

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Djilali Bounaama - Khemis Miliana



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département des sciences de la matière

Mémoire du Projet de Fin d'Etudes

Pour l'obtention de diplôme

Master

En

« Chimie »

Option :

« Chimie pharmaceutique et substances naturelles »

Titre :

**Etude de l'extraction et de l'activité antioxydante et
antibactérienne des extraits de la verveine
"*Lippia citriodora*"**

Réalisé par :

Fellah Aicha

Mouaici Noura

Encadré par :

Pr.Brada Moussa

Année Universitaire 2014/2015

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier *ALLAH EL KARIM* et le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qui nous a donné durant toutes les années d'études.

Recevez ici nos sincères remerciements pour la confiance, les conseils que vous nous avez accordés tout le long de ce travail. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre gentillesse monsieur **BRADA MOUSSA**.

Nous tenons à remercier mes dames et messieurs les membres de jury

L'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce travail.

Nous remercions tous les enseignants de département "sciences de la matière " spécialement: **Mr.LARBI BOUAMRANE, Mr. MEKHANEG , M^{ame}. BOUSSAHA, Mr.**

HELLEL et Mr.HECHAMA tous qui nous ont aidé de près ou loin pendant toutes les années d'études.

Nous remercions également AICHA, , LAMIA et HOURIA , WASSILA veuillez trouver ici l'expression de nos gratitude pour nous avoir accueillie au sein de vos laboratoires. Soyez assurées de nos profonds respects et de nos vives reconnaissances pour nous avoir fait bénéficier de vos expériences et de vos rigueurs scientifiques et professionnelles.

Nous profitons aussi de cet occasion pour adresser nos remerciements à nos parents pour leur sacrifices et à toutes les familles qui nous ont toujours encouragé et soutenu tout au long des années d'étude. nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribués de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts

*A ceux que j 'aime le plus au monde mes très chers parents,
leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie, je ne
saurais jamais comment exprimer mes sentiments pour avoir
veillé sur mon éducation, jamais je ne peux les remercier
assez de m'avoir donné le meilleur.*

A ma chère sœur Sousou .

A mes chers frères Amine et Oussama .

*Je n'oublie jamais le générosité illimitée de mes amis , Aicha
et Lamia*

A tout mes amis Ahlem, Widad, Soumia , Nadja,

*A mon binôme Noura avec qui j'ai partagé les bons et
les durs moments.*

*A toute ma famille et a tout ce qui me connaissent je vous
aime.*

Aicha



Dédicace

Au fond du cœur ; je dédie ce modeste travail :

A mes deux bijoux de ma vie, ma très chère mère et mon cher père pour leurs soutenance et leurs encouragements au cours de la réalisation de ce travail.

A mes adorables sœurs FATI et RITADJ pour leurs soutien moral et leurs aides merci d'être la pour moi.

A mes très chers frères IDRIS et MOURAD qui ont toujours été à mes cotés.

A mon binôme AICHA avec qui j'ai partagé les bons et les durs moments.

A tous mes oncles , mes tantes, mes cousins

A tous mes amis et les étudiants de la promotion 2014 / 2015 de chimie pharmaceutique.

A LAMIA et AICHA pour ses encouragements dans tout les moments.

A tous ceux qui m'ont encouragé et m'ont apporté leur soutien.

NOURA

في بداية هذه الزيوت من اللوزة (*Lippia citriodora*) طريق تقني
التقطير الكهرومغناطيسي , ذلك أجرينا تحديد
خصائصها و مراقبة مردودها اعتمادا على مدة استرجاع الغلة (2013 "0.40%" , 2014 "0.66%" ,
2015 "1.03%") , تأثير التجفيف . علما انه تم قطف الغلة من منطقة مليانة (ولاية عين
-) .

سمح التحليل الكروماتوجرافي الغازي مطيافية الكتلة (MS/CG) بتحديد 34 و المكونات الرئيسية هي :
(20,48) Citral , (16,35) Z citral , (8,06) ar curcumène , (7,77) Limonène ,
(5,07) Spathulenol .

الزيت اظهر وجود نشاط
طريقة الحديد
نوعية و كمية الميكروبيولوجية
طريقة
تأثير هذا المستخلص على ثلاثة
له تأثير كبير على جميع البكتيريا و الخميرة المجرب عليها و بنسب متفاوتة.

الكلمات المفتاحية: *Lippia citriodora* , الزيوت الطيارة, التركيب الكيميائي,
المضاد للبكتيريا.

Résumé

Nous avons réalisé dans un premier temps une extraction à partir du Verveine (*Lippia citriodora*), par deux méthodes (Extraction par hydrodistillation et par Induction électromagnétique) pour savoir ses caractères et de suivre son rendement selon la période de la récolte (Septembre 2013 0.40% , Septembre 2014 0.66% , Mai 2015 1.03), la partie de la plante et l'influence du séchage. Sachant que notre plante était récolté à Miliana (Région d'Ain Defla-Algérie).

L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplé a la spectrometrie de masee (CG/SM) a permet d'identifier 34 composés et les principaux constituants sont : citral (20,48%), Z citral (16.35%), ar-Curcumène (8.06%), Limonène (7.77%) , Spathulenol (5.07%).

L'étude du pouvoir antioxydant de huile essentielle, par la méthode du DPPH•, a montré l'existence d'une activité antioxydante (53.84%) et moyenne par la méthode de réduction du fer comparé avec de standard vitamine C. Les tests quantitatifs et qualitatifs de l'extraits obtenue sur trois bactérie et une levure ont permet de constatés que notre extraits possède une activité très intéressante sur toutes les souches testés.

Mots clés : *Lippia citriodora*, extraction, huile essentielle, composition chimique, activité anti-oxydante , activité antibactériennes.

Abstract

We realized at first, extraction from the Verveine (*Lippia citriodora*), by two methods (extraction by steam distillation and electromagnetic induction) to determine its characteristics and monitor its performance depending on the time of harvest (September 2013 "0.40%", September 2014 "0.66%", May 2015 "1.03%"), the part of the plant and the influence of drying, knowing that our plant was harvested in Miliana (Region at Ain Defla- Algeria).

The analysis by gas chromatography /quadrupole masse spectrometry (GC/MS) was used to identify compounds 34 and the main constituents are: : citral (20,48%), Z citral (16.35%), ar-Curcumène (8.06%), Limonène (7.77%), Spathulenol (5.07%).

The study of the essential oil of antioxidant power by DPPH • method showed the existence of an antioxidant activity (53.84%) and average reduction method of iron compared with standard vitamin C. Tested the quantitative and qualitative of the extract obtained in three bacteria and yeast have allowed recognized that our single "essential oil" has a very interesting activity on wholes strains tested.

Keywords: *Lippia citriodora*, extraction, essential oil, chemical composition, antioxidant activity, antibacterial activity.

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Classification botanique de l'espèce de <i>Lippia citriodora</i>	23
Tableau 1.2 : Variétés de la verveine	24
Tableau 1.3 : Principaux constituants des huiles essentielles de <i>L.citriodora</i>	26
Tableau 2.1 : Principaux composés de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> analysée par CG/MS	30
Tableau 2.2 : Composants majoritaires de <i>Lippia citriodora</i> révélés par CPG.....	31
Tableau 2.3 : Caractéristiques organoleptiques d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	31
Tableau 2.4 : Propriétés physico-chimiques d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	32
Tableau 2.5 : Rendement en huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> par hydrodistillation.....	32
Tableau 2.6 : Rendement en huiles essentielles de <i>Lippia citriodora</i>	33
Tableau 2.7 : Effet de l'huile essentielle sur la croissance de quelques souches pathogènes.....	34
Tableau 2.8 : Diamètre des zones (en mm) de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> vis-à-vis des souches pathogènes après 24 heures d'incubation a 37°C.....	34
Tableau 2.9 : Composition chimique de <i>Lippia citriodora</i> dans le monde.....	35
Tableau 2.10 : Composition en pourcentage des principaux groupes de composés de l'huile essentielle des feuilles et les tiges de <i>Aloysia triphylla</i> récoltés cinq fois plus d'un ans.....	36
Tableau 2.11 : Les principaux composants de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> récoltés de divers pays.....	37
Tableau 2.12 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> du Maroc et Paraguay.....	38
Tableau 2.13 : Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> de Maroc et Paraguay.....	39
Tableau 2.14 : Les activités antibactériennes de l'huile essentielle contre les Microorganismes.....	42

Liste des tableaux

Tableau 2.15 : Les zones d'inhibition de croissance (mm), la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	43
Tableau 2.16: Efficacité de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i> contre <i>Tribolium confusum</i> et <i>Callosobruchus maculatus</i>	43
Tableau 3.1: Les caractéristiques géographiques de la région de récolte de la plante.....	45
Tableau 3.2 : Conditions opératoires de l'extraction des HE par HD	47
Tableau 3.3 : Conditions opératoire de l'extraction par IEM.....	49
Tableau 3.4 : Les souches bactériennes testées.....	57
Tableau 4.1: Taux d'humidité de <i>Lippia citriodora</i>	61
Tableau 4.2: Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches de <i>Lippia citriodora</i> par HD dans la région de Miliana en fonction du temps au mois de septembre 2013 et septembre 2014.....	62
Tableau 4.3: Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles fraîches et sèches et les parties aériennes fraîches de <i>Lippia citriodora</i> extraites par HD en Mai 2015.....	64
Tableau 4.4: Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches et des feuilles sèches broyées de <i>Lippia citriodora</i> extraites par HD en Mai 2015.....	66
Tableau 4.5: Évolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches de <i>Lippia citriodora</i> de Miliana par HD et IEM en fonction du temps.....	67
Tableau 4.6: Caractéristiques organoleptiques de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	69
Tableau 4.7: Caractéristiques physico-chimiques de <i>Lippia citriodora</i>	69
Tableau 4.8: Composition chimique d'HE de <i>Lippia citriodora</i>	71
Tableau 4.9: Variations de la composition chimique de l'HE de <i>Lippia citriodora</i>	73
Tableau 4.10: Pourcentage d'inhibition d'HE de <i>Lippia citriodora</i> et la vitamine C par la méthode de DPPH.....	74

Liste des tableaux

Tableau 4.11: Les valeurs de IC ₅₀ de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> et la vitamine C par le test du DPPH.....	75
Tableau 4.12: L'absorbance d'HE de <i>Lippia citriodora</i> et la vitamine C par la méthode de FRAP.....	76
Tableau 4.13: Les valeurs de IC ₅₀ de l'HE de <i>Lippia citriodora</i> et la vitamine C par le test du FRAP.....	77
Tableau 4.14: Diamètre et le pourcentage d'inhibition des souches bactériennes par la différente concentration de l'HE des feuilles de <i>Lippia citriodora</i>	79
Tableau 4.15: Diamètres des zones et des pourcentage d'inhibition de l'HE de <i>L.citriodora</i> ...	81
Tableau 4.16: Aromatogramme de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	81
Tableau 4.17: Concentration minimale inhibitrice (CMI) d'HE de <i>L.citriodora</i>	83

Liste des figures

Liste des figures

Figure 1.1 : La verveine (اللوزة)	22
Figure 1.2 : Structure chimique des composés identifiés dans les huiles essentielles de verveine.....	27
Figure 1.3 : Structure des principaux polyphénols présents dans l'infusé de la verveine odorante (A) lutéoline 7-diglucuronide ; (B) verbascoside.....	27
Figure 2.1 : Activité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle de <i>L.citriodora</i> par la méthode du DPPH.....	40
Figure 2.2 : Activité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle de <i>L.citriodora</i> par la méthode de FRAP.....	41
Figure 3.1 : Situation de Zone d'étude.....	44
Figure 3.2 : La verveine : a : feuilles fraîches, b : parties aériennes, c : feuilles sèches.....	45
Figure 3.3 : Montage d'hydrodistillation.....	46
Figure 3.4 : Montage de l'extraction assisté par induction électromagnétique.....	48
Figure 3.5 : Représentation schématique du test au DPPH.....	55
Figure 4.1 : Taux d'humidité de <i>Lippia citriodora</i> au mois de Mai.....	61
Figure 4.2 : Cinétique d'extraction par HD des HE des feuilles sèches de <i>Lippia citriodora</i> dans la région de Miliana en septembre 2013 et 2014.....	63
Figure 4.3 : Cinétique d'extraction par HD des HE des feuilles fraîches et sèches et les parties aériennes fraîches de <i>Lippia citriodora</i> extraites par HD en Mai 2015.....	64
Figure 4.4 : Evolution de rendement des HE des feuilles fraîches et sèches et les parties aériennes fraîches de <i>Lippia citriodora</i> extraites par HD en Mai 2015.....	65
Figure 4.5 : Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches et des feuilles sèches broyées de <i>Lippia citriodora</i> extraites par HD en Mai 2015.....	66
Figure 4.6 : Évolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches de <i>Lippia citriodora</i> de Miliana par HD et IEM en fonction du temps.....	67

Liste des figures

Figure 4.7 : Évolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches de <i>Lippia citriodora</i> de Miliana par HD et IEM.....	68
Figure 4.8 : Chromatogramme de la composition d'HE de <i>Lippia citriodora</i> des feuilles obtenue par HD de la région de Miliana.....	72
Figure 4.9 : Pourcentage d'inhibition d'HE de <i>Lippia citriodora</i> et la vitamine C par la méthode de DPPH.....	74
Figure 4.10 : Représentation schématique de IC_{50} de <i>Lippia citriodora</i> et la vitamine C.....	75
Figure 4.11. L'absorbance d'HE de <i>Lippia citriodora</i> et la vitamine C par la méthode de FRAP.....	77
Figure 4.12 : Représentation schématique de IC_{50} de <i>Lippia citriodora</i> et la vitamine C.....	78
Figure 4.13 : Effet antibactérienne et antifongique d'HE pur de <i>L.citriodora</i> sur différente souche et levure.....	80
Figure 4.14: Effet antibactérienne et antifongique des dilutions de l'HE de <i>L.citriodora</i> sur différente souche et levure.....	82

Liste des abréviations

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

ABTS : Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique .

AFNOR : Association française de normalisation .

C : Concentration.

°C : Degré Celsius .

°C /min : Degré Celsius/minute .

cm/sec : Centimètre/ seconde.

CG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplé par la spectrométrie de masse .

CL₅₀ : Concentration létale 50 .

CMI : Concentration minimale inhibitrice .

CPG : Chromatographie en phase gazeuse .

DPPH : 2, 2'-diphényl-1-picrylhydrazyle .

E.coli : Escherichia coli .

eV : Electron volte.

FeCl₃ : Trichlorure de fer .

FRAP : Ferric reducing antioxydant power .

g : Gramme .

GN : Gélose nutritive .

H (%) : Taux d'humidité.

HCl : Acide chlorhydrique .

HD : Hydrodistillation .

HE : Huile essentielle.

I_A : Indice d'acide .

IC₅₀ : Concentration inhibitrice 50 .

I_E : Indice d'ester .

IEM : Induction électromagnétique .

I : Indice de réfraction à 20 degré Celsius .

KOH : Hydroxyde de potassium

L.A.M.Z : Laboratoire d'analyse médicale zibouche .

MDA : Malondialdéhyde.

Liste des abréviations

- mg** : Milligramme .
- M-H** : Milieu Mueller -Hilton.
- M_{HE}** : Masse en huile essentielle .
- min** : Minute.
- ml** : Millilitre.
- MS** : Matière végétale sèche .
- MV** : Matière végétale .
- NaCl : chlorure de sodium .
- nm** : Nanomètre .
- pH** : Potentiel d'Hydrogène .
- ppm** : Partie par million .
- PR** : Pouvoir de réduction .
- R(%)** : Rendement (%).
- R_{HE}** : rendement d'extraction d'huile essentielle.
- SOD** : uperoxyde dismutase.
- T** : Température .
- T/ha** : Tonne/ hectare .
- tr** : Temps de rétention .
- UV** : Ultra violet .
- V** : Volume .
- V/V** : Volume/volume .
- Vit C** : vitamine C .
- µg** : Microgramme .
- µl** : Microlitre .
- uma** : unité de masse atomique .
- %** : Pourcentage .

Table de matière

Table de matière

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale 18

Chapitre 1 : Matière végétale " *Lippia citriodora* "

1.1. Introduction 20

1.2. Les plantes aromatiques 20

1.3. Les plantes médicinales 20

1.4. Classification des plantes médicinales et aromatiques 20

1.4.1. Systématique botanique de la plante 21

1.5. La verveine (*Lippia citriodora*) 21

1.5.1. Généralité 21

1.5.2. Histoire 21

1.5.3. Noms communs..... 22

1.5.4. Classification de la verveine... 23

1.5.5. Description de *Lippia citriodora*..... 23

1.5.6. Habitat et culture de *L.citriodora*..... 23

1.5.7. Variétés et espèces 24

1.5.8. Récolte et séchage de *L. citriodora*..... 24

1.5.9. Principaux pays producteurs et exportateurs de la verveine..... 25

1.5.10. Marché de *L.citriodora* 25

1.5.11. Composition chimique de *L.citriodora*..... 25

1.5.12. Composition en polyphénols de l'infusé de *L.citriodora*..... 27

1.5.13. Propriétés antioxydantes de l'infusé de *L.citriodora*..... 28

1.5.14. Usage de la verveine 28

1.5.14.1. Phytothérapie..... 28

Table de matière

1.5.14.2. Alimentation	29
Chapitre 2 : Travaux antérieurs	
2.1. Introduction.....	30
2.2. L'huile essentielle de la verveine Algérienne	30
2.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	30
2.2.2. Propriétés organoleptiques d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	31
2.2.3. Propriétés physico-chimiques d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	32
2.2.4. Rendement en huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	32
2.2.5. Les activités biologiques d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	33
2.2.5.1. L'activité antioxydante	33
2.2.5.2. L'activité antibactérienne	33
2.3. Les huiles essentielles de <i>Lippia citriodora</i> dans le monde	35
2.3.1. Composition chimique des huiles essentielles de <i>Lippia citriodora</i>	35
2.3.2. Propriétés organoleptiques d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	38
2.3.3. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	38
2.3.4. Les activités biologiques d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	39
2.3.4.1. L'activité antioxydante	39
2.3.4.2. L'activité antibactérienne	41
2.3.4.3. L'activité insecticide	43
Chapitre 3 : Matériels et méthodes	
3.1. Introduction	44
3.2.Extraction des huiles essentielles de <i>Lippia citriodora</i>	44
3.2.1. Zone d'étude	44
3.2.2. Matériel végétal	45
3.2.2.1. Extraction par hydrodistillation	46
3.2.3.2. Extraction par l'induction électromagnétique	47

Table de matière

3.3. Détermination du taux d'humidité	49
3.4. Influence de la durée d'extraction sur le rendement	49
3.5. Calcul du rendement	50
3.6. Caractéristiques des huiles essentielles	50
3.6.1. Etude des propriétés organoleptiques	50
3.6.2. Etudes des propriétés physico-chimiques	51
3.6.2.1. Les propriétés physiques	51
3.6.2.2. Les propriétés chimiques	51
3.7. Caractérisation des huiles essentielles extraites.....	53
3.7. 1. Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS).....	54
3.8. Evaluation de l'activité antioxydante	54
3.8.1. Méthode du DPPH	55
3.8.2. Méthode du Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP)	56
3.9. Evaluation de l'activité antibactérienne	57
3.9.1. Les souches bactériennes testées	57
3.9.2. Conservation des souches	58
3.9.3. Les milieux de culture	58
3.9.4. Préparation des pré-cultures	58
3.9.5. Essais antibactériennes	58
3.9.5.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	58
3.9.5.2. Évaluation quantitative de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	59

Chapitre 4 : Résultats et discussions

Table de matière

4.1. Introduction	61
4.2. La matière végétale : <i>Lippia citriodora</i>	61
4.2.1. Taux d'humidité	61
4.2.2. Extraction des huiles essentielles du <i>Lippia citriodora</i>	62
4.2.2.1. Etude de l'influence du temps d'extraction et la période de récolte en HE sur le rendement.....	62
4.2.2.2. Etude de l'influence de la nature de la plante sur le rendement	63
4.3. Etude analytique de l'huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>	68
4.3.1. Caractéristiques organoleptiques	68
4.3.2. Les propriétés physico-chimiques	69
4.3.3. Analyse chromatographiques	70
4.4. L'étude de l'activité biologique	73
4.4.1. Etude de l'activité antioxydante	73
4.4.1.1. Méthode de DPPH	73
4.4.1.2. Méthode du FRAP	76
4.4. Etude de l'activité antibactérienne	78
4.4.1. Evaluation qualitative	78
4.4.1. Evaluation quantitative	81
Conclusion générale	84
Références bibliographiques .	

