flavour and fragrance journal*.13, pp 61-67.

Wang .H.F., Yih .K.H. et Huang .K.F. (2010). Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of food and drug analysis*, Vol. 18, N° 1, pp 24-33.

Wendakoon .C.N. et Sakaguchi M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58, pp 280-283.

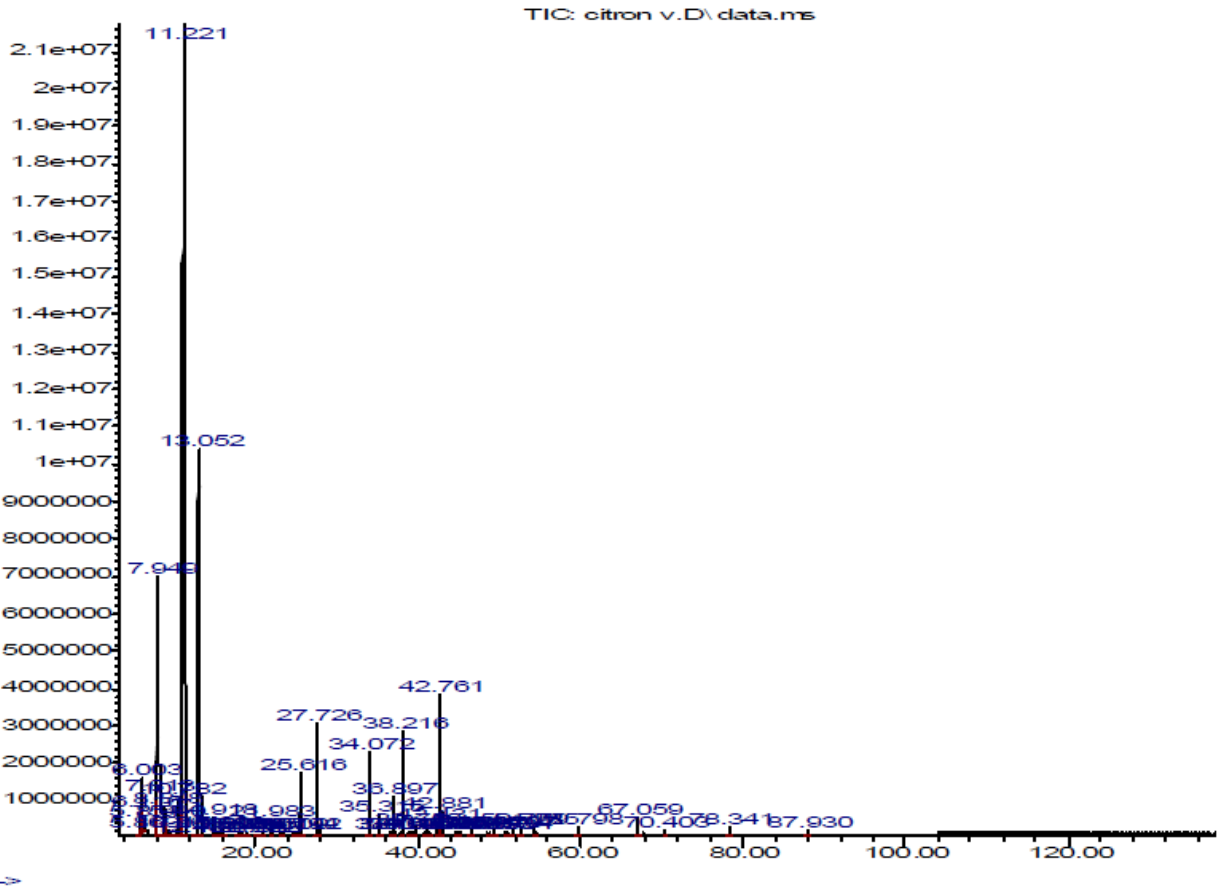
Wichtl .M. et Anton .R. (1999). Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinales. Sciences et thérapeutique, Ed. Tec et Doc, pp250.

Wilson .M. et Girard .G.(2007). Fleurs comestibles du jardin à la table, Ed. Fides , pp.230.