Introduction générale

Depuis la période préhistorique, les plantes ont été à la base de plusieurs thérapies. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie[1].

Un grand nombre de plantes, aromatiques, médicinales, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et en agriculture [2].

L'Algérie, possède une flore très riche et offre des conditions de développement de nouvelles exploitations agricoles des plantes médicinales et aromatiques. Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques, antioxydantes et antimicrobiennes demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues en médecine traditionnelles. Ces plantes représentent une nouvelle source de principes actifs. En effet, les métabolites secondaires font et reste l'objet de nombreux recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nombreux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles[2].

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries[3].

Dans le cadre de la valorisation des espèces végétales algériennes, et compte tenu des vertus thérapeutiques que représentent les Verbenaceae, nous nous sommes intéressés à l'extraction des huiles essentielles de *Lippia citriodora* provenant de la région de Miliana (W. Ain-Defla). La verveine (*Lippia citriodora*), herbe aromatique de la famille des Verbenaceae, appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, antidépressive, sédatrice, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle. Il nous semble donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche[4].

Notre choix est porté sur cette plante aromatique, car elle est très répandue en Algérie et largement utilisée en médecine traditionnelle. Notre étude est présentée en quatre chapitres. Le premier chapitre est réservé à la présentation de la matière végétale : *Lippia citriodora*. Le second chapitre sera consacré à l'étude des travaux antérieurs réalisés sur *Lippia citriodora*. Dans

Introduction générale

le troisième chapitre nous présentons le matériel et les méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail. Quant au quatrième chapitre nous présenterons les différents résultats obtenus et leurs discussions. Nous terminerons par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus et des recommandations.

1.1. Introduction

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ces rites religieux[5]. Les plantes sont capables de produire des substances naturelles très diversifiées. Elles accumulent des métabolites dits secondaires parmi lesquels, les huiles essentielles très utilisées par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire[6].

1.2. Les plantes aromatiques

Les plantes aromatiques appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles d'origine végétale, et constituent des sources de substances naturelles complexes, destinées à apporter des caractères organoleptiques particuliers aux aliments. Les plantes aromatiques fraîches, séchées, ou conservées peuvent servir à l'assaisonnement des mets et également donner naissance à des formes galéniques particulières que sont les extraits végétaux, les huiles essentielles ou les oléorésines[7].

1.3. Les plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses[8]. Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui possèdent une activité pharmacologique pouvant conduire à des utilisations thérapeutiques, grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain[9].

1.4. Classification des plantes médicinales et aromatiques

La classification des plantes peut se faire en fonction de nombreux intérêts[10]:

- Classification botanique (systématique).
- Classification thérapeutique (action physiologique).
- Classification chimique (nature du principe actif).
- Classification commerciale (intérêt commercial).

1.4.1. Systématique botanique de la plante

La systématique botanique est pour un chercheur la carte d'identification de la plante et sans cette dernière, il est très difficile d'entamer un travail de recherche[11]. La connaissance de l'origine botanique de la plante destinée à l'obtention de son huile essentielle est nécessaire aussi pour les applications futures, en parfumerie, en cosmétique, en pharmacie et même en agroalimentaire. L'identité de la matière initiale (plante ou partie de plante) est indispensable pour la traçabilité et pour éviter les éventuelles fraudes. L'identification est effectuée par le fournisseur qui doit présenter un certificat d'analyse, l'acheteur, quant à lui, devrait aussi faire les tests de confirmation[12].

1.5. La verveine (*Lippia citriodora*)

1.5.1. Généralités

La verveine est un arbrisseau cultivé dans les jardins, communément appelé ‘‘*Louiza* ou *Tizana*’. c'est dire combien la popularité de la verveine odorante est grande en Algérie. Cette plante ramifiée est caractérisée par un parfum très agréable rappelant l'odeur du citron, que ces feuilles et ses fleurs exhalent. La verveine peut atteindre 2m de haut, ses rameaux sont blanchâtres et ses feuilles lancéolées et rugueuses sont disposées en rosette par trois le long des tiges, au sommet des quelles apparaissent des gerbes de minuscules fleurs blanches disposées également par groupe de trois. Les feuilles récoltées avant la floraison et froissées dégagent une odeur citronnée agréable. Elles contiennent une huile essentielle composée de citral, de terpènes, de géraniol.

Originnaire d'Amérique du sud, la verveine odorante est cultivée sous les climats tempérés comme plante aromatique et ornementale ainsi que pour les feuilles, utilisées en phytothérapie, récoltées à la fin de l'été ; elle possède des propriétés similaires à celles de la mélisse. Le genre *Lippia* montre une grande diversité génétique, ce qui lui permet de synthétiser une variété de constituants de l'huile essentielle dans des plantes cultivées dans les différentes parties du monde [13].

1.5.2. Histoire

La littérature botanique montre une variété de noms, y compris *Lippia citriodora*, *L. triphylla*, *Verbena triphylla* et *Aloysia triphylla*. Un botaniste français publié une description en 1784, et un botaniste espagnol en 1785, en le nommant *Aloysia* en l'honneur de Maria Luisa,

princesse de Parme et épouse de Charles IV d'Espagne. En Amérique du Sud, les botanistes lui donnèrent le nom du genre Lippi, en mémoire d'un naturaliste italien d'origine française, Augustin Lippi, assassiné en Abyssinie en 1709[14].



Figure 1.1. La verveine (اللوزية).

1.5.3. Noms communs

Lippia vient du nom de Lippi, un botaniste du XVII^{ème} siècle; le terme *citriodora* signifie : “à odeur de citron”. Cette plante possède aussi les noms suivants: Verveine citronnelle, verveine à trois feuilles, thé arabe, herbe Louise[15]. La verveine odorante possède plusieurs nominations suivant les langues courantes de chaque pays[15-16]:

- Allemagne: Citronenkraut, Zitronenkraut, Zitronenverbene .
- France : Herbe-Louise, Verveine citronnelle, Verveine citronnée, Verveine du Pérou.
- Grande Bretagne : Lemonverbena, Herb Louisa, LemonBeebrush, LemonVerbena, Lemon-scentedVerbena.
- Italie: Cedrina, Cedronella, Erba-Luigia, Verbenaodorosa.

- Espagne: Cedrôn de! Peri, Cidrén, Hierba Luisa, Hierbacidrera .
- Nederland: Citroenkruid, Citroenverbena, Lemonverbena.

1.5.4. Classification de la verveine

La classification botanique de l'espèce *Lippia citriodora* est donné par le tableau 1.1.

Tableau 1.1. Classification botanique de l'espèce *Lippia citriodora* [17].

Règne	Plante
Division	Magnoliophyta
Sous règne	Trachéobionta
Sous classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Verbénacées
Genre	<i>Lippia</i>
Espèce	<i>Lippia citriodora</i>

1.5.5. Description de *Lippia citriodora*

La verveine odorante *Lippia citriodora* ou *Aloysia triphylla*.est un sous-arbrisseau de la famille des Verbenaceae, originaire d'Amérique du Sud, introduit et cultivé sur le pourtour méditerranéen (Midi de la France et Afrique du Nord). Il s'agit d'un arbrisseau ramifié dont les tiges anguleuses et cannelées portant des feuilles rudes, courtement pétiolées, verticillées par 3. Les fleurs disposées en épis possèdent 4 pétales - soudés à la base en un tube et étalés en 4 lobes bicolores : blancs sur la face externe et bleu violacé sur la face interne [18]. La verveine odorante est utilisée en herboristerie et en industrie de la parfumerie à cause de l'odeur de citron que dégagent les feuilles broyées. Les rameaux sont récoltés peu avant la floraison, rassemblés en bouquets puis séchés. Les feuilles séchées sont consommées en infusion[19].

1.5.6. Habitat et culture de *L. citriodora*

La verveine odorante est cultivée sous les climats tempérés comme plante aromatique et ornementale, ainsi que pour ses feuilles, utilisées en phytothérapie. Celles-ci sont récoltées à la fin de l'été. Elle s'accommode sur tous les types des sols et exige une quantité d'eau importante[20]. La verveine odorante s'acclimate d'un sol perméable, bien drainé et des endroits

ensoleillés ou semi- ombragés, abrités des vents froids. Elle exige un sol frais en été, sans excès d'humidité qui entraîne la pourriture de ses racines. Elle doit être paillée en hiver pour la protéger du gel, car elle ne supporte pas les températures inférieures à 4 °C[24].

1.5.7. Variétés et espèces

Il existe deux espèces de verveines utilisées en herboristerie qui font aujourd'hui partie de deux genres différents :

- La verveine commune (*Verbena officinalis*), plante inodore à feuilles opposées par deux .
- La verveine odorante (*Verbena triphylla* ou *Lippia citrodora*) encore appelée verveine citronnelle[21].

Tableau 1.2. Variétés de verveine[21].

Nom français	Nom latin	Principes actifs	Activités pharmacologiques	Partie concernée	Toxicité
Verveine	<i>Verbena officinalis</i>	Verbenalol	Eupeptique Antalgique Antispasmodique	Tiges + Feuilles	Antigonadotro- pique
	<i>Verbena triphylla</i>	Citral Z	Anti-inflammatoire Antinévralgique Antidépressive Sédative	Feuilles	/

1.5.8. Récolte et séchage de *L. citrodora*

La récolte est effectuée à la faucille et consiste à couper à 10-15 cm à partir du début des pousses de l'année. Il y a deux périodes de coupe :

- Mai-Juin : lorsque 50% des plantes ont fleuri ;
- Fin Juillet-Aout.
- Une troisième récolte peut avoir lieu 1 à 2 mois après la 2^{ième} récolte. Le rendement varie de 1,5 à 3 t/ha en verveine sèche pour les deux coupes. Une fois la récolte est effectuée, on procède au séchage des feuilles et à leur séparation des tiges [22].

1.5.9. Principaux pays producteurs et exportateurs de la verveine

- Les pays producteurs sont le Mexique, le Chili, le Brésil, le pourtour méditerranéen (Maroc, Algérie, Turquie, France et Israël), l'Afrique du sud et l'Inde.
- Les pays exportateurs sont le Chili, Israël et le Maroc [23].

1.5.10. Marché de *L. citriodora*

Le marché est réservé principalement pour la consommation en herboristerie mais aussi pour la production de l'huile essentielle. Le kilogramme de plante sèche varie de 5 à 10 euros. Celui de l'essence était d'environ 15 000 euros/kg. Actuellement il se situe entre 7 000 et 10 000 euros/kg en fret et de 12 000 euro/kg en Bio [25].

1.5.11. Composition chimique du *L.citriodora*

L'huile essentielle est constituée de plusieurs molécules chimiques de synthèse naturelle. Ces molécules sont différentes selon la nature de la plante, le sol, le temps de récolte, la partie de la plante, la préparation de l'échantillon, ainsi que la méthode d'extraction. Les composés sont formés à partir de divers atomes puisés par la plante via le sol et via sa synthèse organique. L'ensemble constitue des réactions chimiques donnant naissance aux molécules aromatiques, constituant l'huile essentielle. La composition chimique des extraits dépend largement de l'influence des conditions du mode d'extraction sur l'essence contenue dans la plante. Les extraits ainsi que de nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont constitués principalement de composés terpéniques. Les terpènes sont très répandus dans la nature et surtout dans les plantes comme constituants des huiles essentielles. Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique (tableau 1.3)[26].

Tableau 1.3.Principaux constituants des huiles essentielles de *L.citriodora*[23-24].

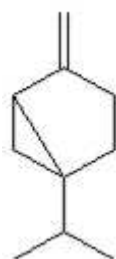
Monoterpènes	Limonène, Sabinène
Aldéhydes terpéniques	Géranial, néral, citronnellal

Alcools monoterpéniques	Nérol, α -terpinéol, géraniol
Sesquiterpènes	α -curcuméne, β -caryophylléne, bicyclogermacréne, β -curcuméne, germacréne
Sesquiterpénols	Spathuléol, Nérolidol
Esters terpéniques	acétate de géranyle
Oxydes terpéniques	1,8-cinéole, Caryophyllèneoxyde

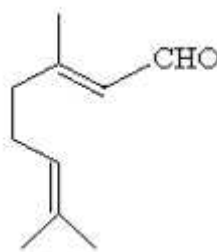
Les structures chimiques des composés identifiés dans les huiles de *L.citriodora* sont représentées par la figure 1.2.



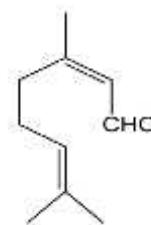
limonène



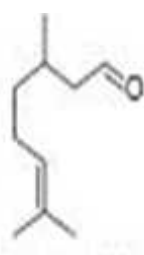
sabinène



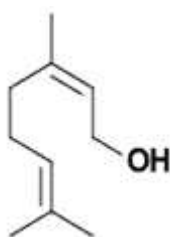
géraniol



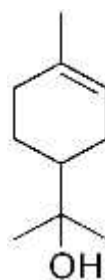
néral



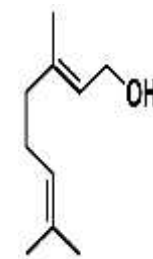
citronnellal



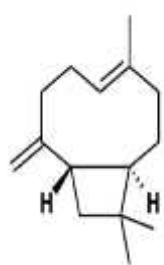
nérol



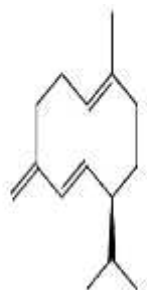
α -terpeneol



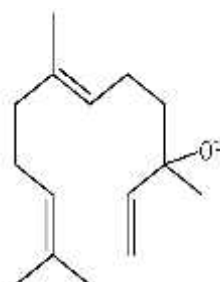
géraniol



β -caryophylléne



germacréne



nérolidol

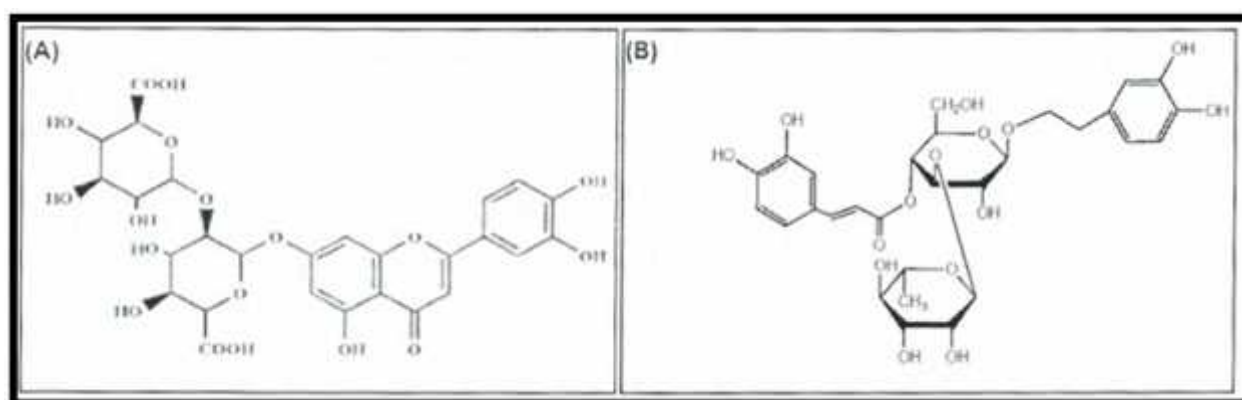


1,8- cinéole

Figure 1.2. Structures chimique des composés identifiés dans les huiles essentielles de la verveine.

1.5.12. Composition en polyphénols de l'infusé de *L. citriodora*

Bien que l'infusé de feuilles de la verveine odorante soit largement consommé, sa composition qualitative et quantitative en polyphénols est encore mal connue. Une première analyse de sa composition avait été réalisée au laboratoire par Carnat et al. Cette étude rapportent la présence dans l'infusé de flavonoïdes, principalement la lutéoline 7- diglucuronide, et de dérivés hydroxycinnamiques dont le principal est le verbascoside. Récemment, des études ont identifié dans l'infusion de verveine odorante, outre la lutéoline 7-diglucuronide et le verbascoside, des dérivés diglucuronidés d'apigénine et de chrysoériol ainsi qu'un isomère du verbascoside, l'isoverbascoside (figure1.3). Par ailleurs, l'instabilité du verbascoside et de son isomère à la chaleur a été soulignée. D'un point de vue quantitatif, la concentration en polyphénols de l'infusion de verveine odorante a été évaluée à 675 mg/L dont 24% de flavonoïdes et 76% d'acides phénoliques. La teneur des deux principaux constituants, lutéoline 7-diglucuronide et verbascoside, est respectivement de 100 mg/L et 500 mg/L[27].



1.5.13. Propriétés antioxydantes de l'infusé de *L. citriodora*

Etant plus de la composition en polyphénols de l'infusé de verveine odorante, certaines études se sont intéressées aux effets antioxydants de cet infusé. Des analyses menées in vitro à l'aide de différents tests ont permis de montrer les propriétés antioxydantes de l'infusé. L'infusé de verveine odorante et le verbascoside se sont révélés plus actifs que le trolox lors d'un test au DPPH. L'infusé a une forte activité de piégeage du radical superoxyde et une activité plus

modérée vis-à-vis du radical hydroxyle et de l'acide hypochloreux [28]. A forte concentration, un effet prooxydant a par ailleurs été rapporté. Un extrait de verveine odorante standardisé à 25% de verbascoside a montré une forte activité antioxydante dans un milieu lipophile, ce qui pourrait indiquer une capacité à piéger les radicaux libres au niveau des membranes biologiques. De même, cet extrait ainsi que le verbascoside lui-même inhibent la peroxydation lipidique in vitro. Ces effets antioxydants de la verveine odorante ont également été observés in vivo sur du plasma de rats ayant préalablement consommé un extrait de verveine odorante. Le pic plasmatique de concentration en verbascoside est corrélé à l'activité antioxydante plasmatique maximale évaluée par la détermination du MDA plasmatique, du FRAP et de l'activité SOD[29].

Ainsi, les propriétés digestives et antispasmodiques pour lesquelles l'infusé de verveine odorante est utilisé en médecine traditionnelle semblent être supportées par des propriétés antioxydantes marquées dues en partie, à la présence de divers composés polyphénoliques tels que le verbascoside ou la lutéoline 7-diglucuronide.

1.5.14. Usage de la verveine

1.5.14.1. Phytothérapie

Le genre *Lippia* (Verbenaceae) comprend environ 200 espèces d'herbes, arbustes et arbrisseaux. La plupart des espèces sont traditionnellement utilisées comme remèdes gastro-intestinaux et respiratoires. Les parties utilisées de la plante sont les feuilles, les parties aériennes et les fleurs. L'infusé de feuilles de verveine odorante est consommé traditionnellement dans l'ensemble de l'Amérique centrale et de l'Amérique du sud, en Afrique tropicale et dans certains pays européens comme traitement gastro-intestinal et sont considérées comme particulièrement efficace pour le traitement des douleurs stomacales et l'indigestion. La verveine odorante peut également être consommée pour ses propriétés antispasmodiques ainsi que pour lutter contre la fièvre. Les feuilles peuvent également être utilisées comme assaisonnement dans certaines préparations culinaires[20]. Elle est agréable à boire et s'emploie surtout dans les digestions difficiles, les indigestions, les ballonnements, les brûlures d'estomac [20,30]. La verveine odorante est également utilisée contre les états nerveux, les palpitations, les migraines, les bourdonnements d'oreille et les vertiges[30].

- Voie externe :

L'huile essentielle est également utilisée en compresses pour le soin de plaies difficiles à cicatriser[23].

- Voie interne :

En qualité de plante médicinale, elle est traditionnellement utilisée par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles digestifs (ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence) ainsi que dans le traitement symptomatique des états neuro-toniques des adultes et des enfants (états de nervosité, troubles mineurs du sommeil). L'infusion de 5 à 20 g de feuilles dans un litre d'eau est absorbée à raison de 2 à 5 tasses/jour, ce qui est équivalent de 3-6 gouttes d'huile essentielle, en 2 à 3 prises/j [23].

1.5.14.2.Alimentation

Les feuilles de verveine, fraîches et finement hachées, servent en petites quantités pour agrémenter des salades de fruits ou de légumes, les desserts, les sauces pour flans, les gâteaux, les crèmes aux œufs, les tartes aux fruits et les boissons rafraichissantes. Les feuilles séchées, ajoutées à une dose de sucre, lui confèrent un arôme agréable[23].

1.5.14.3.Parfumerie et cosmétique

Chapitre 2: Travaux antérieurs

2.1. Introduction

De nombreux travaux ont été effectués sur *Lippia citriodora* pour connaître la composition chimique, l'effet antioxydant et l'effet antibactérien. Nous présentons ci-après quelques-uns.

2.2. L'huile essentielle de la verveine algérienne

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

Selon Slimani.N (2014), les résultats obtenus dans l'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* sont présentés dans le tableau 2.1 [13].

Tableau 2.1. Principaux composés de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* analysée par CG/MS [13].

Composants	Aire (%)	Temps de rétention (min)
Citral	11.3	6.25
Limonène	10.6	7.46
4- Phényl undécane-4-ol	7.7	9.24
α -curcumène	6.5	10.15
α - Cédrol	4.5	12.68
Carvéol	3.7	14.00
Linalool	3.5	14.97
β caryophyllène	2.8	16.22
Acétate de géranyle	1.8	19.98

Les analyses d'huile essentielle de *Lippia citriodora* ont montré que le citral (11.3%), le limonène (10.6%), 4-phényl undécane- 4-ol (7.7%), α -curcumène (6.5%) et α -cédrol (4.5%) étaient les composants principaux de l'huile. En outre, d'autres composants à teneur légèrement faibles sont rapportés tels que le carvéol (3.7%), linalool (3.5%), β -caryophyllène (2.8%) et l'acétate de géranyle (1.8%) [13].

Dans une autre étude faite par Taleb-Toudert. K et al. (2002) sur *Lippia citriodora* pour identifier les composés constituant l'huile essentielle extraite.

Les résultats sont groupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 2.2. Composants majoritaires de *Lippia citriodora* révélés par CPG[17].

Composés		Teneur (%)
01	α pinène	1.1627
02	Camphène	0.0371
03	β pinène	2.5564
04	Limonène	15.1932
05	β phellandrène	2.1977
06	(Z)- β - ocimène	0.0219
07	(E)- β - ocimène	0.0472
08	Linalool	3.8233
09	Longifolène	5.4525
10	Myrtenal	0.2645
11	α -Humulène	1.1171
12	Carvone	1.1461
13	Verbénone	2.6403
14	r-cadinène	29.2081
15	Géraniol	0.1134
16	Cis- Carveol	1.3195
17	Globulol	0.1887
18	α -terpineol	0.4145

Les résultats de ce tableau montrent que les composants majoritaires de *Lippia citriodora* sont α -cadinène (29.2081%) et Limonène (15.1932%).

2.2.2. Propriétés organoleptiques d'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Les résultats des propriétés organoleptiques obtenus par l'étude de Taleb-Toudert.K et al. (2002) sur *Lippia citriodora* sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 2.3. Caractéristiques organoleptiques de l'HE de *Lippia citriodora* [17].

HE de <i>Lippia citriodora</i>	Caractéristiques organoleptiques			
	Aspect	Couleur	Odeur	Saveur
	Liquide mobile	Jaune	Agréable Citronnée	Douce

Ces caractéristiques sont en accord avec ceux reportées par Saidi.S (2014) qui ont analysé les huiles essentielles de *Lippia citriodora*.

2.2.3. Propriétés physico-chimiques d'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Selon Slimani.N (2014), les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* sont résumées dans le tableau ci-dessous [13].

Tableau 2.4. Propriétés physico-chimiques d'huile essentielle de *Lippia citriodora* [13].

HE de <i>Lippia citriodora</i>	Propriétés physicochimiques				
	La densité	L'indice de réfraction	Pouvoir rotatoire en (°)	L'indice d'acide (mg de KOH/g d'huile)	L'indice de peroxyde (mg/kg)
	0.902	1.479	-21.6	5.46	2.6
Norme AFNOR	0.890-0920	1.475-1.495	-22 à 12	/	/

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

2.2.4. Rendement en huile essentielle de *Lippia citriodora*

Le rendement enregistré de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation est déterminé par rapport à la matière sèche de *Lippia citriodora* (Tableau 2.5).

Tableau 2.5. Rendement en huile essentielle de *Lippia citriodora* par hydrodistillation [30].

Matière végétale	Rendement (%)
Les feuilles	0.22
	0.15
	0.21
	0.20

L'extraction de cet échantillon effectué par hydrodistillation a fourni un rendement moyen de (0,195 %) obtenus à partir de quatre extractions. Ce rendement est nettement plus faible que celui enregistré par Evelyn Ivana et al (2010) en étudiant *Lippia grandis* d'Amazon brésilienne et qui est de l'ordre de 2.1%. Dans une autre étude faite par Hmamouchi (2006), les rendements moyens en huiles essentielles des échantillons de *Lippia citriodora* sont présentés dans le tableau 2.6 [25].

Tableau 2.6. Rendement en huiles essentielles de *Lippia citriodora* [25].

Matière végétale	Plante entière fraîche	Feuilles fraîches	Feuilles sèches
Rendement en HE (%)	0,07- 0,1	0,15 - 0,2	0,4

Selon Taleb-Toudert.K et al (2002), le rendement en huile essentielle de *Lippia citriodora* atteint 0.35% pendant 4 h [17].

2.2.5. Les activités biologiques d'huile essentielle de *Lippia citriodora*

2.2.5.1. L'activité antioxydante

L'étude de Saidi.S (2014) donne une idée assez claire sur l'efficacité antioxydante de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* mise en évidence par la méthode de DPPH, cette efficacité s'est traduite par des pourcentages d'inhibition des radicaux libres atteints les 73% pour une concentration de 5mg/ml d'huile essentielle de cette plante; avec une concentration d'inhibition de 50 % des radicaux libres $IC_{50} = (0.0207 \pm 0.008 \text{ mg/ml})$ [30].

Les huiles essentielles de *Lippia citriodora* ont une forte activité antioxydante mise en évidence par la méthode d'ABTS, le pourcentage d'inhibition des radicaux libres atteint les 93% pour une concentration de 4 mg/ml d'huiles essentielles de cette plante avec un IC_{50} de l'ordre de $(0.13 \pm 0.007 \text{ mg/ml})$ [30].

2.2.5.2. L'activité antibactérienne

Cet effet a été évalué par l'appréciation des diamètres des zones d'inhibition induites par la présence simultanées des disques contenant de l'huile essentielle et des souches bactériennes testées. Les relevés sont groupés dans le tableau ci-dessous [17].

Tableau 2.7. Effet de l'huile essentielle sur la croissance de quelques souches pathogènes [17].

Souches utilisées		Résultats
Bactéries Gram négatif	<i>B. bronchiseptica</i>	D = 41mm Très forte activité
Bactéries Gram positif	<i>S.aureus</i>	D = 48mm Très forte activité
Organismes fongiques	<i>C.albicans</i>	D = 68mm Très forte activité
	<i>S.cerevisiae</i>	D = 90mm Inhibition totale

D'après Slimani.N (2014), l'étude de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de *Lippia citriodora* de la région d'Ain Defla étudié sur des souches des bactéries gram positif et gram négatif montre que cette l'huile possède une activité antibactérienne surtout contre le *S.typhi* et *Escherichia coli* [13].

Tableau 2.8. Diamètre des zones (en mm) de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* vis-a-vis des souches pathogènes après 24 heures d'incubation a 37°C [13].

Bactéries	<i>E.coli</i>	<i>S.typhi</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosae</i>	<i>Serratisp</i>	<i>H.pylori</i>
HE de <i>Lippia citriodora</i>	22±0.14	24.5±1.22	10.5± 0.23	9.5± 0.27	26± 0.02	14± 0.41	12.5± 0.5

Les huiles essentielles de *Lippia citriodora* ont un diamètre de zone d'inhibition de (24.5 mm) vis-à-vis de *S.typhi* et une zone d'inhibition importante a été trouvé avec *E.coli* est de (22 mm). Une activité moins importante a été enregistrée avec *P.aeruginosae* (26 mm), *Serratia sp* (14mm), *H.pylori* (12.5mm), *K.pneumoniae* (10.5mm), et *S.aureus* (9.5mm)

2.3. Les huiles essentielles de *Lippia citriodora* dans le monde

2.3.1. Composition chimique des huiles essentielles de *Lippia citriodora*

Depuis quelques années, un effort intense se développe dans le monde entier pour établir dans plusieurs pays la composition chimique de l'HE de la plante médicinale *Lippia citriodora*. Les résultats obtenus dans l'analyse de la composition chimique des différents pays sont présentés dans le tableau 2.9.

Tableau 2.9. Composition chimique de *Lippia citriodora* dans le monde.

Auteurs	[31]	[32]	[33]	[34]	[35]		
Pays	Maroc	Brésil	Paraguay	Iran	Colombie	Portugal	Turquie
1,6-Heptadien-4-ol	0.13	--	--	--	--	--	--
4-Phenyl undecan 4-ol	--	--	--	7.72	--	--	--
-Pinène	1.37	--	0,15	3.15	--	--	--
- Campholenal	3.38	--	--	--	--	--	--
Limonène	--	15.93	8,67	10.6	11.9	15.5	18.6
Neral	--	27.01	--	7.86	19	23.3	17.6
Citral	19.07	--	--	11.32	--	--	--
- Curcumène	--	--	3,43	6.54	--	--	--
1-Octèn-3-ol	--	0.70	0,17	--	--	--	--
Géranol	--	3.96	1,39	--	--	--	--
Géranial	--	--	22,80	--	38	29.5	11.9
- Terpeneol	--	--	0,05	4.06	--	--	--
Spathulenol	7.55	--	2,17	--	--	--	--
-Cédrène	0.95	--	0,49	1.02	--	--	--
Linalool	--	--	0,73	3.54	--	--	--
Caryophyllène	3.6	0.84	0,35	2.84	--	--	--
- Cedrol	--	--	--	4.54	--	--	--
Trans Caryophyllène	--	--	--	1.99	--	--	--

L'analyse de l'HE de *Lippia citriodora* du Maroc a révélé comme composé majoritaire : le Citral (19.07%).

Les analyses de l'HE des de *Lippia citriodora* du Brésil ont révélé plusieurs composés. Les composés majoritaires ont été le Neral (27.01%), et Limonène (15.93%).

Les analyses de l'HE de *Lippia citriodora* du Paraguay ont révélé plusieurs composés comme le Géranial (22.80%),et Limonène (8.67%).

Les analyses de l'HE des de *Lippia citriodora* d'Iran ont révélé plusieurs composés. Les composés majoritaires ont été le Citral (11.32%), et Limonène (10.6%).

Les analyses de l'HE de *Lippia citriodora* de Colombia, Portugal et Turquie ont révélé les composés suivants :

Colombie : Géraniol (38%),Nérol (19%) et Limonène (11.9%).

Portugal : Géraniol (29.5%),Nérol (23.3%) et Limonène (15.5%).

Turquie : Limonène (18.6%), Nérol (17.6%) et Géraniol (11.9%).

Dans une autre étude faite par Gomes.P et al. (2006), les composés constituant l'huile essentielle de *Lippia citriodora* sont présentés dans le tableau ci-dessous [36].

Tableau 2.10. Composition en pourcentage des principaux groupes de composés de l'HE des feuilles et les tiges d'*Aloysia triphylla* récoltés cinq fois plus d'un an [36].

Composés (groupe)	Année de récolte									
	20juillet 1999		14 sept 1999		17 nov, 1999		17 avril, 2000		7 juin, 2000	
	Feuilles	Tiges	feuilles	tiges	feuilles	tiges	feuilles	Tiges	Feuilles	tiges
Hydrocarbures monoterpéniques	13.7	4.8	8.5	10.9	12.1	7.4	12.3	7.3	13.7	9.5
Monoterpènes oxygénés	65.8	69.0	67.7	70.4	67.4	59.7	65.9	72.9	64.0	60.6
- oxydes	1.3	0.6	0.8	0.5	2.0	1.2	1.4	0.6	2.2	1.5
- alcools	1.0	2.8	0.7	3.2	0.9	3.8	0.7	4.1	0.5	2.1
- aldéhydes	62.6	64.3	65.3	64.3	63.3	50.0	62.5	64.8	60.1	55.5
- esters	0.9	1.3	0.9	2.4	1.2	4.7	1.3	3.4	1.2	1.5
Hydrocarbures sesquiterpéniques	12.4	16.1	16.2	13.0	10.9	16.7	15.3	12.8	15.4	14.9
Sesquiterpènes oxygénés	3.1	3.3	2.0	1.8	7.0	6.2	1.9	2.2	4.7	3.5
n-Alcanes	0.1	2.6	0.3	1.3	0.2	5.6	0.3	1.2	0.2	3.1

Les résultats des analyses révèlent que la composition chimique de l'HE d'*Aloysia triphylla* est riche en monoterpènes oxygénés et en hydrocarbures sesquiterpéniques.

D'après Noorkhoda.Y et al. (2013), les analyses ont permis de mettre en évidence les composés d'HE de la plante présentée selon la région, et la partie de la récolte dans le tableau 2.11.

Tableau 2.11. Les principaux composants de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* récoltés de divers pays [37].

Région	Partie de la récolte	Principaux composés
Iran	Feuilles et fleur	1,8 cineole, limonène, géraniol, néral, -guaiène, spathulenol, oxyde caryophyllène
	Partie aérienne	E-citral, géraniol, néral, limonène, oxyde caryophyllène, spathulenol, curcumen, bornéol, acétate de néryle β -caryophyllène, camphre, carvacrol, p-cymène
Portugal	Feuilles et fleur	Géraniol, néral, limonène
Afrique du sud	Partie aérienne	Citral (E, Z), bornéol, camphre, l'acétate de néryl, β caryophyllène, oxyde caryophyllène, p-cymène
Burkina Faso	Feuille et fleur	Feuilles : thymol, p-cymène, propionate-2-phényl-éthyle Fleurs : elemène, cinnamate d'éthyle, -amorphène, pipéritol

D'après les résultats rapportés dans le tableau ci-dessus, nous constatons que :

La majorité des constituants des huiles essentielles d'Iran et Afrique du sud extraites à partir des parties aériennes sont : E-citral, bornéol, camphre, l'acétate de néryl, caryophyllène, oxyde caryophyllène, p-cymène, les composés de l'HE du Portugal extraites à partir des feuilles et des fleurs sont : Géraniol, néral, limonène. Cette différence des composés est peut-être due aux plusieurs facteurs, la région, ainsi que la partie de la récolte.

2.3.2. Propriétés organoleptiques d'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Les caractéristiques organoleptiques de l'HE extraite à partir des feuilles de *Lippia citriodora* sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2.12. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* du Maroc et Paraguay.

HE de <i>Lippia citriodora</i>		Caractéristiques organoleptiques		
		Aspect	Couleur	Odeur
Maroc	[38]	Liquide mobile, limpide	Jaunâtre plus ou moins foncé	Citronnée
Paraguay	[33]	Liquide fluide et limpide	Jaune ambré	Citronnée

2.3.3. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* de certains pays sont résumées dans le tableau ci-dessous

Tableau 2.13. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* du Maroc et Paraguay.

HE de <i>Lippia citriodora</i>		Propriétés physico-chimiques		
		Température 20 °C		
		Densité	Indice de réfraction	Pouvoir rotatoire
Maroc	[38]	0,891	1,483	- 23,2°
Paraguay	[33]	0.897	1.485	--

Les résultats de ce tableau montrent que les propriétés physico-chimiques d'huile essentielle de *Lippia citriodora* du Maroc et Paraguay sont presque égales.

2.3.4. Les activités biologiques d'huile essentielle de *Lippia citriodora*

2.3.4.1. L'activité antioxydante

L'activité antioxydante des huiles essentielles de *Lippia citriodora* a été testée par le piégeage des radicaux DPPH et les dosages de pouvoir réducteur FRAP.

Le piégeage des radicaux DPPH est une méthode couramment utilisée pour évaluer la capacité des extraits des plantes pour piéger les radicaux libres générés à partir du réactif DPPH. Les activités de piégeage des radicaux DPPH de l'huile essentielle et de la substance de référence (l'acide ascorbique et α -tocopherol) sont présentées dans la Figure 2.1 [31].

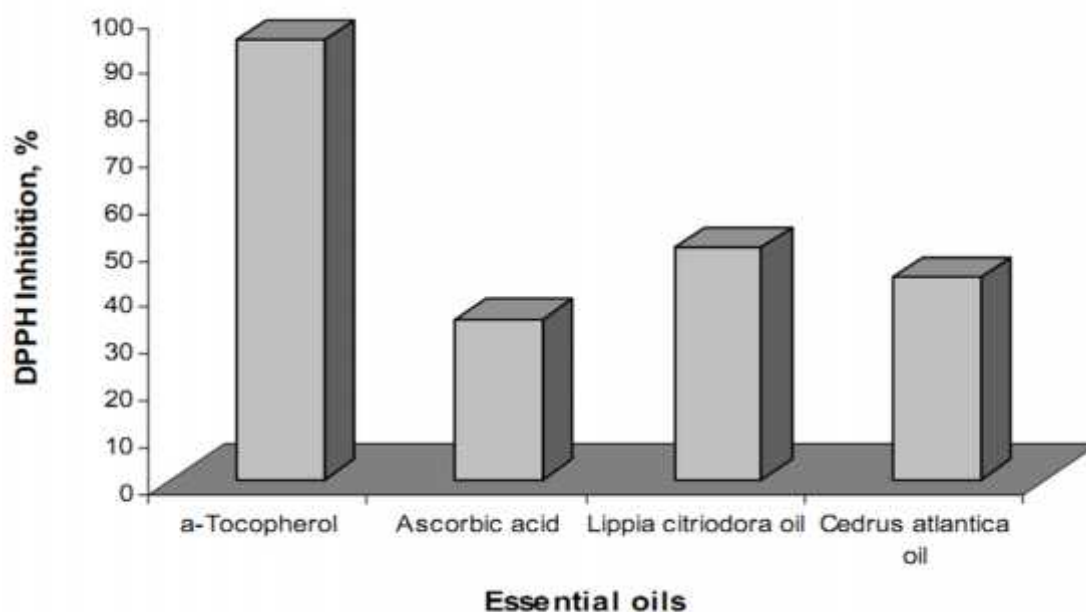


Figure 2.1. Activité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* par la méthode du DPPH [31].

Le pouvoir réducteur d'un composé sert d'indicateur importante de son activité antioxydante. Il a été largement accepté que plus l'absorbance à 700 nm, plus grande est la puissance réductrice.

Dans cette étude, la capacité de l'huile essentielle, et α -tocophérol à titre de témoin positif, afin de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} a été déterminée. Comme on peut le voir sur la figure 2.2, réduisant la capacité des huiles essentielles et α -tocophérol augmentait avec la concentration croissante, et

comme prévu, le pouvoir réducteur des huiles essentielles est inférieure à α -tocophérol, qui est connu pour être un agent réducteur fort. L'activité antioxydante mesurée avec le test ferrique de pouvoir réducteur (Figure 2.2) a révélé des résultats similaires à ceux obtenus avec la technique DPPH. Les activités antioxydantes les plus élevés ont été obtenus pour l'huile de *L.citriodora*, qui a également indiqué que leur potentiel en tant que donneurs d'électrons à piéger les radicaux libres [31].

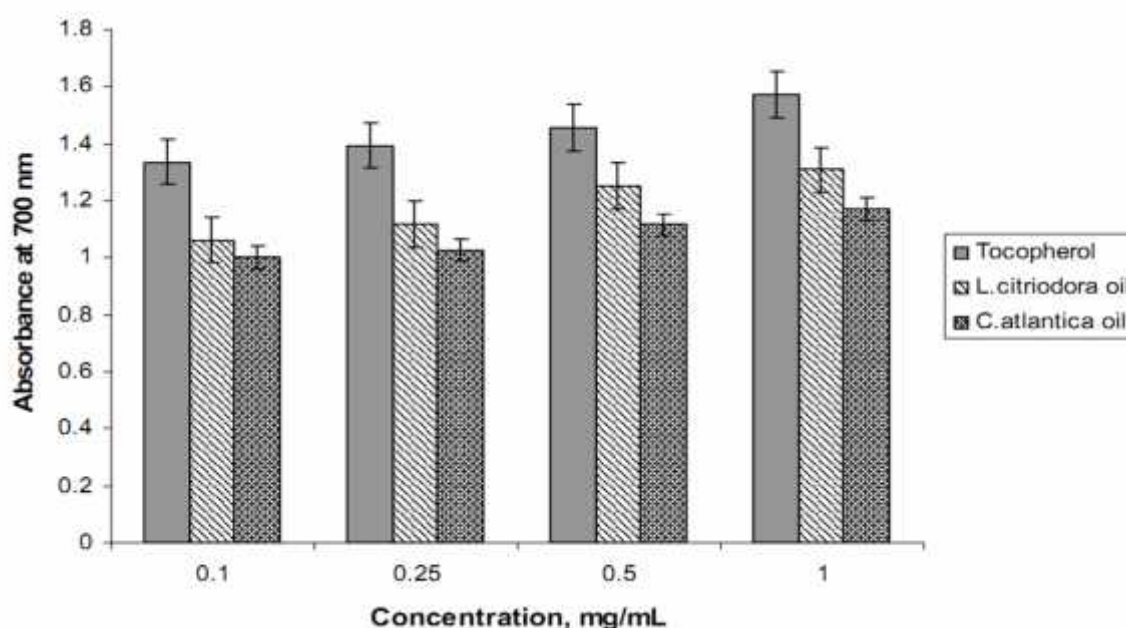


Figure 2.2. Activité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* par la méthode de FRAP[31].