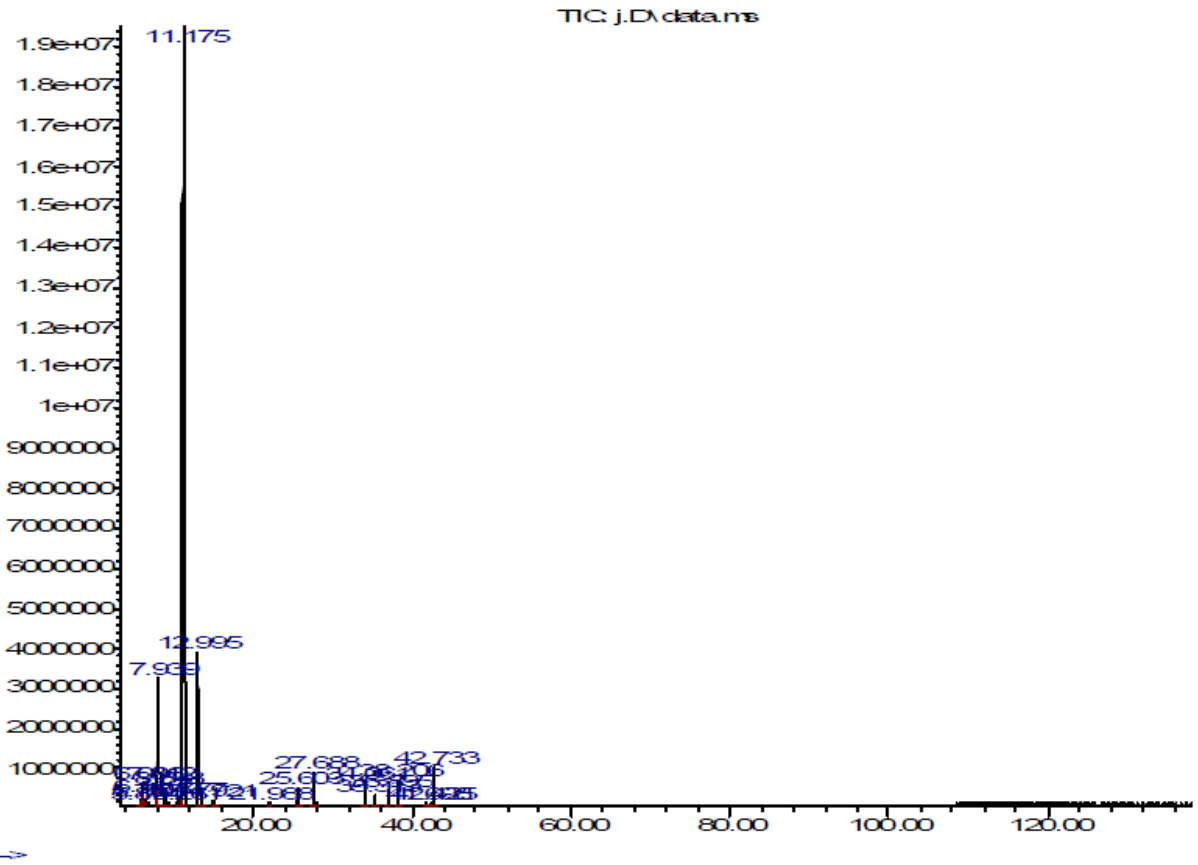
Annexes

Annexes

Abundance



Abundance



Library Search Report

Data Path : D:\MassHunter\GCMS\1\methods\prestation externe\boukaabech\

Data File : citron jaune.D

Acq On : 26 May 2016 14:07

Operator : Derdour Mouna

Sample : Citron jaune

ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\W9N11.L Minimum Quality: 80

Quality: 50 C:\Database\NIST11.L Minimum

-
- 1 5.758 0.14 C:\Database\W9N11.L
- .alpha.-Thujene \$\$ Bicyclo[3.1.0]h 45039 002867-05-2 95
ex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethy
l)- (CAS)
- .alpha.-Thujene \$\$ Bicyclo[3.1.0]h 45044 002867-05-2 94
ex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethy
l)- (CAS)
- Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl- 45041 002867-05-2 94
5-(1-methylethyl)- \$\$ 3-Thujene
- 2 5.876 0.06 C:\Database\W9N11.L
- .alpha.-Thujene \$\$ Bicyclo[3.1.0]h 45042 002867-05-2 97
ex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethy
l)- (CAS)
- Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl- 45041 002867-05-2 94
5-(1-methylethyl)- \$\$ 3-Thujene