2.3.4.2. L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne in vitro de la verveine et les micro-organismes employés évaluées par le plus long du diamètre des zones d'inhibition. Selon le résultat donné dans le tableau 2.14 de l'HE a montré une activité antibactérienne intéressante contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Aucune activité antibactérienne n'a été observée contre *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, et *Escherichia* [39].

Tableau 2.14. Les activités antibactériennes de l'huile essentielle contre les microorganismes [39].

Groupe microbienne	Souche indicatrice	L'activité antimicrobienne d'HE
Bactéries Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i>	++++
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	++
Bactéries Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
	<i>Salmonella typhi</i>	-
Champignon	<i>Phanerochaete chysporium</i>	+
	<i>Trichoderma reesei</i>	+
	<i>Trichoderma viride</i>	-
Levure	<i>Candida albicans</i>	+++

Les activités antimicrobiennes ont été exprimées des zones d'inhibition de diamètre en millimètres (mm) :

- (négatif) = 0 mm ; + (faible) = 1- 4 mm ; ++ (modérée) = 5-10 mm ; +++ (forte) = 10-15 mm et ++++ (Très forte) = 16 mm.

Les huiles essentielles obtenus à partir de plante de culture au Maroc ont été contestées contre les bactéries Gram-négatif commun (*Escherichia coli*) et (*Staphylococcus aureus*) et des bactéries Gram-positifs associés à une intoxication alimentaire. L'objectif était d'évaluer leurs propriétés antibactériennes par la présence ou l'absence des zones d'inhibition, diamètre de la zone, et les valeurs de CMI. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous [31].

Tableau 2.15. Les zones d'inhibition de croissance (mm), la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE de *Lippia citriodora* [31].

HE	Bactéries	Diamètres d'inhibition	CMI
<i>Lippia citriodora</i>	E.coli	22.0±0.0	0.500
	S.aureus	17.0±0.0	1

Dans le cas de la souche *E.coli*, l'huile essentielle a provoqué un diamètre d'inhibition de $22,0 \pm 0,0$ mm, et dans le cas de *S. aureus* un diamètre d'inhibition de $17,0 \pm 0,0$ mm.

2.3.4.2. L'activité insecticide

L'étude de Khani.A et al. (2012), donne une idée sur l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*. Les résultats indiquent que l'huile était significativement plus toxique contre *C. maculatus* que *T. confusum*, comme déduit par les intervalles de CL_{50} (tableau 2.16) [34].

Tableau 2.16. Efficacité de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* contre *Tribolium confusum* et *Callosobruchus maculatus* [34].

Insectes	CL_{50}
T. confusum	497.83 (445.9-560.6)
C. maculatus	10.17 (8.89-11.83)

D'après les résultats de CL_{50} (tableau 2.16) bien que l'huile de *Lippia citriodora* affiché une forte activité insecticide contre *C. maculatus* ($CL_{50} = 10,2 \mu\text{l/l}$), mais révélé une activité médiocre contre *T. confusum* ($CL_{50} = 497,8\mu\text{l/l}$). Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle de *Lippia citriodora* pourrait être utilisée comme un agent de contrôle potentiel contre les insectes [34].

3.1. introduction

La première partie de notre travail a été consacrée à l'extraction des huiles essentielles de la plante *Lippia citriodora* et à l'étude de ses propriétés physico-chimiques, aussi l'étude des différents paramètres influençant le rendement. Cette partie a été réalisée au niveau des laboratoires de génie des procédés de la faculté des sciences et de la technologie à l'université de Khemis Miliana. La deuxième partie a été conduite pour l'étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite. Elle a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie de la faculté des sciences de la nature et de la terre l'université jilali Bounaama de Khemis-Miliana. L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyse médicale privée de Dr.Zibouche de Ain Defla.

3.2.Extraction des huiles essentielles de *Lippia citriodora*

3.2.1.Zone d'étude

La plante étudiée *Lippia citriodora* appartient à la famille des Verbenaceae. Elle a été récoltée au niveau de la région de Miliana, W. Ain Defla (Figure 3.1,Tableau 3.1).



Figure 3.1. Situation de zone d'étude.

Tableau 3.1. Les caractéristiques géographiques de la région de récolte de la plante.

Région	Miliana
Altitude	400 - 1000 m
Latitude	36° 17' N
Longitude	2° 13' O

3.2.2. Matériel végétal

La verveine utilisée dans cette étude, a été identifiée par Mr Kouache Benmoussa Maître Assistant au niveau de la faculté des sciences de la terre et de la nature à l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana.

La période de récolte s'étale du mois de septembre 2013 à septembre 2014 et le mois de Mai 2015. L'extraction des huiles essentielles est réalisée à partir des feuilles fraîches et sèches à l'air libre et à l'ombre à température ambiante.



Figure 3.2. La verveine : a : feuilles fraîches, b : parties aériennes, c : feuilles sèches.

3.2.3.1 Extraction par hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation a été effectuée dans un appareil de type Clevenger au niveau du laboratoire de génie des procédés à l'Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana.

❖ Principe

Le principe de l'hydrodistillation consiste à immerger la matière végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange qui est condensé dans un réfrigérant. Par conséquent les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Les eaux aromatiques ainsi prélevées sont ensuite recyclées dans l'hydrodistillateur par le cohobage. La durée de l'hydrodistillation pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter.



Figure 3.3. Montage d'hydrodistillation.

Le montage de l'hydrodistillation comprend essentiellement les parties suivantes :

- Ballon : Sert à contenir la matière végétale émergée dans l'eau distillée.

- Réfrigérant : C'est un échangeur de chaleur servant à convertir toute vapeur en liquide provenant du ballon.

- Cohobe: colonne de recyclage de l'eau aromatique.

❖ Mode opératoire

La matière végétale *Lippia citriodora* est placée dans un ballon avec de l'eau distillée. En chauffant, l'eau s'évapore ainsi que les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, la vapeur condensée obtenue à travers un réfrigérant conduit à une phase organique « huile essentielle », séparée de l'hydrolat par décantation. Le volume d'essence obtenue est noté pour le calcul du rendement. Les mêmes conditions opératoires ont été appliquées sur l'extraction de l'HE de la verveine par hydrodistillation[40].

Tableau 3.2. Conditions opératoires de l'extraction des HE par HD.

Mois de récolte	Partie recueilli	Etat de MV	M _{MV} (g)	V _{eau distillé} (ml)
Septembre 2013	Feuilles	Sèches	30	550
Septembre 2014				
Mai 2015	Feuilles	Fraiches		
		Sèches		
		Sèches broyé		
	Parties aériennes	Fraiches		

3.2.3.2. Extraction par induction électromagnétique

L'extraction des huiles essentielles par induction électromagnétique a été réalisée au niveau du laboratoire de génie des procédés à l'Université djilali bounaama de Khemis Miliana.

❖ Principe

Le chauffage par induction est une application directe. Tout conducteur parcouru par un courant périodique crée un champ magnétique, qui engendre des courants induits dans un autre conducteur (récipient). Ce courant induit provoque dans la paroi métallique du distillateur des courants qui vont produire de la chaleur par effet Joule[41]. Le montage de l'induction électromagnétique comprend essentiellement trois parties :

- l'extracteur (cocote minute) : il sert à contenir la matière végétale immergée dans l'eau distillée.
- Réfrigérant : c'est un échangeur de chaleur servant à convertir toute vapeur en liquide provenant de l'extracteur.
- Ampoule à décanter.



Figure 3.4. Montage de l'extraction assisté par induction électromagnétique.

❖ Mode opératoire

L'eau et la matière sont introduites dans l'extracteur (le récipient métallique), l'ensemble est ensuite porté à l'ébullition. La vapeur condensée obtenue est récupérée dans une ampoule à décanter, suivie par l'ajout d'une solution aqueuse saturée en NaCl (son volume doit représenter environ 1/3 celui du mélange à traiter). On laisse décanter jusqu'à l'application franche des deux phases. Le volume de l'huile essentielle obtenue est noté pour le calcul du rendement .

Tableau 3.3. Conditions opératoires de l'extraction par IEM.

Période de récolte	Mai 2015
Région de récolte	Miliana
Partie recueillie	Les feuilles
Etat de MV	Sèche
M_{MV} (g)	200
$V_{\text{eau distillé}}$ (ml)	3000

3.3. Détermination du taux d'humidité

Pour la détermination de taux d'humidité de la plante, une prise d'essai de 235g de feuilles de *Lippia citriodora* est disposée pour être séchée à l'air libre. L'échantillon est pesé quotidiennement jusqu'à ce que sa masse m_1 devienne constante. La différence entre m_1 et m_0 représente la quantité d'eau contenue initialement dans l'échantillon utilisé

Le taux d'humidité est estimé par la formule suivante :

$$H (\%) = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100 \quad 3.1$$

m_0 : masse de l'échantillon « à état frais en g ».

m_1 : masse de l'échantillon « après séchage en g ».

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

3.4. Influence de la durée d'extraction sur le rendement

Pour étudier l'influence de la durée d'extraction sur le rendement en huile essentielle. Nous avons choisi les durées d'extraction allant de 20 à 120 min avec un pas de 20 min.

3.5. Calcul du rendement

Le rendement des HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'essence obtenue et la masse de la matière végétale sèche utilisée [43].

$$R_{HE} (\%) = (M_{HE} / M_S) \times 100 \quad 3.2$$

R_{HE} : Rendement en HE (%).

M_{HE} : masse d'HE récupérée exprimé en g.

M_S : la quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

3.6. Caractéristiques des huiles essentielles

Afin d'évaluer la qualité et la composition des huiles essentielles extraites lors de cette étude, des analyses ont été menées pour déterminer leurs propriétés organoleptiques et physico-chimiques, ces propriétés constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE[44]. De plus, des analyses quantitatives et qualitatives ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

3.6.1. Étude des propriétés organoleptiques

Chaque huile essentielle est caractérisée par ces caractères organoleptiques tels que : l'odeur, l'aspect physique et la couleur[45,46].

a. L'odeur

L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habilité des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parvient à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'à dix millièmes de grammes par litre d'air.

b. La couleur

La couleur de l'huile essentielle peut être déterminée à l'œil nu, sauf en présence d'une solution étalon, on peut l'utiliser pour évaluer le degré de ressemblance entre la couleur du produit étalon et celle de l'huile essentielle.

c. L'aspect physique

L'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent, cette essence peut apparaître sous forme solide, liquide ou semi-solide.

3.6.2. Étude des propriétés physico-chimiques

Aujourd'hui, les propriétés physico-chimique (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, indice d'acide, indice d'ester) sont exigées pour leur évaluation commerciale[47].

3.6.2. 1. Les propriétés physiques

❖ Détermination de l'indice de réfraction

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé Prisma-CETI convexe. Le produit étalon de qualité pour la réfractométrie servant à ajuster le réfractomètre est l'eau distillée (1,333). Quand la détermination est réalisée à une température différente de 20 °C, on effectue la correction à 20 °C par le biais de la formule suivante :

$$I_{20} = I_T + 0,00045 (T - 20 \text{ °C}) \quad 3.3$$

I_{20} : indice à 20 °C.

I_T : indice à la température ambiante.

T : température ambiante.

❖ Détermination du pH

Le pH exprimé par une valeur numérique, indique si une solution est acide ou basique, il représente aussi la concentration en ions hydrogène d'une solution aqueuse[49]. La détermination du pH est effectuée à l'aide d'un papier pH au lieu d'un pH-mètre en raison de l'insuffisance du produit (huile essentielle) .

3.6.2. 2. Les propriétés chimiques

❖ Détermination de l'indice d'acide

L'indice d'acide (I_A), est le nombre de milligrammes d'hydroxyde d'acide de potassium nécessaires à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

•Principe

Le principe consiste à neutraliser des acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.

•Réactifs

Au cours de l'analyse on utilise uniquement des réactifs de qualité reconnus.

- Ethanol, à 95 % (v/v) à 20 °C,
- Hydroxyde de potassium, KOH (0.1 mol/L),
- Phénolphtaléine (indicateur coloré), à 2 g/L dans de l'éthanol.

•Détermination

Introduire la prise d'essai 0.5 gr, dans la fiole. Ajouté 5 ml d'éthanol et 5 gouttes de solution de phénolphtaléine comme indicateur, et neutraliser le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium contenue dans la burette. Réserver éventuellement le ballon et son contenu (A) pour la détermination de l'indice d'ester. L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$I_A = 5.61 (v / m) \quad 3.4$$

v : volume (mL) de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée.

m: masse (g) de la prise d'essai.

❖ Détermination de l'indice de saponification

L'indice de saponification (Is), est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et la saponification des esters présents dans un gramme d'huile essentielle.

•Principe

On hydrolyse les esters par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium, et le dosage de l'excès d'alcalin par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

•Réactifs

- Solution provenant de la détermination de l'indice d'acide.
- Hydroxyde de potassium (0.5 mol/L).
- Phénolphtaléine (indicateur coloré), à 2 g/L dans l'éthanol.
- Acide chlorhydrique (0.5 mol/L).
- L'eau distillée.

•Détermination

Dans un ballon, on introduit la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide, on ajoute 25 mL de la solution d'hydroxyde de potassium (0.5 mol/L). On adapte le tube en verre ou un réfrigérant et on place le ballon sur le bain d'eau bouillant et on les laisse pendant 1 h. On laisse refroidie puis on démonte le tube et on ajoute 20ml d'eau puis 5 gouttes de la solution de phénolphtaléine. On titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique. L'indice de saponification I_S est donné par la formule suivante:

$$I_S = 28.05 \times ((v_0 - v_1) / m) \quad 3.5$$

v_0 : volume (mL) de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc

v_1 : volume (mL) de la solution d'acide chlorhydrique utilisé

m : masse (g) de la prise d'essai.

❖ Détermination de l'indice d'ester

L'indice d'ester (I_E) est le nombre en milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'HE. L'indice d'ester est donné par la relation suivante:

$$I_E = I_S - I_A \quad 3.6$$

3.7. Caractérisation des huiles essentielles extraites

L'analyse des huiles essentielles de nos échantillons a été réalisée au Laboratoire de Chimie Générale et Organique, Département Agro Bio Chem, Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech(Belgique).

3.7. 1. Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Le spectromètre de masse, Agilent 5973 à quadripole est couplé à un chromatographe en phase gazeuse Agilent 6890. La colonne utilisée est identique à celle mentionnée ci-dessus. Les conditions opératoires sont :

- La température de l injecteur en mode splitless : 250 °C.
- La programmation de température : de 40 °C à 250 °C à raison de 6 °C/min.
- Le gaz vecteur : He à 1 ml/min (vitesse linéaire moyenne = 36 cm/sec).

Les températures de la source et du quadripole sont fixées à 230 °C et 150 °C respectivement; énergie d ionisation 70 eV, gamme de masse : 35 à 400 uma. L identification des différents constituants est réalisée à partir de leurs spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standards de la banque de données informatisées (Wiley 275.L, Adams, 2001). Pour les hydrocarbures terpéniques diverses confirmations sont obtenues par comparaison des spectres de masse et de leurs indices de rétention selon Kovats donnés par la littérature (Joulain, König, 1998 ; Adams, 2001)[53,54].

3.8.Evaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants peuvent être définis en tant que composés qui empêchent ou retardent l'oxydation des substances biologiques en empêchant le déclenchement ou la propagation des réactions en chaîne d'oxydation. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs[55].Les radicaux libres se définissent comme tout atome ou molécule, neutre ou ionisée, comportant au moins un électron célibataire dans une orbitale externe. Ils sont caractérisés par une grande réactivité chimique et une courte durée de vie. Leurs agressions sur l'organisme sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, de la pollution, du soleil et d'un effort physique intense[56, 57].

L'activité antioxydante des extraits végétaux (huiles essentielles) traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante:

- DPPH ou (2,2-diphényl-1- picrylhydrazyl).
- FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power) ou pouvoir réducteur.

3.8.1.Méthode du DPPH

La méthode de réduction du DPPH• a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de la verveine.

•Principe

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazone (DPPH•) est un radical organique stable de couleur rouge pourpre. En présence des composés antiradicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance.

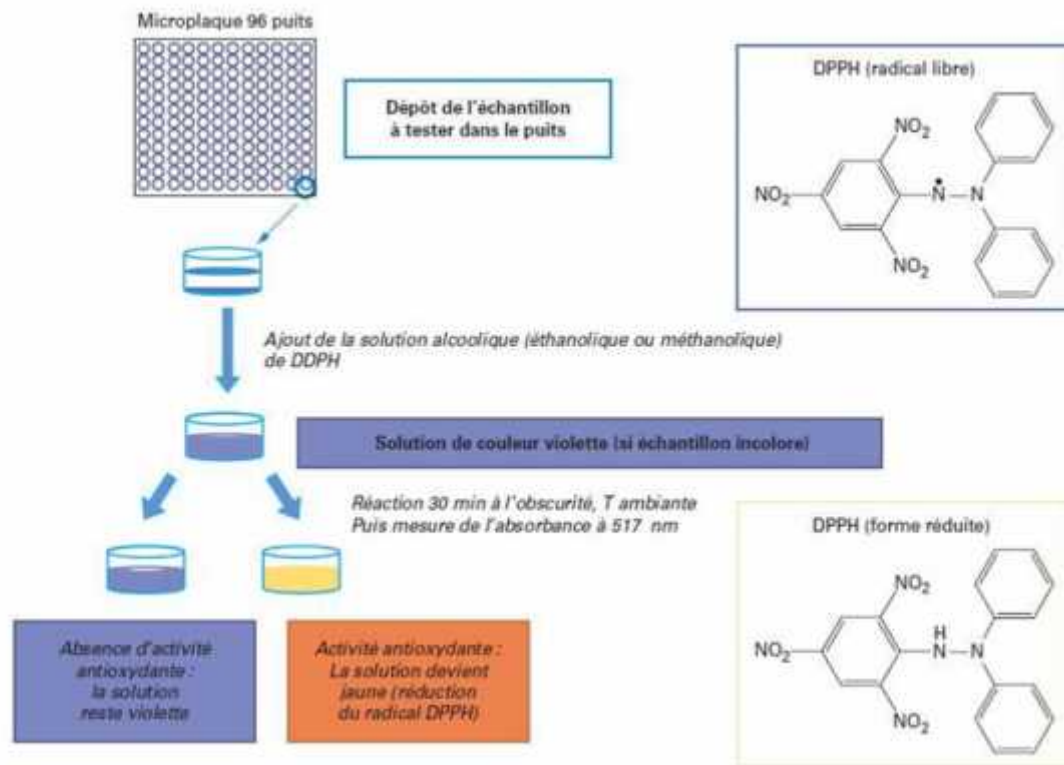


Figure 3.5. Représentation schématique du test au DPPH.

•Mode opératoire

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle extraite a été mesurée par la méthode décrite par Archana et al. [58].

50µl de différentes dilutions d'huiles essentielles (2.5, 5 , 7.5 , et 10 mg/ml) ont été mélangés avec 2 ml de la solution d'éthanol de DPPH dans des tubes à essai secs. Et après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm à l'aide de spectrophotométrie UV-visible.

- Le contrôle négatif est composé de 50µl d'éthanol et de 2 ml de la solution de DPPH•.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'absorbance de l'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'huile essentielle.

L'activité antiradicalaire est exprimée par le pouvoir de réduction de la solution de méthanol de DPPH• qui est déterminé par l'application de la formule suivante:

$$PR = (A_C - A_E) / A_C \cdot 100 \quad 3.7$$

PR : pouvoir de la réduction en %.

A_E: absorbance de la solution de DPPH• en présence de l'huile essentielle.

A_C: absorbance de la solution de DPPH• en absence de l'huile essentielle.

Le IC₅₀: Il correspond à la concentration efficace d'antioxydant nécessaire pour faire disparaître 50% de DPPH• Initial. Plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant [56].

3.8.2.Méthode du Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP)

- **Principe**

La méthode Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP) est basé sur la réaction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺) en présence d'un antioxydant qui agissent en tant que reductant dans ce cas alors, la couleur jaune de la solution d'essai change en vert selon la puissance de réduction de l'extrait. Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés (les huiles essentielles)[59].

- **Mode opératoire**

Dans six tubes à essai contenant 01 ml de solution d'échantillon (les dilutions suivantes 2,5 - 5 - 7,5 - 10 mg/ml) ont été ajoutées, 1 ml de tampon phosphate (0,2M- pH 6,6), puis 1 ml de potassium hexacyanoferrate [K₃ Fe (CN)₆](1%).L'ensemble est incubé à 50°C pendant 20 minutes. Un volume de 1 ml d'acide trichloracétique TCA (10%) est ensuite ajouté. Le mélange est centrifugé, puis 1 ml du mélange est ensuite prélevé. On ajoute ensuite 1,5 ml d'eau distillée et 150 µl de FeCl₃ (0.1%) fraîchement préparé dans l'eau distillée. La lecture est faite à 700 nm. La plus grand absorbance du mélange de la réaction indique une possibilité d'augmentation de la réduction l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺). Le blanc est préparé, dans les mêmes conditions, en remplaçant 1mL d'échantillon par 1mL d'éthanol[60].

IC₅₀: C'est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5. Elle est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

3.9.Evaluation de l'activité antibactérienne

Les huiles essentielles ont un spectre d'action antibactérienne très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne et antifongique est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs. Ce qui nous a amené à évaluer l'activité de notre huile essentielle de *Lippia citriodora* .

3.9.1. Les souches bactériennes testées

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* sont les suivants :

- Trois souches bactériennes provenant du laboratoire de microbiologie du laboratoire médicale privé d'Ain Defla: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *pseudomonas aeruginosa*.
- Nous avons utilisé un seul type de levure de référence, à savoir *Candida albicans*. Ils ont tous été fournis par le laboratoire de microbiologie, laboratoire médical privé à Ain Defla.

Tableau 3.4. Les souches bactériennes testées.

Souches	Gram	Famille	Source
<i>Escherichia coli</i>	-	Enterobacteriaceae	L.A.M.Z
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Pseudomonadaceae	L.A.M.Z
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Micrococcaceae	L.A.M.Z
<i>Candida albicans</i>	/	Saccharomycetaceae	L.A.M.Z

3.9.2. Conservation des souches

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

3.9.3. Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la réalisation des tests antimicrobiens sont les suivants :

- La gélose nutritive (GN) pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton (M-H) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux huiles essentielles extraites de notre plante.
- La gélose Sabouraud pour l'isolement et l'entretien de la levure et l'étude de sa sensibilité aux huiles essentielles.

3.9.4. Préparation des pré-cultures

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive. Après 18h d'incubation à 37°C pour chaque microorganisme, des suspensions microbiennes d'une densité optique de 1 McFarland ont été préparées, pour chaque microorganisme dans 10 ml d'une solution saline d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl).

3.9.5. Essais antibactériennes

Pour l'évaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* nous avons utilisé la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier.

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des germes pathogènes vis-à-vis de notre extrait brut.

3.9.5.1. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de *Lippia citriodora*

La technique utilisée, pour évaluer l'activité antibactérienne de notre HE, est l'aromatogramme ou la méthode de diffusion en milieu gélosé [61,62]. Cette méthode permet d'évaluer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle ou de produit à base d'huiles essentielles.

- La gélose appropriée est coulée dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre.
- Chaque souche a étéensemencée par inondation sur ces boîtes pétris contenant le milieu Mueller-Hinton (M.H.A) pour les bactéries et Sabouraud pour les levures.

- La surface des boîtes est séchée sous l'aire libre avec le couvercle des boîtes légèrement ouvertes.
- Des disques de papier Whatman stérile 9 mm de diamètre sont imprégnés de 20 µl d'huile essentielle de *Lippia citriodora*, puis déposés à la surface des géloses ensemencées avec les différentes souches bactériennes, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures[63].
- Dès l'application des disques imprégnés, l'extrait diffuse de manière uniforme et après 24 h d'incubation, la présence autour des disques d'une zone d'inhibition circulaire dans laquelle il n'y a pas de croissance de micro-organismes dénote la sensibilité de ceux-ci à cet extrait. Plus la zone d'inhibition mesurée est grande, plus le germe est sensible.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique est calculé par la formule suivante:

$$\% \text{ Inhibition} = (D_{\text{test}} / D_{\text{control}}) \times 100 \quad \mathbf{3.8}$$

D_{test} : diamètre de la zone d'inhibition.

D_{control} : diamètre de la boîte de pétri.

3.9.5.2. Évaluation quantitative de l'activité antibactérienne d'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentrations d'extrait dans un solvant. 200 µl d'huile essentielle est diluée dans 200 µl de Tween80, puis une série de dilutions est réalisée extemporanément en tween80, à partir de la solution-mère. La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à: $C_{1/2}$ - $C_{1/4}$ - $C_{1/8}$ et $C_{1/16}$. Des disques de papier Whatman stérile de 9 mm de diamètre sont imprégnés de 20 µl des différentes dilutions, puis déposés à la surface des géloses ensemencées avec les différentes souches bactériennes, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures. Pour cette méthode, la CMI est définie comme la plus petite concentration d'extrait pour laquelle, il peut avoir un effet.

- Lecture

Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée.

Chapitre 4: Résultats et discussions

4.1. Introduction

Dans cette partie d'étude, l'extraction des huiles essentielles de *Lippia citriodora*, leurs caractérisations organoleptiques, physico-chimiques ainsi que l'examen de leurs propriétés antimicrobiennes et leurs propriétés antioxydantes ont fait l'objet de discussion.

4.2. La Matière végétale : *Lippia citriodora*

4.2.1. Taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % [65].

Après 4 jours de séchage, le poids se fixe à 60 gr. Les valeurs prises chaque jour sont présentées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1. Taux d'humidité de *Lippia citriodora*.

durée (j)	0	1	2	3	4	5	6
M _{mv} (g)	235	70	67	62	60	60	60
H%	-	70.21	71.48	73.61	74.46	74.46	74.46

La figure 4.1 montre le taux d'humidité de la verveine.

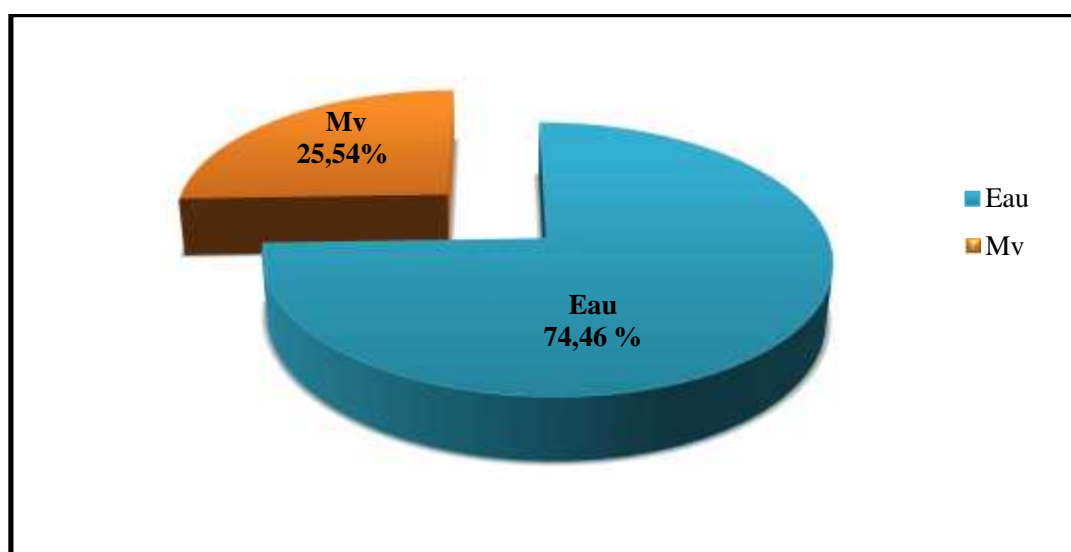


Figure 4.1. Taux d'humidité de *Lippia citriodora* au mois de Mai.

Les résultats d'analyse de notre échantillon ont révélé que la teneur de l'humidité des feuilles de *Lippia citriodora* est très importante, elle est de 74.46 %. Cela signifie que plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée d'eau ce que nous constatons selon la figure 4.1 *Lippia citriodora* est riche en eau et, ceci influe négativement sur leur bonne conservation, sur la durée d'extraction et donc sur le rendement.

4.2.2.Extraction des huiles essentielles du *Lippia citriodora*

Nous avons suivi la cinétique d'extraction en fonction du temps. Théoriquement la durée d'extraction est le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus. Un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction de l'HE de *Lippia citriodora* en fonction de la durée d'extraction et de la période de récolte, selon la nature de la plante et du mode d'extraction.

4.2.2.1.Etude de l'influence du temps d'extraction et la période de récolte en HE sur le rendement

Les résultats obtenus exprimant l'évolution du rendement d'extraction des HE des feuilles de *Lippia citriodora* par HD dans la région de Miliana en fonction du temps au mois de Septembre 2013 et Septembre 2014. Les résultats de ce tableau sont ensuite représentés sous forme d'histogramme qui explique bien l'influence du temps d'extraction et la période de récolte sur le rendement.

Tableau 4.2. Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches de *Lippia citriodora* par HD dans la région de Miliana en fonction du temps au mois de Septembre 2013 et Septembre 2014.

T (min)	0	20	40	60	80	100	120
R(%) Septembre 2013	0	0.04	0.09	0.17	0.19	0.23	0.26
R(%) Septembre 2014	0	0.07	0.46	0.56	0.60	0.66	0.66

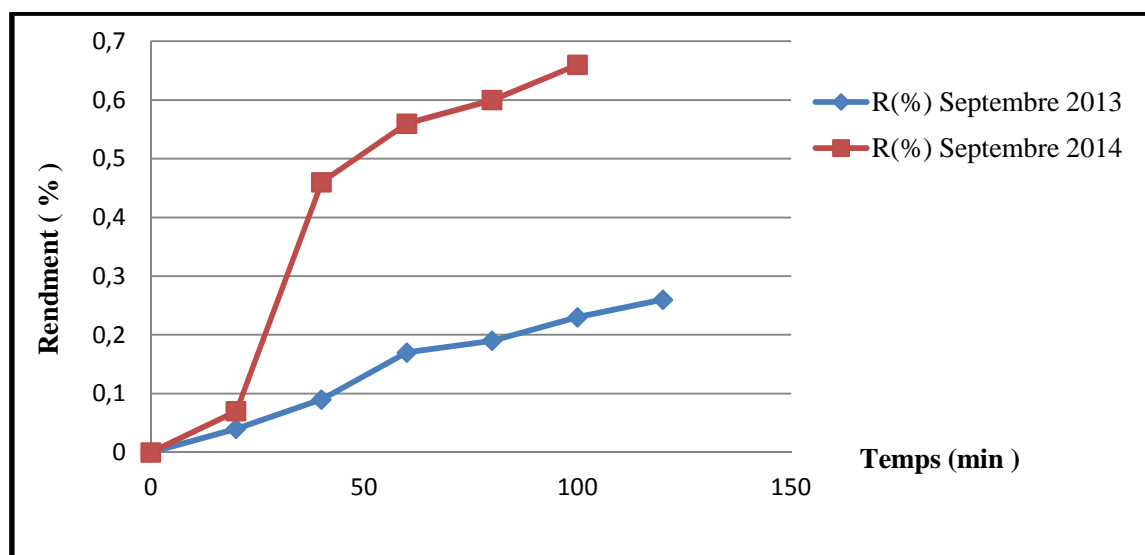


Figure 4.2 : cinétique d'extraction par HD des HE des feuilles sèches de *Lippia citriodora* dans la région de Miliana en Septembre 2013 et 2014.

L'étude de l'évolution du rendement de l'HE des feuilles de *Lippia citriodora*, en fonction du temps d'extraction, montre que le rendement augmente progressivement en fonction du temps, jusqu'à atteindre un palier où le rendement est constant (0.26% pour l'HE de Septembre 2013 et 0.66% pour l'HE de Septembre 2014).

La durée optimale d'extraction a été déterminée par deux heures ; au-delà de cette durée, on peut estimer l'épuisement total de la matière végétale.

L'HE des feuilles de *Lippia citriodora* récoltés en Septembre 2014 présente un rendement supérieur à celui en Septembre 2013 et cela peut montrer l'effet de la période de récolte sur le rendement. Donc le rendement varie en fonction de la durée de vie de la plante c'est-à-dire que le rendement des HE est proportionnel au développement métabolique de l'espèce ainsi que la saison de récolte; le meilleur rendement de l'HE de l'année 2014 représente l'année la plus rentable ($R_{HE}=0.66\%$). Plusieurs travaux ont montré que l'influence de la période de végétation sur le rendement en HE est très importante [66].

4.2.2.2. Etude de l'influence de la nature de la plante sur le rendement

Le tableau suivant montre la cinétique de l'extraction de l'HE des feuilles fraîches et sèches et les parties aériennes fraîches de *Lippia citriodora* de Miliana au mois de Mai 2015. Les résultats de ce tableau sont ensuite représentés sous forme d'histogramme qui explique bien l'influence de la nature de la plante sur le rendement de l'extraction.

Tableau 4.3. Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles fraîches et sèches et les parties aériennes fraîches de *Lippia citriodora* extraites par HD en Mai 2015.

t (min)	0	20	40	60	80	100	120
R _{HE} (%) des feuilles fraîches	0	0.23	0.27	0.30	0.32	0.33	0.33
R _{HE} (%) des parties aériennes fraîches	0	0.29	0.33	0.35	0.37	0.40	0.40
R _{HE} (%) des feuilles sèches	0	0.43	0.80	0.86	0.96	1.03	1.03

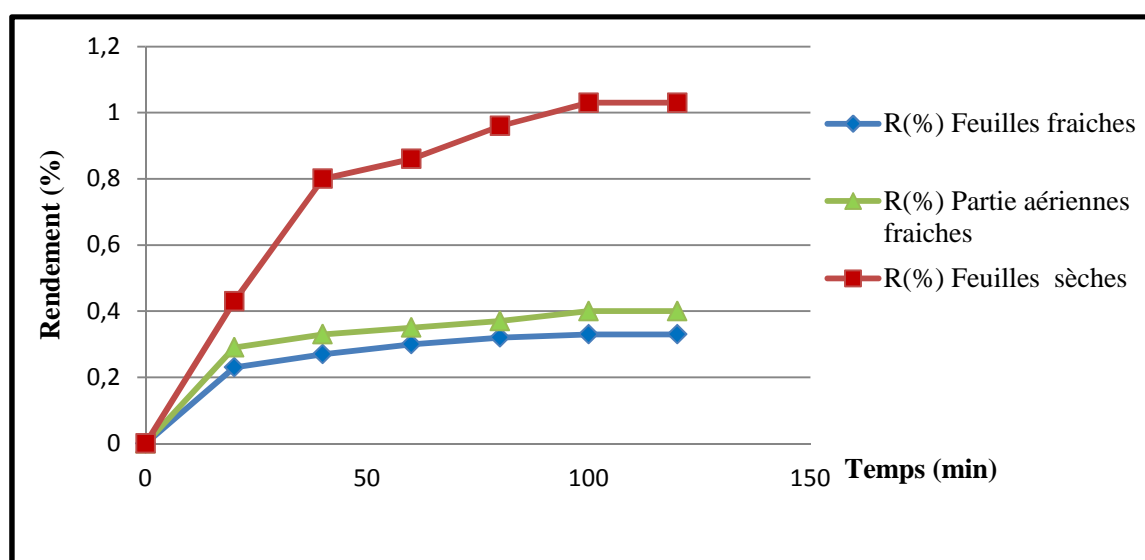


Figure 4.3. Cinétique d'extraction par HD des HE des feuilles fraîches et sèches et les parties aériennes fraîches de *Lippia citriodora* extraites par HD en Mai 2015.

Nous avons suivi l'évolution du rendement en HE des feuilles fraîches et sèches et les parties aériennes fraîches de *Lippia citriodora* extraites par HD en Mai 2015. Les résultats obtenus sont mentionnés dans la figure 4.4.

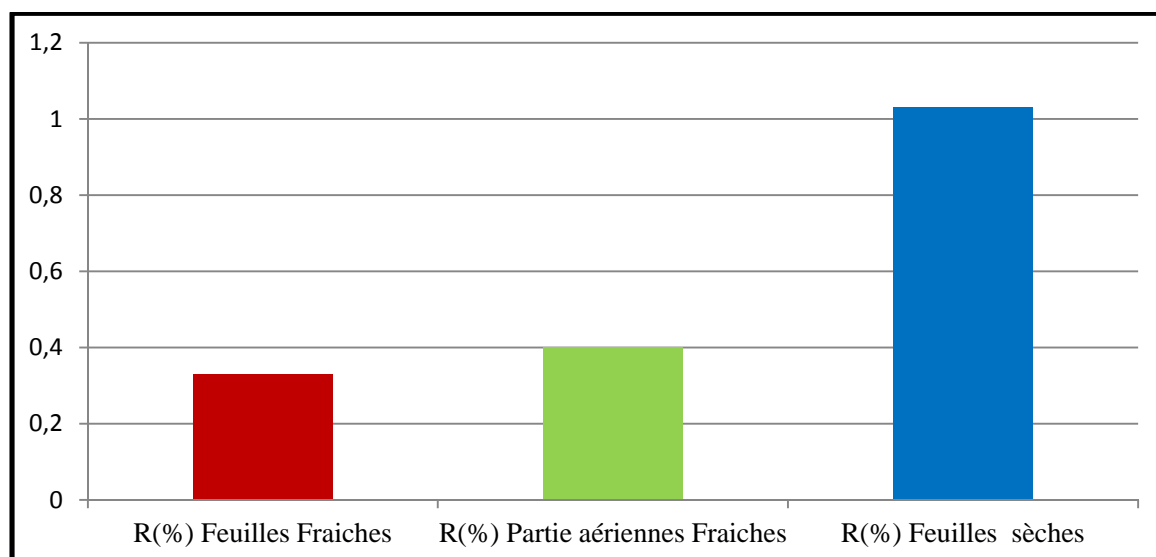


Figure 4.4. Evolution de rendement des HE des feuilles fraîches et sèches et les parties aériennes fraîches de *Lippia citriodora* extraites par HD en Mai 2015.

Les résultats obtenus montrent que le rendement en HE des feuilles sèches (1.03%) est supérieur à celui des feuilles fraîches (0.33%).

Le séchage et la bonne conservation de la matière végétale augmentent considérablement la teneur en HE. Nous proposons comme explication de ces résultats que lorsque la matière végétale est fraîche, l'extraction devient difficile, puisque l'eau chaude de l'hydrodistillation rencontre des barrières et ne peut pas pénétrer dans les glandes qui emmagasinent l'HE. Alors le séchage facilite l'extraction des HE et élimine les barrières. Quand la durée de séchage augmente, le rendement en HE des feuilles sera supérieur.

La figure (4.3) montre l'évolution du rendement des feuilles fraîches et des parties aériennes fraîches qui peut nous renseigner sur l'influence de la partie de la plante sur le rendement d'extraction, il est remarquable que le rendement en HE des parties aériennes fraîches peut atteindre la valeur de 0.40% par contre, il ne peut pas dépasser la valeur de 0.33% pour les feuilles fraîches; donc la teneur en huile des feuilles fraîches est moins importante que celle des parties aériennes fraîches. Cette diminution peut être expliquée par la réduction des sites contenant de l'HE par rapport aux sites des feuilles.

Le tableau suivant montre la cinétique d'extraction de l'HE des feuilles sèches broyées et non broyées de *Lippia citriodora* de Miliana au mois de Mai 2015. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 4.4 et la figure 4.5.

Tableau 4.4. Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches et des feuilles sèches broyées de *Lippia citriodora* extraites par HD en Mai 2015.