Library Search Report

Data Path : D:\MassHunter\GCMS\1\methods\prestation externe\boukaabech\

Data File : citron v.D

Acq On : 26 May 2016 10:48

Operator : Derdour Mouna

Sample : citron vert

ALS Vial : 1 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\W9N11.L Minimum Quality: 80
C:\Database\NIST11.L Minimum Quality: 50
C:\Database\demo.1

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	5.752	0.22	C:\Database\W9N11.L			
			.alpha.-Thujene \$\$ Bicyclo[3.1.0]h	45039	002867-05-2	94
			ex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethy			
			l)- (CAS)			
			THUJENE \$\$ BICYCLO[3.1.0]HEX-2-ENE	45049	002867-05-2	93
			, 2-METHYL-5-(1-METHYLETHYL)-			
			.alpha.-Thujene \$\$ Bicyclo[3.1.0]h	45044	002867-05-2	93
			ex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethy			
			l)- (CAS)			
2	5.870	0.09	C:\Database\W9N11.L			
			.alpha.-Thujene \$\$ Bicyclo[3.1.0]h	45042	002867-05-2	95
			ex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethy			

Gélose Nutritive

Extrait de viande de bœuf.....1g ;
Extrait de levure..... 2g ;
Peptone.....5g ;
Chlorure de sodium.....5g ;
Agar.....15g.
PH= 7, 2 à 7, 4

Agar Mueller Hinton

Eau distillée.....1000ml ;
Infusion de viande de boeuf.....02.0g ;
Hydrolysate de Caseine.....17.5g ;
Amidon.....1, 5g;
Agar.....10g.
PH= 7.4

Extraction, identification de l'huile essentielle par CPG-SM de l'espèce *Citrus limon* et mise en évidence de son activité antibactérienne. Fabrication du parfum.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Métabolisme secondaire et molécules bioactives

Résumé : Les molécules bioactives extraites des plantes aromatiques par la méthode de distillation par entraînement à la vapeur d'eau pourront être une alternative plausible pour les personnes présentant une résistance à l'usage des antibiotiques, et aussi pour les personnes âgées ne supportant plus l'administration normale de ces médicaments.

Notre travail montre que l'HE du citron non mûr (citron vert) a donné 46 molécules dont 3 sont majoritaires : Limonene (47,83%), δ Terpinene (14,17%) et β Pinene (13,83%). Cependant pour le citron mûr (citron jaune) nous avons identifiés seulement 20 molécules soit une différence de 43,47 %. Ce dernier a révélé aussi 3 molécules majoritaires : Limonene (68,63%), β Pinene (11,01%) et δ Terpinene (9,73%). Ces résultats confirment ceux obtenus et décrits en littérature.

Cette huile a fait l'objet de l'évaluation de son activité biologique vis-à-vis de cinq souches bactériennes (une souche à Gram+ et quatre souches à Gram-). Ce test biologique a montré l'efficacité de l'HE (citron non mûr, citron mûr) pour l'ensemble des souches étudiées notamment pour *Listeria Monocytogenes* avec une zone d'inhibition de 32 et 12 mm de diamètre respectivement pour le citron non mûr et citron mûr. En effet *Pseudomonas aeruginosa* a montré un test négatif.

Parallèlement ce travail a été suivi par une fabrication du parfum à base de l'HE du citron mûr. Ce dernier nous l'avons attribué le nom de Citrus16..

Mots clés : Huile essentielle ; *Citrus limon* ; activité antibactérienne ; cpg-sm.

Jury d'évaluation :

-Président du jury : Mr. Kara Youcef
-Encadreur : Mme. Labbani Zelikha
-Examinateur : Mme. Bouchoukh Imane

Pr –UFM Constantine
Pr –UFM Constantine
Maître-assistante UFM Constantine

Date de soutenance : 19/06/2016