T (min)	0	20	40	60	80	100	120
R_{HE}(%)des feuilles sèches	0	0.43	0.80	0.86	0.96	1.03	1.03
R_{HE}(%)des feuilles sèches broyées	0	0.37	0.57	0.63	0.67	0.70	0.70

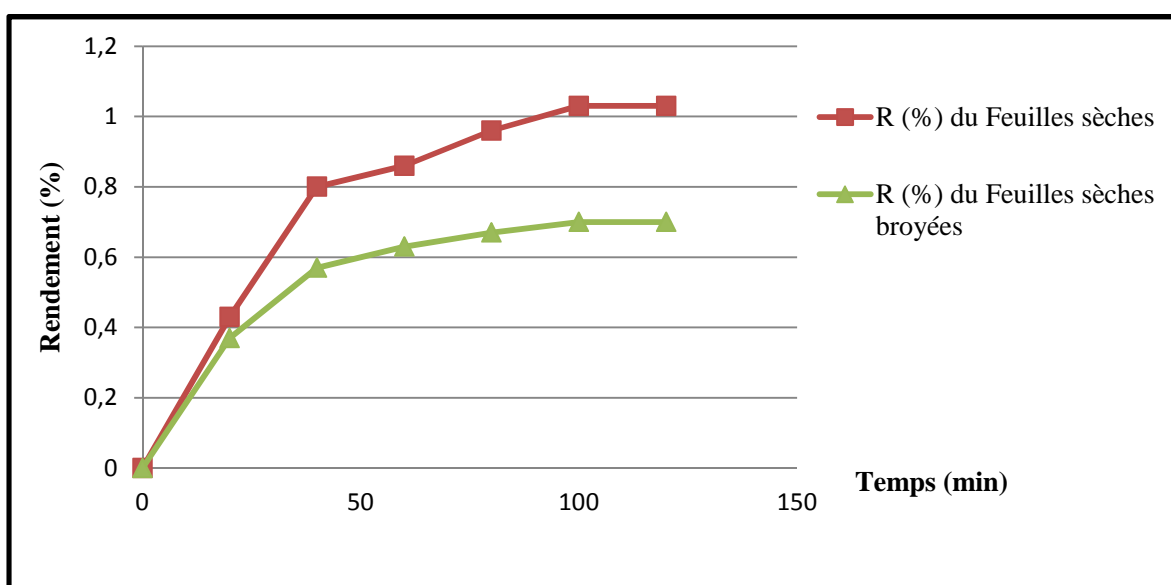


Figure 4.5. Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches et des feuilles sèches broyées de *Lippia citriodora* extraites par HD en Mai 2015.

Les résultats obtenus montrent que le rendement en HE des feuilles sèches broyées (0.70%) est inférieur à celui des feuilles sèches non broyées (1.03%). Ceci peut montrer que le broyage influe négativement sur le rendement de l'HE.

Tableau 4.5. Évolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches de *Lippia citriodora* de Miliana par HD et IEM en fonction du temps.

T (min)	0	15	30	45	60	75	90	105	120
R (%) HD	0	0	0.53	0.82	0.86	0.93	0.98	1.03	1.03
R (%) IEM	0	0.55	0.68	0.83	0.86	0.90	0.90	0.90	0.90

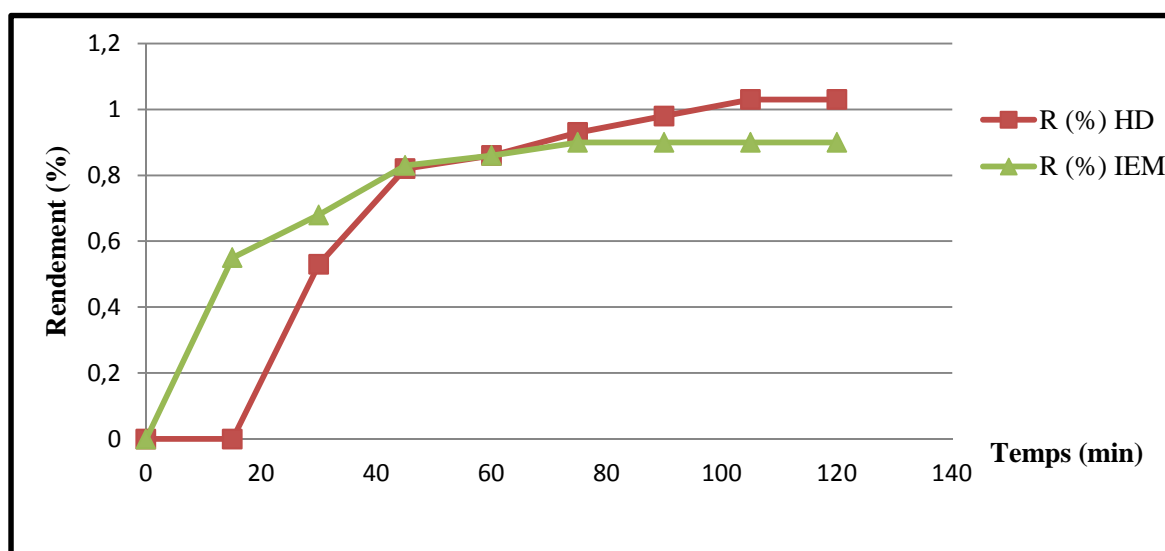


Figure 4.6. Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches de *Lippia citriodora* de Miliana par HD et IM en fonction du temps.

Nous avons suivi l'évolution du rendement en HE des feuilles sèches de *Lippia citriodora* extraites par HD et IEM en Mai 2015. Les résultats obtenus sont mentionnés dans la figure 4.7.

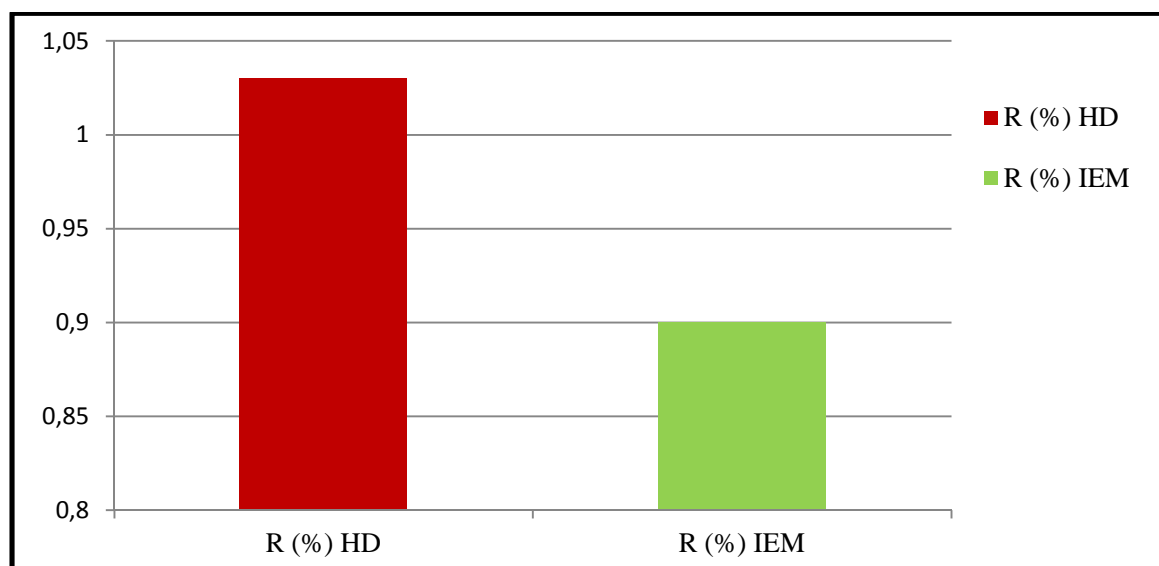


Figure 4.7. Evolution du rendement d'extraction des HE des feuilles sèches de *Lippia citriodora* de Miliana par HD et IEM.

La comparaison des résultats obtenus montre que le rendement obtenu par HD (1,03%) est supérieur à celui obtenu par IEM (0,90%).

4.3. Etude analytique de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Nous avons déterminé les caractéristiques organoleptiques, les propriétés physico-chimiques puis nous avons effectué des analyses qualitatives et quantitatives par (CG/SM) de l'HE de *Lippia citriodora*.

4.3.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des HE de *Lippia citriodora* récolté de la région de Miliana et extraites par hydrodistillation et par induction électromagnétique à partir des différents organes (feuilles et parties aériennes) sont représentées dans le tableau 4.6.

Tableau 4.6. Caractéristiques organoleptiques de l'HE de *Lippia citriodora*.

Partie extraite	HE obtenus par HD		HE obtenus par IEM
	Feuilles	Parties aériennes	Feuilles
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile	Liquide mobile
Couleur	Jaune	Jaune	Jaune claire
Odeur	Agréable citronnée	Agréable citronnée	Agréable Citronnée

A l'issue des distillations, l'HE obtenue est de couleur jaune - jaune claire selon la partie extraite et selon le mode d'extraction avec une odeur citronnée. Les caractéristiques obtenues par l'HD sont en accord avec ceux rapportées par Taleb-Toudert.K et al (2002) [17] et Saidi.S (2014) [30] qui ont analysé les huiles essentielles de *Lippia citriodora*.

4.3.2. Les propriétés physico-chimiques

Le tableau 4.7 montre les résultats des propriétés physico-chimiques, en comparaison avec les valeurs de référence.

Tableau 4.7. Caractéristiques physico-chimiques de *Lippia citriodora*.

	Caractéristiques physico-chimiques d'HE des feuilles de <i>Lippia citriodora</i>				
	pH	IR	IA	IE	IS
Résultats	4	1.492	11.22	67.32	78.54
[17]	--	--	10,09	84,15	94,248
[13]	--	1.479	5.46	--	--

Le pH obtenu indique que notre huile extraite est acide. L'indice de réfraction est une grandeur qui nous permet d'identifier l'HE, aussi de contrôler sa pureté, en effet un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé [67]. Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres, ce paramètre peut nous aider à savoir la qualité de notre produit.

I_A de l'HE extraite de *Lippia citriodora* est de 11.22, un produit à un indice d'acidité très fort est un produit de faible qualité, c.à.d. qu'il présente une forte concentration en acide gras (facilement dégradable). Quant à l'indice d'ester de notre HE il est de 67.32 très élevé.

4.3.3. Analyses chromatographiques

Les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) d'HE de *Lippia citriodora* sont regroupés dans le tableau 4.8 qui met en relief le temps de rétention, l'identification des différents composants et leur teneur. 34 composés sont identifiés. Les composés majoritaires de l'HE des feuilles de *Lippia citriodora* obtenue par HD provenant de la région de Miliana sont : Citral (20.48%), Néral (16.35%), ar-Curcumène (8.06%), Limonène (7.77%), Spathulenol (5.07%), 1,8 Cineol (4.53%), Caryophyllène (4.50%) et Caryophyllène oxyde (4.40 %).

Tableau 4.8. Composition chimique d'HE de *Lippia citriodora*.

N°	Composé	tr (min)	Aire(%)
1	α -Pinène	6.438	0.60
2	Sabinène	7.431	1.92
3	β -Myrcene	7.900	1.21
4	3-Octanol	8.094	0.11
5	Limonène	8.867	7.77
6	1,8Cineol	8.915	4.53
7	β Ocimene	9.385	1.42
8	Cis β terpineol	9.873	0.44
9	Linalool	10.746	0.53
10	Citronellal	12.122	0.34
11	Rose furane epoxide	12.678	0.52
12	α Terpineol	13.074	1.39
13	Nerol	14.061	0.27
14	Neral	14.383	16.35
15	Citral	15.127	20.48
16	α Copaene	17.550	0.66
17	Geraniol acetate	17.692	1.18
18	Caryophyllène	18.568	4.50
19	β Cubebène	18.770	0.08
20	α Humulene	19.322	0.46
21	Aromadendrene	19.482	0.68
22	α Amorphene	19.705	0.37
23	ar-Curcumène	19.933	8.06
24	Zengiberene	20.186	0.61
25	Bicyclogermacrene	20.269	2.43
26	β Bisabolene	20.484	0.15
27	Cadinène	20.812	0.35
28	α Cadinène	21.124	0.09
29	Nerolidol	21.628	1.14
30	Spathulenol	22.012	5.07
31	Caryophyllène oxyde	22.123	4.40
32	α Cedrol	22.514	0.56
33	Epi-bicyclosesquiphellendrene	23.550	0.28
34	Acorenone B	24.281	0.35

D'après le tableau 4.8 et la figure 4.8, l'analyse par CG-SM montre que la composition chimique de l'HE de *Lippia citriodora* obtenu est riche en monoterpènes et en sesquiterpènes.

La comparaison de la composition chimique de l'huile provenant de notre étude avec celle de *Lippia citriodora* provenant de diverses régions. Le composé majoritaire de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* varie d'une région à l'autre (tableau 4.9).

Tableau 4.9. Variations de la composition chimique de l'HE de *Lippia citriodora*

Composé Majoritaire (%)	Nos résultats	Ain Defla [13]	Kabylie [17]	Maroc [31]	Iran [34]
Limonène	7.77	10.6	15.1932	--	10.6
1,8Cineol	4.53	--	--	--	--
Neral	16.35	--	--	--	7.86
Citral	20.48	11.3	--	19.07	11.32
Caryophyllène	4.50	2.8	--	3.6	2.84
ar-Curcumène	8.06	--	--	--	--
Spathulenol	5.07	--	--	7.55	--
Caryophyllène oxide	4.40	--	--	--	--

Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction [72].

4.4.L'étude de l'activité biologique

4.4.1. Etude de l'activité antioxydante

Rappelons que le test antioxydant a été appliqué sur l'HE des feuilles de *Lippia citriodora* provenant de la région de Miliana. L'activité antiradicalaire de l'HE de cette plante est évaluée par la méthode du DPPH et la méthode du FRAP en le comparant avec l'acide ascorbique.

4.4.1.1.Méthode de DPPH

Au départ, le DPPH est sous sa forme 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl radicalaire. Ce radical a une couleur violette en raison de l'électron non apparié et de l'azote. Après réaction avec l'atome d'oxygène d'un capteur de radicaux, le DPPH-H réduit (2,2-diphényl-1-picrylhydrazin) qui est formé est jaune.

Le pourcentage d'inhibition d'HE des feuilles de *Lippia citriodora* et la vitamine C avec le DPPH sont représentés dans le tableau 4.10 et la figure 4.9. L'HE testée est extraite par hydrodistillation.

Tableau 4.10. Pourcentage d'inhibition d'HE de *Lippia citriodora* et la vitamine C par la méthode de DPPH.

	C(mg/ml)	2.5	5	7.5	10
HE de <i>Lippia citriodora</i>	PR%	26.15	48.46	51.15	53.84
Vitamine C	PR%	80.1	88.6	92.5	95.9

Pour la comparaison entre l'efficacité des différentes HE et la vitamine C, nous avons cités les résultats obtenus lors du test de mesure du pourcentage d'inhibition du radical DPPH qui sont cités par la figure 4.9.

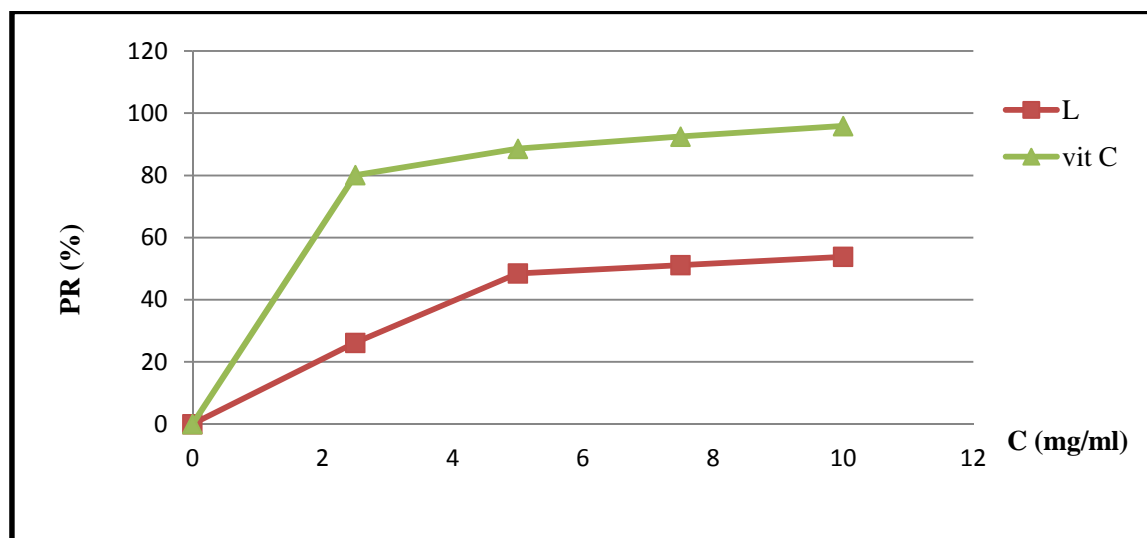


Figure 4.9. Pourcentage d'inhibition de l'HE de *Lippia citriodora* et la vitamine C par la méthode de DPPH.

Le pourcentage d'inhibition du radical varie selon le produit examiné. Un fort pourcentage d'inhibition est obtenu avec la vitamine C (95.9%) et un pourcentage de (53.84%) est obtenu pour l'HE de *Lippia citriodora* pour une concentration de 10 mg/ml d'HE de cette plante. Il semble que l'HE de *Lippia citriodora* a une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celle de la vitamine C. Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés

phénoliques dans l'huile essentielle. Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports [68].

Les HE sont des mélanges volatils des hydrocarbures avec une diversité des groupements fonctionnels. Leurs activités antioxydantes sont liées à la présence des divers terpènes principalement les mono et les sesquiterpènes. De plus Tepe et al (2007), ont montré que les monoterpènes trouvés dans les HE peuvent agir en tant qu'agents antiradicalaires [69].

L'étude de Dopico-Garcia et al (2008), sur l'extrait aqueux de *Lippia citriodora* enregistre une forte activité antioxydante qui dépasse les 90 % à une concentration de 0.075mg/ml[70].

Les IC_{50} a été déterminée graphiquement à partir des graphes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.11.et la figure 4.10.

Tableau 4.11. Les valeurs de IC_{50} de l'HE de *Lippia citriodora* et la vitamine C par le test du DPPH.

Antioxydant	IC_{50} (mg/ml)
Vitamine C	1.95
HE	3.47

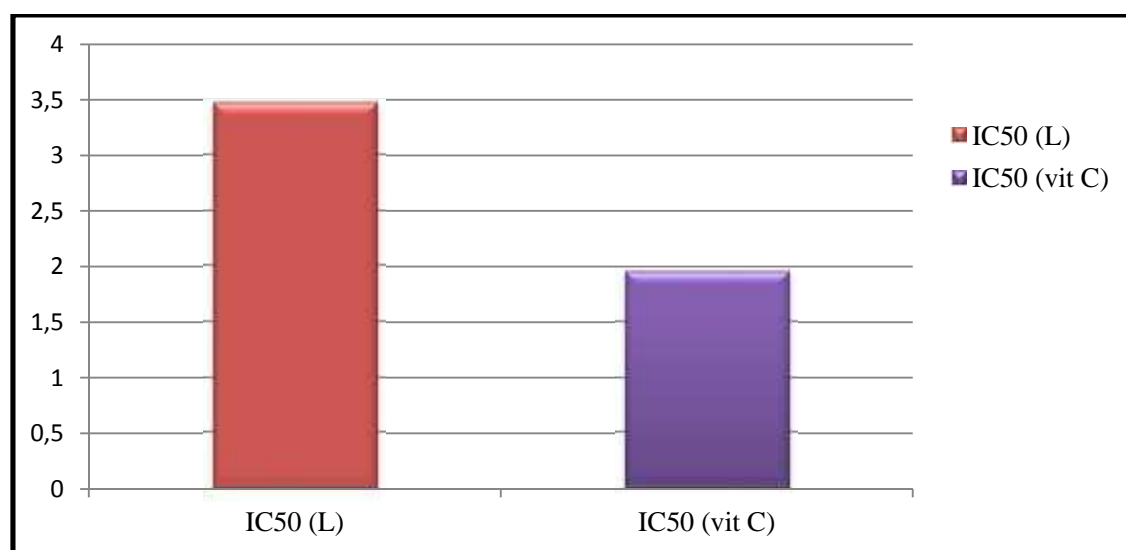


Figure 4.10. Représentation schématique de IC_{50} de *Lippia citriodora* et la vitamine C.

D'après ces résultats, on remarque que la vitamine C présente le meilleur pouvoir antioxydant qui correspond à IC_{50} la plus faible (1.95 mg/ml). Par contre, l'HE de *Lippia citriodora* présente le faible pouvoir antioxydant avec IC_{50} la plus élevée (3.47 mg/ml).

En raison du pourcentage élevé des monoterpènes oxygénés dans *L. citriodora* d'Iran, ceci entraîne une activité antioxydante remarquable de $IC_{50} = (3,2 \pm 0,15 \text{ .tg/ml})$ Alavi et al (2008) [71].

Selon Dopico-Garcia et al (2008), le résultat d'inhibition à 50 % (IC_{50}) qui est de l'ordre de 0.0314 mg/ml est inférieur à nos résultats [70].

4.4.1.2.Méthode du FRAP

Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur de son activité antioxydante, c'est l'aptitude des antioxydants présents dans les extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure en fer ferreux (Fe^{2+}). L'activité antioxydante totale a été mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 700 nm. Une valeur élevée d'absorbance indique une activité antioxydante totale plus forte.

Dans cette analyse, la couleur jaune de la solution d'essai change en vert selon la puissance de réduction de l'extrait. L'absorbance d'HE des feuilles de *Lippia citriodora* et la vitamine C avec le FRAP sont représentés dans le tableau 4.12 et la figure 4.11.

Tableau 4.12. L'absorbance d'HE de *Lippia citriodora* et la vitamine C par la méthode de FRAP.

	C (mg/ml)	2.5	5	7.5	10
HE de <i>Lippia citriodora</i>	Abs	0.639	0.763	0.847	0.882
Vitamine C	Abs	2.44	2.48	2.559	2.577

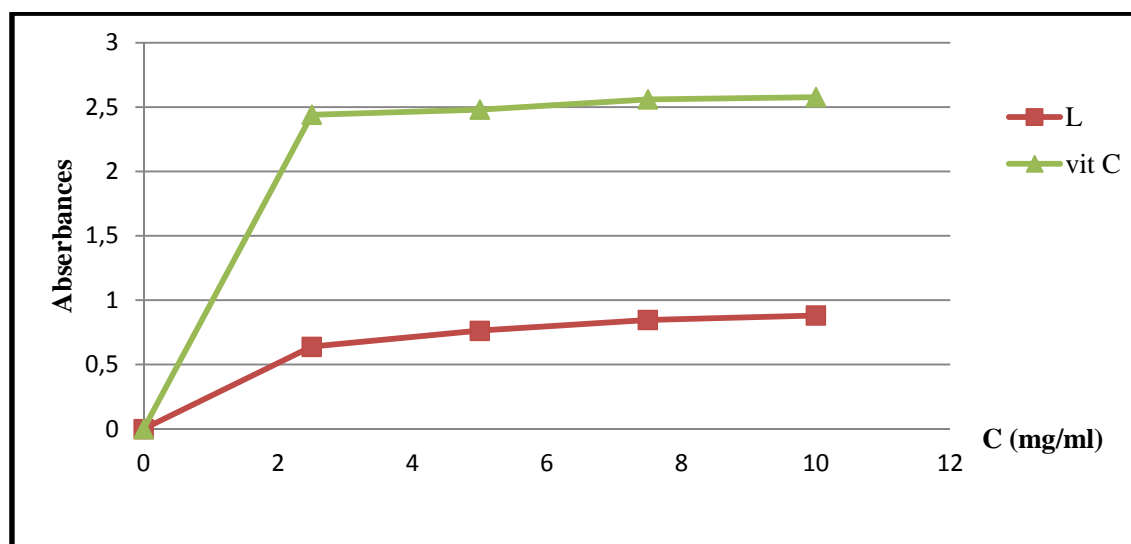


Figure 4.11. L'absorbance d'HE de *Lippia citriodora* et la vitamine C par la méthode de FRAP.

Les résultats obtenus montrent que l'absorbance de vitamine C (2.577) est supérieur à celui de l'HE de *L. citriodora* pour une concentration de 10 mg/ml d'HE de cette plante. Il semble que l'HE de *L. citriodora* a une activité antioxydante mais, elle est moins efficace que celle de la vitamine C.

Les IC_{50} a été déterminée graphiquement à partir des graphes représentant les valeurs de l'absorbance en fonction de la concentration. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.13. et la figure 4.12.

Tableau 4.13. Les valeurs de IC_{50} de l'HE de *L. citriodora* et la vitamine C par le test du FRAP.

L'antioxydant	IC_{50} (mg/ml)
Vitamine C	0.13
HE	2.36

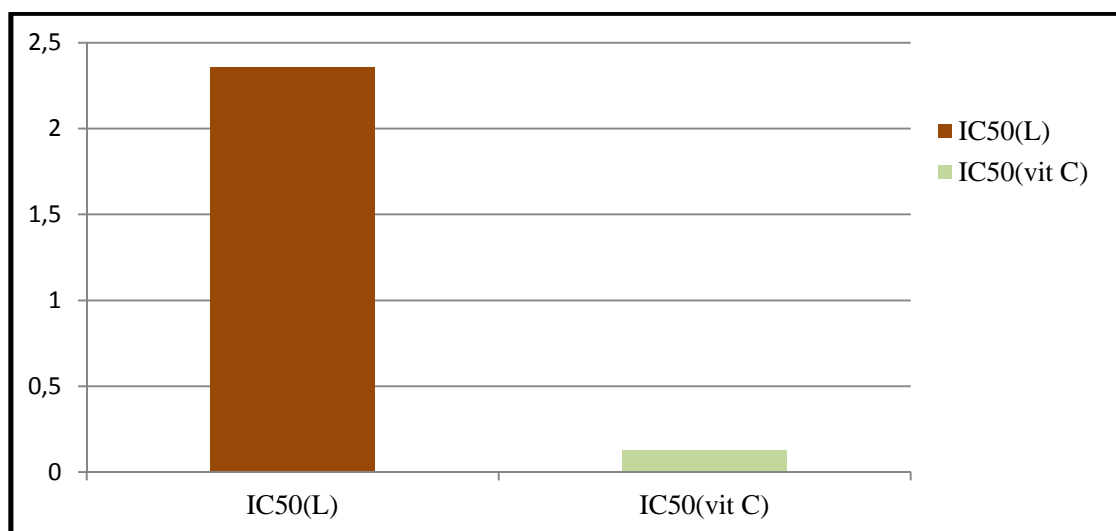


Figure 4.12. Représentation schématique de IC₅₀ de *Lippia citriodora* et la vitamine C.

D'après ces résultats, on remarque que la vitamine C présente le meilleur pouvoir antioxydant qui correspond à IC₅₀ la plus faible (0.13mg/ml); par contre, l'HE de *Lippia citriodora* présente le faible pouvoir antioxydant avec IC₅₀ la plus élevée (2.36 mg/ml).

4.4. Etude de l'activité antibactérienne

4.4.1. Evaluation qualitative

L'évaluation qualitative de l'activité antimicrobienne de notre huile essentielle de *Lippia citriodora* a été faite sur trois bactéries et levure provenant de la collection du laboratoire microbiologique d'analyse médicale de Ain Defla a été faite par la méthode des aromagrammes. Le pouvoir antimicrobien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Mutai et al (2009) [73]. Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en 5 classes :

- Très fortement inhibitrice: D > 30 mm.
- Fortement inhibitrice: 21 mm < D < 29 mm.
- Modérément inhibitrice: 16 mm < D < 20 mm.
- Légèrement inhibitrice: 11mm < D < 16 mm.
- Non inhibitrice: D < 10 mm.

Le diamètre de la zone d'inhibition observée autour des disques imprégnés d'HE pure, et leurs dilutions après 24 heures d'incubation à 37°C ainsi que leurs pourcentages d'inhibitions sont résumés dans le tableau 4.14.

Tableau 4.14. Diamètre et le pourcentage d'inhibition des souches bactériennes de l'HE des feuilles de *Lippia citriodora*.

Nom de la souche	Gram	Diamètre d'inhibition mm	Pourcentage d'inhibition %
<i>Escherichia Coli</i>	-	15	16.66
<i>Staphylococcus Aureus</i>	+	33	36.33
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	-	11	12.22
<i>Candida Albicans</i>	/	30	33.33

Selon l'échelle citée par Mutai et al (2009) [73], les résultats montrent que l'HE de *Lippia citriodora* pure possèdent une activité antimicrobienne importante sur toutes les souches bactériennes testées : très fortement inhibitrice sur *Staphylococcus Aureus* (33 mm) et *Candida Albicans* (30 mm) ; et légèrement inhibitrice sur *Escherichia Coli* (15 mm) et *Pseudomonas Aeruginosa* (11 mm).

Le pourcentage d'inhibition de *Staphylococcus Aureus* ; *Candida Albicans* ; *Escherichia Coli*, et *Pseudomonas Aeruginosa* respectivement de 36.33 ; 33.33 ; 16.66 ,12.22. Les diamètres d'inhibition varient de 11 mm à 33 mm. Le diamètre d'inhibition le plus élevé est obtenu avec *Staphylococcus Aureus* (33 mm) et le plus faible avec *Pseudomonas Aeruginosa* (11 mm).

Les résultats obtenus montrent alors que l'HE de *Lippia citriodora* possède un spectre d'activité antibactérienne élevé sur les bactéries gram+ que sur les gram-. Les bactéries à gram positif sont plus sensibles que les bactéries à gram négatif. L'HE de *Lippia citriodora* possède également une activité très fortement inhibitrice sur la levure utilisée *Candida Albicans* dont la zone d'inhibition est de 30 mm de diamètre. Elle réduit également la croissance mycélienne de la *Candida Albicans* de 33.33 %

Les résultats obtenus sont aussi présentés sur la figure suivante :

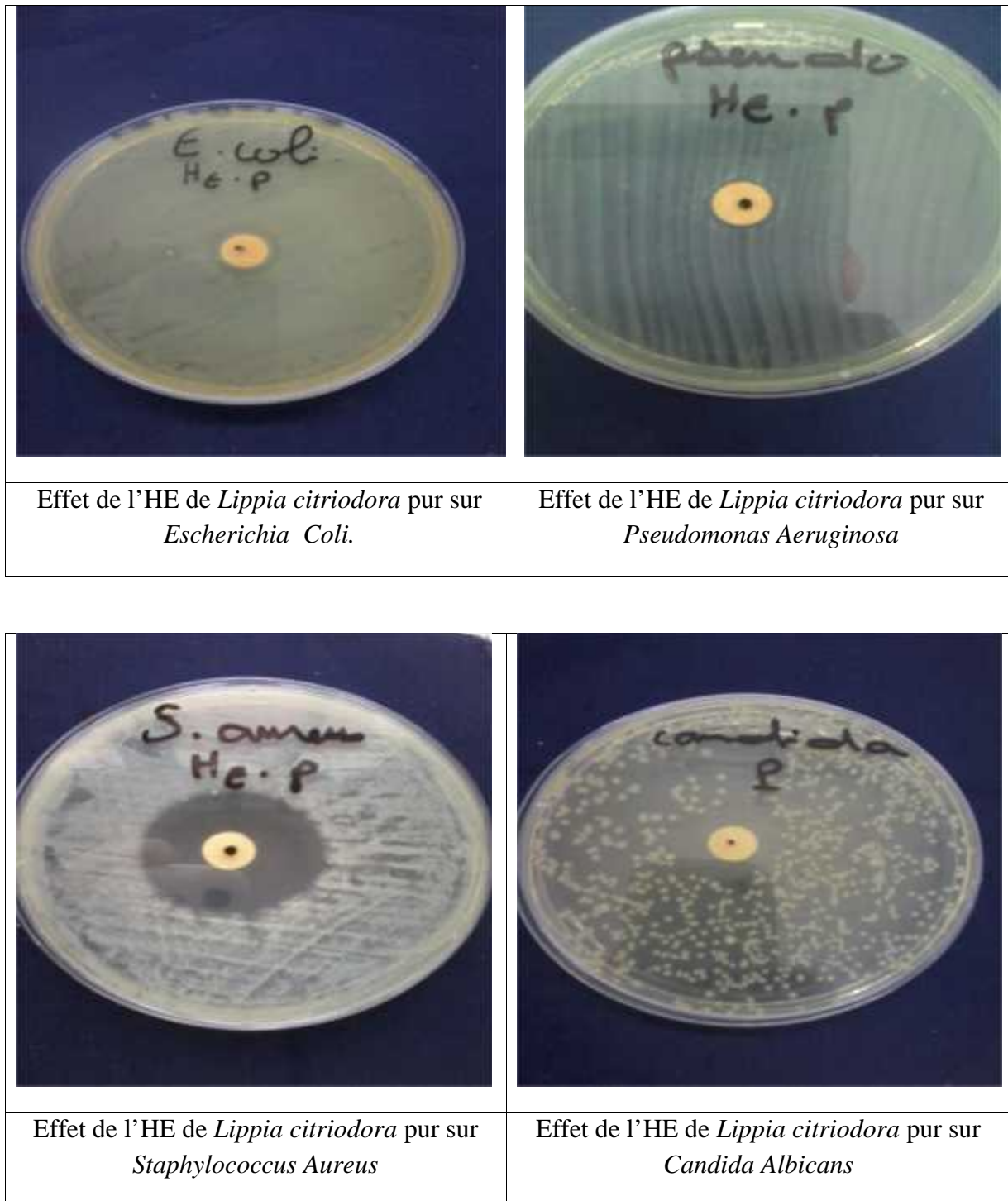


Figure 4.13. Effet antibactérienne et antifongique d'HE pur de *L.citriodora* sur différente souche et levure.

4.4.1. Evaluation quantitative

Les résultats des dilutions sur l'activité antibactérienne et antifongique de l'HE de *Lippia citriodora* sont représentés dans le tableau suivant qui porte les diamètres d'inhibitions en mm et les pourcentages d'inhibitions pour chaque souche de bactérie et levure.

Tableau 4.15. Diamètres des zones et des pourcentages d'inhibition par la déférente concentration de l'HE de *L.citriodora*.

Les souches	1/2		1/4		1/8		1/16	
	D(mm)	PR%	D(mm)	PR%	D(mm)	PR%	D(mm)	PR%
<i>Escherichia Coli</i>	12	13.33	12	13.33	11	12.22	10	11.11
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	11	12.22	10	11.11	10	11.11	9	10
<i>Staphylococcus Aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida Albicans</i>	20	22.22	18	20	16	17.77	12	13.33

Le tableau 4.15 montre clairement que la diminution du diamètre des zones d'inhibition correspondant à une diminution de la concentration de l'extrait appliqué.

Tableau 4.16. Aromatogramme de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

Les souches	0.5	0.25	0.125	0.06
<i>Escherichia Coli</i>	-	-	-	-
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	-	-	-	+
<i>Staphylococcus Aureus</i>	+	+	++	+++
<i>Candida Albicans</i>	-	-	-	-

+ : Présence de germe

- : Absence de germe

La comparaison des diamètres d'inhibition montre que l'HE de *Lippia citriodora* présente une activité antimicrobienne importante sur *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, et

Candida Albicans sauf *Staphylococcus Aureus*. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure suivante :

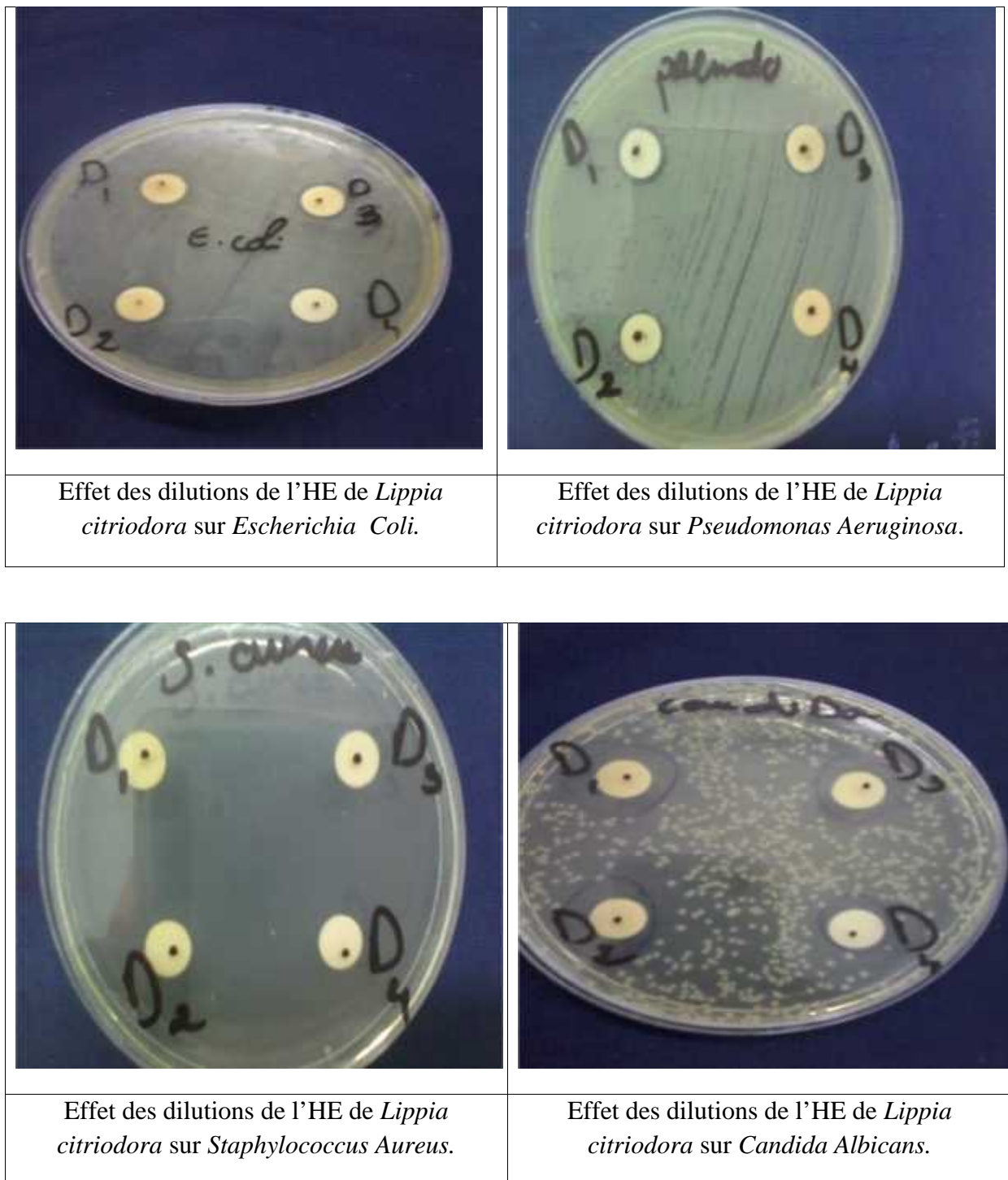


Figure 4.14. Effet antibactérienne et antifongique des dilutions de l'HE de *L.citriodora* sur différentes souches et levures.

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenus sont représentés par le tableau 4.17.

Tableau 4.17. Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'HE de *L. citriodora*

Les souches	CMI (v/v)
<i>Escherichia Coli</i>	0.06
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	0.125
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Résistant
<i>Candida Albicans</i>	0.06

Les concentrations minimales inhibitrices obtenus de l'HE de *Lippia citriodora* varient de 0.06 à 0.125 ($\mu\text{l}/\mu\text{l}$) pour les bactéries à gram négatif et 0.06 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ pour la levure. L'HE de *Lippia citriodora* exerce une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries et de levure testées, sauf *Staphylococcus aureus* qui se révèle résistante, et cela malgré l'utilisation du Tween 80 qui abaisse considérablement l'activité antimicrobienne des huiles essentielles [74]. Ainsi, *Escherichia Coli* et *Candida Albicans* sont montrés les plus sensibles, il sont inhibé à partir de la concentration minimale de 0.06 %. La concentration de 0.125 % a été suffisante pour arrêter la croissance de *Pseudomonas Aeruginosa*.

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'extraction et à la récupération des huiles essentielles de *Lippia citriodora* par hydrodistillation et par induction électromagnétique.

- La durée d'extraction optimale est de 2h pour l'hydrodistillation et 75min pour l'induction électromagnétique.
- Le rendement en HE de *Lippia citriodora* varie de 0.26% -1.03%. Par ailleurs, le rendement obtenu par hydrodistillation (1.03%) présente un rendement supérieur à celui de l'induction électromagnétique (0.90 %).
- L'analyse par GC/MS a permis d'identifier 34 composés dont les principaux constituants sont Citral (20,48%), Z-citral (16.35%), α -curcumène (8,06%), Limonène (7,77%) , Spathulenol (5,07%). Comparativement à ceux cités par la littérature, les résultats obtenus sont différents sur le plan qualitatif et quantitatif.
- Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits éthanoliques: DPPH, FRAP. Selon le test du DPPH, l'HE de *L.citriodora* présente un faible pourcentage d'inhibition du radical DPPH(53.84%) comparativement à celui de la vitamine C(95.9%). L'effet d'inhibition d'huile essentielle de *L.citriodora* et la vitamine C ont montré l'ordre suivant: vitamine C > HE de *L.citriodora*, avec une concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres $IC_{50} = 3.47$ mg/ml. La deuxième méthode d'évaluation de l'activité antioxydante par FRAP montre une faible activité antioxydante de l'huile essentielle de *L.citriodora* dont le $IC_{50} = 2.36$ mg/mL par rapport à la vitamine C $IC_{50} = 0.13$ mg/ml.
- L'activité antibactérienne et antifongique de l'HE de *L.citriodora* a été déterminée selon la méthode d'aromatogramme, cette technique montre que notre huile possède une activité sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa* et la levure *Candida albicans*. On constate que l'HE de *L.citriodora* présente une activité antimicrobienne importante. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues varient de 0.06 à 0.125 (v/v) pour la levure et les bactéries testées.

Vu les résultats obtenus, la continuité de ce travail s'avère primordial et plusieurs axes de recherche sont ouverts. En perspectives, il serait donc intéressant de mener une étude plus approfondie sur l'espèce *Lippia citriodora*. Ainsi que la détermination de l'activité antioxydante par d'autres méthodes et l'étude d'autres activités biologiques attribuées à ces plantes telles que

Conclusion générale

les activités insecticides et anti-inflammatoire...etc. Aussi Faire des essais dans le domaine pharmaceutique et parapharmaceutique pour savoir l'utilité des huiles essentielles de *Lippia citriodora*. Enfin extraire les huiles essentielles par d'autres méthodes d'extraction telles que l'extraction par micro-ondes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Mostafa.S ; « Extraction et caractérisation de l'huile essentielle et de quelques métabolites secondaires actifs d'une plante à caractères thérapeutiques , thymus vulgarisL; et étude de quelques activités pharmacologiques » ; thèse de magister ; Blida ; 2011.
- [2] Mohammedi.Z ; « Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Tlemcen » ; thèse de magister ; université Abou bakr belkaid-Tlemcen ; 2006.
- [3] Collectif ; « Encyclopédie des plantes médicinales : identification , préparation , soins » ; Edition Larousse ; Paris ; 2001.
- [4] Lenoir.L ; « Effet protecteurs des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat » ; université d'Auvergne , école de doctorale des sciences de la vie et de la santé ; 2011.
- [5] Mebarki.N ; « Extraction des huiles essentielles de Thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse - antimicrobienne » ; thèse de magister ;Boumerdes ; 2010.
- [6] Haddouchi.F et Benmansour.A ; « Huiles essentielles, application et activités biologiques, application à deux plantes aromatiques » ; Laboratoire des produits naturels ; thèse de magister ; Tlemcen ; 2008.
- [7] Belaib.N et Saidi .S ; « Etude physico-chimique et microbiologique des huiles essentielles de Fenouil » ; thèse de master ; université de Khemis-Miliana ; 2012.
- [8] Benadji.H et Khoukhi.N ;« L'extraction et la caractérisation de l'huile essentielle de Thym(Thymus vulgaris) de Miliana et l'étude de l'activité antibactérienne » ; thèse de magister ; université de Khemis -Miliana ; 2012.
- [9] Bubulka.P ; « Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales ; la médecine traditionnelle à la phytothérapie » ; 2007 ; pp 137-145.
- [10] Kateb.J ; « Le travail sur la culture des plantes médicinales » ; Edition Masson ; Paris ;1989 ; pp14.
- [11] Zoubeidi.C ; « Etude des antioxydants dans le rosmarinus officinalis. Labiatea » ; thèse de magister ; université de Ouargla ; 2004.
- [12] Kaloustian et Hadji-Minaglou.F ; « La connaissance des huiles essentielles qualilogie et aromathérapie : Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée » ; Edition Springer Science &Business ; 2013 .

Références bibliographiques

- [13] Slimani.N et Dahmane.M ; « Effet des huiles essentielles extraites a partir des feuilles de *Mentha Spicata*, *Mentha pulegium*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Lippia citriodora*, *Ocimum basilicum* sur quelques bactéries pathogènes » ; thèse de master ; université de Hassiba Ben Bouali-Chlef ; 2013.
- [14] Ozek.T et Kirimer.N et Baser.K.H.C ; « Composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton grow in Turkey » ; J. essentiel oil research ; 1996.
- [15] Pierre.M et Lis.M ; « Secrets des plantes pour se soigner naturellement 250 plantes et 230 recettes » ; Edition Artémis ; 2002 ; pp 124-125.
- [16] Bonjean.A ; « *Aloysia triphylla*-Verveine odorante (Verbenaceae), systématique et répartition géographique, combinaison spécifique, morphologie, histoire, culture et récolte, propriétés médicinales, autres usages » ; Saisie Tamara Le Bourg -Art.n°1220 ; 2001.
- [17] Taleb-Toudert.K ; « Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de *Aloysia Triphylla*. Evaluation in vitro de son effet sur la croissance de certains agents pathogènes de l'homme » ; thèse de master ; 2002.
- [18] Bruneton .J ; « Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales » ; 2^{ème} Edition. Tec; Doc ; Lavoisier ; Paris ; France ; 1993.
- [19] Perrot.E et Paris.R ; « Les plantes médicinales » ; Presses universitaires ; France ; 1974 ; pp 244.
- [20] Pascual ME. et Siowing.K et Carretero E.Sanchez Mata D.Villar ; « *Lippia* traditional uses, chemistry and pharmacology »; J. Ethnopharmacol ; 2007; vol 76; pp 201-214.
- [21] Vigneau.C ; « Plantes médicinales, thérapeutique- toxicité » ; Paris ; N°129 ; pp 257 .
- [22] Elattir.H et Skiredj.A et Elfadi.A ; « Transfère de technologie en agriculture » ; Fiches - techniques VIII: La laitue, l'endive, le topinambour, la verveine, la tomate industrielle. N°1 03 ; 2003 ; pp 4.
- [23] Eberhard.T et Robert.A et Annelise.L ; « Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles »; Editions Tec & Doc; Lavoisier; Paris; 1984; pp488-489.
- [24] Botrel.A ; « Encyclopédie des plantes médicinales » ; Edition Larousse ; France ; 2001; pp 228.
- [25] EL Hmamouchi.M ; « Partenariats Agricoles pour la productivité et la prospérité. À P³ . Numéro spécial »; L'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA); Taounate ; 2006.

Références bibliographiques

- [26] Noun.A ; « Etude de l'extraction et de l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *rosmarinus officinalis* L. de la région d'Ain Defla » ; mémoire de master ; université de Khemis-Miliana ; 2013.
- [27] Carnat .A & Carnat A.P. & Fraisse.D, Lamaison J.L ; « The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea *Fitoterapia* »; 1999 ; vol70 ; pp 44-49.
- [28] Valentao.P and Fernandes.E and Carvaiho F and Andrade.P.B, Seabra R.M., de Lourdes Basto M ; « Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid »; *Biol Pharm Bull* 25; 2002; pp1324-1327.
- [29] Funes.L. and Fernández-Arroyo.S and Laporta.O ; « Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract »; *Food Chem* ;2009 ; vol 117 ; pp589-598 .
- [30] Saidi.S ; « Etude de l'effet antioxydant des huiles essentielles de *Lippia citriodora* de la région de Tlemcen » ; mémoire de master ; université de Tlemcen ; 2013.
- [31] Paun.G et Zrira.S ; « Chemical composition , antioxidant and antibacterial activity of essential oils from Moroccan aromatic herbs » ; *romaine de chimie* ; september 2013.
- [32] Craker.L.E et al ; « Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'herit) britton leaves cultivated in botucatu, Sao Paulo, Brazil » ; *Future for medicinal and aromatic plants* ; 2004.
- [33] Laboratoire phytonys ; « Bulletin d'Analyse de l'Huile Essentielle de Verveine Citronnée » ; *Revel essence aromathérapie*; Lot 400253 ; France ; paris .
- [34] Khani.A et Basavand.F et Rakhshani.E ; « Chemical composition and insecticide activity of lemon verbena essential oil » ; *J.Crop Prot* ; university of Zabol- Iran ; 2012 ; Vol 1.
- [35] Diaz Fajardo .O ; « Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Her) britton, cultivada en tres regiones de Colombia » ; *universidad industrial de Santander* ; 2007.
- [36] Gomes, P.C.S et Oliveira, H.R.C et Vicente, A.M.S; Ferreira,M.F ; « Production , transformation and essential oils composition of leaves and stems of lemon verbena[*Aloysia triphylla* (L'herit) Britton] grow in Portugal » ; *university of Minho* ; 2006.
- [37] Noorkhoda.Y et Meshkatsadat.M.H ; « Quantitative and qualitative study of bioactive compounds of essential oils of plant *Lippia citriodora* by use of GC-MS technique » ; *Novel applied sciences* ; 2013.

Références bibliographiques

- [38] El-hawary.S et Yousif.M et Abdel Motaal.A et Lamia.M ; « Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt » ; Bulletin of faculty of pharmacy ; Cairo university; 2012.
- [39] Hanaa F.M.Ali et El-Beltagi.H et Nasr.F ; « Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla* » ; Cairo university ; Egypt ; 2011.
- [40] El-haib.A ; « Valorisation de terpènes naturels issus de plante marocaines par transformation catalytiques » ; thèse doctorat ; université de Toulouse ; février 2011.
- [41] Rivera .L ; « Etude d'extraction des métabolites secondaire de déférente matière végétale en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe » ; thèse de doctorat ; institut national polytechnique de Toulouse ; Juillet 2006.
- [42] Simpson William.T ; « Drying and control of moisture content and dimentional changes » ; Gen Tech. Rep . FPL-GTR-113. Madison ; Forest products Laboratory ; 1999 ; pp 463.
- [43] Belyagoubi-Larbi.M ; « Effet de quelques essences végétale sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales » ; thèse de magister ; université d'Abou Berk Belkaid ; Tlemcen ; 2006.
- [44] Mohamed, N., boukhatem, mohand,.S.H, Fairoua, S. et Yahia, H ; « Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie) »; université de Saad Dahleb de Blida ; Algérie; 2010.
- [45] Bentchicou. A ; « Extraction, caractérisation et analyse de l'huile essentielle de thym d'Algérie par chromatographie en phase gazeuse (CPG) » ; thèse d'ingénieur ; université de Médéa ; 1999.
- [46] Hameurlaine.S ; « Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes pituranthos scoparius et rhantherium adpressum de la région de Ghardaia » ; mémoire de magister ; université de Kasdi Merbah-Ouargla ; 2009.
- [47] El abed. D et Kambouche. N ; « Les huiles essentielles » ; Edition Dar El Gharb ; Oran ; 2003.
- [48] Hellal.Z ; « Contribution a l'étude des propriétés antibactérienne et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*Sardina plichardus*) » ; mémoire de magister ; université de Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou ; 2011.
- [49] Melet.I et Benchabane.N ; « Contribution a l'extraction et l'étude de l' huile essentielle d'eucalyptus » ; thèse d'ingénieur d'état ; université de Médéa ; 1997.

Références bibliographiques

- [50] Nourachani Ibrahim ; « Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle des écorces de *Cryptocarya crassifolia* (LAURACEAE) »; mémoire d'études approfondies (D.E.A) de biochimie ; université d'Antananarivo ; 2010.
- [51] Madaoui.K et Medjadji.N ; « Contribution a l'effet antioxydant de deux plantes médicinales locales » ; mémoire de master ; université de Hassiba Ben Bouali-Chlef ; 2013.
- [52] Nourachani.I; « Caractérisation physico-chimique et biologique de l'huile essentielle des écorces de *Cryptocarya crassifolia* (LAURACEAE) »; mémoire d'études approfondies (D.E.A) de biochimie ; université d'Antananarivo ; 2010.
- [53] Adams.Rp ; « Identification of essential oil components by gaz chromatography/quadrupole masse spectroscopy » ;carol stream; il; USA. Allured publishing ; 2011.
- [54] Xavier. F; « Conservateurs pour cosmétique – Antioxydants et anti UV », J.Techniques de l'ingénieur ; 2014; vol 2; pp 9 .
- [55] Gulcin.I et Huyut.Z et Elmastas.M ; « Radical scavenging and antioxydant activity of tannic acids », Arabian journal oh chemistry ; 2010 ; vol 3; pp43-53 .
- [56] Zenini.M ; ; «Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de trois espèces de menthe: *Mentha spicata* , *Mentha rotundifolia* et *Mentha pulegium* », thèse de master ; universités de Khemis -Miliana; 2012.
- [57] Rolland.Y ; ; « Actualite des lipides en cosmétique: antioxydants naturels végétaux », OCL; 2004 ; vol 11; N°6 ;pp 419-424 .
- [58] Archana.B, Dasgupta.N et De.B; « In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit » ; Food Chem ; 2005 ; vol 90; pp727-733.
- [59] Gulcin.I et Mshvildadze.V et Gepdiremen.A ; ; « Antioxydant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica* : 3-O-(b-D-glucopyranosyl)-hederagenin »; Phytother ; Rev 20;2006 ; pp 130-134 .
- [60] Michelline.M et Kansole.R ; ; « Etude ethnobotanique phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso »; mémoire de magister en biologie ; université de Ouagadougou ; 2009.
- [61] Ormeno.E et Fernandez.C et Mévy.J; « Plant coexistence alters terpene emissio and content of mediterranean species-Phytochemistry »; 2007 ; Vol. 68 ; pp 840-852 .
- [62] Kavbouche.Z et Boutaghane.N et Laggoune.S et Kabouche.K ; «International Journal of Aromtherapy» ;2005; Vol. 15 ; pp. 129-133 .

Références bibliographiques

- [63] Roques.C et Billerbeck.V.G. et Bacaria J ; « Détermination des CMI et QMI des produits air pharma sur des souches bactériennes multi résistantes » ; Sci. Aliments ; 2003; vol.13; pp 1-8.
- [64] Itatahine.A et Ferrah.C ; « Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des flavonoïdes d'Eucalyptus camaldulensis »; thèse de master , université de Khemis-Miliana ; 2013.
- [65] Khoukhi. N et Benadji.H ; « L'extraction et la caractérisation de l'huile essentielle de THYM (*Thymus vulgaris*) de Miliana et l'étude de l'activité antibactérienne »; thèse de master ; université de Khemis Miliana ; 2013.
- [66] Brada.K ; « Etude de l'Extraction et de l'Activité Antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de la région D'Ain Defla »; thèse de master ; université de Khemis Miliana ; 2012.
- [67] Makhloufi .A ; « Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux plantes médicinales poussant a l'état spontané dans la région de Bechar (*matricaria pubescens* (desf.) »; thèse de doctorat ; université d'Aboubaker belkaid.
- [68] Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M. et Garcia-Parrilla M.C ; « Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical » ; Talanta, 2007, vol 71,pp 230–235.
- [69] Tepe.B et Eminagaonagaoglu.O et Askin.A et Aydin.E ; « Antioxydant potentials and rosmaring acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata subsp.verticillata* and *s.verticilla amasiaca* » ; bomm; food chemistry; 2007 ; pp985-989.
- [70] Dopico-Garcia M. S et Castro-Lopez M.M et Noguero-Cal.R et Lopez-Vilarino J.M. et Dorman H.J.D et Deans.S.G ; « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil » ; Journal of Applied Microbiology; 2008 ; vol 88; pp 308-316.
- [71] Alavi.L et Jabbari. A et Barzegar.M. et Naghdibadi.H ; « Chemical composition and Antioxidant Properties of Essential Oils (*Lippia ciiriodora*, *Thymus daenensis*. » ; Food Chem ;2008 ; vol 89; pp 27-36.
- [72] Boumaza.Dj ; « Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules active de deux plantes médicinales : *Inula viscoza*, *Rosmarinus officinalis* de la région d'Oran ; mémoire de magister » ; université d'Oran ; 2011.

Références bibliographiques

- [73] Mutai C, Bii C, Vagias C, Abatis D, Roussis V ; « Antimicrobial activity of Acacia mellifera extracts and lupanetripenes »; Journal of Ethnopharmacology; 2009.
- [74] Bekhechi C, Atik-Bekkara F, Abdelouahid D.E ; « Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'Origanum glandulosum d'Algérie- Phytothérapie » ; 2008 ; Vol. 6; pp 153–159.
- [75] Avril.J.L et Dabernat et Denis.H et Monteil.F.H ; « Bacteriologie clinique», 2^{ème} Edition ; Paris ; 1992 ; pp 9,31,135,152 .
- [76] Chaib bessou.S et Yakhou.A ; « Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de Mentha pulegium, évaluation de l'activité anti microbienne », thèse de master ; université de Khemis -Miliana; 2012.

Annexe 1



solution DPPH (violet)

DPPH réduit (jaune)

Figure 1: représentation de la couleur de DPPH avant et après la réduction.



Figure 2: représentation de la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺) en présence d'un antioxydant (HE).

Les souches bactériennes utilisées:

Escherichia coli

Escherichia coli, également appelée colibacille et abrégée en *E.coli*, est une bactérie intestinale des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80% de notre flore intestinale. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans ces selles de nourrissons, c'est un coliforme fécale généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E.coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou septicémies.

Ce genre comprend 5 espèces, mais *E.coli* est la plus importante. Cette espèce est subdivisée en sérotypes sur la base des antigènes présents.

E.coli (Gram-), c'est une des bacilles de dimension moyenne 0.5, elle se développe aisément sur milieu ordinaires [75].

Classification

Règne :	Bacteria
Embranchement :	Proteobacteria
Classe :	Gamma proteobacteria
Ordre :	Enterobacteriales
Famille :	Enterobacteriaceae
Genre :	<i>Escherichia</i>

pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie gram - du genre pseudomonas. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire: ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles [76].

Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante elle est avec d'autres bactéries à gram - de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés).

Classification

Régne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (Gram+) est l'espèce la plus pathogène du genre staphylococcus.

Le réservoir naturel des staphylocoques est l'homme et les animaux à sang chaud. Cependant, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement.

Elle est responsable d'intoxication alimentaires, d'infection localisées suppurées , et dans certains cas extrêmes , de septicémies chez des sujet débilisés (greffe, prothèses cardiaque)[75].

Candida Albicans

Candida est un genre de levures (dont la plus importante espèce est candida albicans) qui est répandu dans tout le monde habité et forme normalement un commensal parfaitement toléré par l'homme sain dans la bouche, sur la peau , dans le système digestif et dans la flore vaginale. Elle devient pathologique et provoque parfois des mycoses (candidiase ou candidose) chez les humains et d'autres animaux quand l'organisme est affaibli.

Candida albicans (parfois aussi appelé monlia) est un champignon (ou levure) normalement présent sur la peau et dans la bouche, l'intestin, et le vagin. Dans certaines conditions , il se multiplier et envahir la surface de la peau ou les muqueuses. De telles infection sont habituellement mineures , mais des formes plus sérieuses et plus profondes peuvent survenir chez les patients dont la résistance a été affaiblie par les médicaments immunosuppresseurs et des maladies graves comme le sida [76] .

Annexe 2

Classification

Règne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Saccharomycetes

Ordre : Saccharomycetales

Famille : Saccharomycetaceae

Genre : *Candida*

Glossaire

A

Antibactérien : Il qualifie toute ce qui sert à lutter contre les bactéries.

Antifongique : Qui empêche la prolifération de champignons et de levures parasites.

Anti-inflammatoire : Qui atténue les tuméfactions et les rougeurs provoquées par une agressions chimique ou microbienne.

Antimicrobienne : Est une famille de substances qui tuent ou ralentissent la croissance des microbes.

Antioxydant : Est une molécules qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques.

Arbuste : E n botanique, le mot arbuste désigne une plante ligneuse d'une taille inférieure à 8m et à tronc marqué.

Aromathérapie : Est l'utilisation médicale des extraits aromatique de plantes (essences et huiles essentielles).

C

Camphre : Le camphre est un solide cireux, blanc ou transparent avec une forte odeur aromatique.

F

Flavonoïdes : Les flavonoïdes (ou bioflavonoïdes) sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structures de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones.

I

Glossaire

Insecticide : Les insecticides sont des substances actives ou des préparations ayant la propriétés de tuer les insectes.

In vitro : Signifie un test en tube, ou , plus généralement , en dehors de l'organisme vivant ou de cellule.

In vivo : Est une expression latine qualifiant des recherches ou des examens pratiqués sur un organisme vivant, par opposition à in vitro ou ex vivo.

P

Pathogène :Un agent pathogène est tout facteur capable d'engendrer une lésion ou de cause une maladie.

Phénols : En chimie organique , les phénols sont des composés chimique aromatiques portant une fonction hydroxyle(OH) . Les dérivés portant plusieurs fonctions (OH) appelés des polyphénols.

Phytothérapie : Désigne le médecine basée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels.

S

Sédative : Est une substance qui a une action dépressive sur le système nerveux central et qui entraine un apaisement.

Sida : Ensemble de symptômes consécutifs à la destruction de plusieurs cellules du système immunitaire par un rétrovirus.

Stomatique : Se dit d'un médicament qui favorise la fonctionnement normale de l'estomac .

Glossaire

T

Thérapeutiques : Est la partie de la médecine qui étudie et applique le traitement des maladies.