

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Centre Universitaire- Salhi Ahmed - Naâma

Institut des Sciences et de Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Laboratoire de Recherches

Gestion Durable des Ressources Naturelles dans les Zones arides et Semi-aride

## MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER Académique**

En Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté Par:

BELGUESSAIR Rekia

NOUALI Imane

## Thème

---

Potentialités biologiques de l'huile essentielle de *Lippia Citriodora*.

---

Soutenu le : 07/07/2022

Devant le jury :

**Président** : Mr GHERIB Mohammed

Professeur, Centre Universitaire de NAAMA

**Examineur** : M<sup>me</sup> YAKOUBI Mariem

MCB, Centre Universitaire de NAAMA

**Encadreur** : M<sup>f</sup> AMROUCHE Abdelilah

Professeur, Centre Universitaire de NAAMA

Année universitaire 2021/ 2022

---

## Remerciements

*Louange à DIEU, le tout Miséricordieux, le très Miséricordieux de nous avoir aidé à finir ce modeste travail de recherche.*

*Les travaux présents dans cette mémoire ont été effectués au sein du laboratoire de Recherche Gestion Durable des Ressources Naturelles dans les Zones arides et Semi-aride et du laboratoire Micribiologie1 sous la direction du Pr AMROUCHE Abdelilah, nous tenons vivement à exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, pour ses conseils, et surtout pour sa patience particulièrement durant la correction de ce mémoire. Nous le remercions profondément pour la confiance et l'autonomie qu'il nous a accordées.*

*Nous remercions aussi Dr AISSAOUI Nadia pour ses conseils et son soutien.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et nos vives reconnaissances au Pr GHERIB Mohammed d'avoir accepté de présider le jury ainsi qu'au Dr YAKOUBI Mariem qui nous a fait l'honneur d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements vont également à l'ensemble du personnel technique du laboratoire dans lequel ce travail a été réalisé, ainsi qu'à toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, vous trouverez ici l'expression de nos très vives reconnaissances.*

---

# Dédicace

## Dédicace

*Je dédie ce travail à :*

*A mon chère grand père qui m'a donné la possibilité de poursuivre mes études, pour l'espoir qu'il me donne, pour ses conseils, et son guide affectueux dans la vie, j'espère que je puisse rendre le minimum du bonheur que tu m'as offert, et qu'Allah te protège et te garde à mes côtés.*

*A mes chères parents, avec toute ma reconnaissance et mon amour, je les remercie d'avoir cru en moi jusqu'au bout.*

*A ma deuxième mère, qui veille à ma réussite et mon bonheur pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A mes chers frères : Addelatif, Djamel, Larbi, Zakaria*

*A ma belle sœur: Karima*

*A ma tante: Nora*

*A ma petite princesse Radjaa*

*A ma binôme Imane*

*A mon amie Chaimaa pour me soutenir*

*A toute la famille BELGUÉSSAÏR*

*A toute personne qui a partagé avec moi des moments appréciables*

*BELGUÉSSAÏR Rekia*

---

# Dédicace

## Dédicace

*À l'occasion de ma graduation, je dédie cette graduation à mon père, que j'ai souhaité qu'il soit parmi nous en ce jour et dont sa présence me manque, mais je suis sûr qu'il serait très heureux dans sa tombe de tout ce que j'ai accompli.*

*À ma chère mère pour son amour qu'elle m'a toujours accordé, en témoignage de ma reconnaissance envers sa confiance, ses sacrifices et sa tendresse.*

*À mes très chères mamas : Mabrouka, Hadda*

*À mes très chers frères : Ali, Djamel, Abd Alghani, Mohammed, Mokhtar, Abd Almajid et Ghrissi sans oublier Younes et Alae Eddine*

*À mes très chères sœurs : Faiza, Fatima, Salima, Dalila, Halima et Widad sans oublier ma très cher petite sœur Kater Al Nada*

*À Mes beaux-frères: Mohamed, Bouloufa, Bendjerad, Faradji, Nasro, Sid Ahmed*

*À toute la famille NOUALI*

*Amon binôme Rekia*

*À ma chère amie Houda, et mes meilleurs amis*

*À tous ceux qui me sont chers et qui sont aujourd'hui absents.*

**IMANE**

---

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales qui furent le principal recours de la médecine de nos grands-parents, nous nous sommes intéressés à l'étude des paramètres (Indice de réfraction pouvoir rotatoire la densité relative), critères physiques ainsi qu'à l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobiennes de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation des feuilles de *L. citriodora* en utilisant le Clevenger a donné un rendement de 1.50%. Les résultats des critères physiques ont montré que cette huile est d'une couleur jaune à orange, avec une odeur citronnée. Et les paramètres physique enregistre un Indice de réfraction (87.1), pouvoir rotatoire (+35°/+36.5°) et la densité relative (0.94).

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle par la technique du DPPH donné un pourcentage d'inhibition des radicaux libres estimé à 82.18% pour une concentration de 94µg.ml<sup>-1</sup>, avec une IC<sub>50</sub> égale à 16µg.ml<sup>-1</sup>. Ce qui nous indique que l'huile essentielle de *Lippia citriodora* possède une activité antioxydante intéressante.

Le criblage primaire de l'activité antibactérienne réalisée par la méthode d'aromatogramme a montré une efficacité importante contre les souches : *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* 25912, *Escherichia coli* 27 et *Micrococcus luteus* à différentes concentrations (½ ¼ ¾). Les plus faibles CMI étaient vis-à-vis d'*Escherichia coli* 27 (1.468±1.783mg.ml<sup>-1</sup>), *Bacillus subtilis* (23.5±9.482mg.ml<sup>-1</sup>), et *Enterococcus faecalis* (23.5±23.5mg.ml<sup>-1</sup>). Le calcul du rapport CMB/CMI a montré le caractère bactéricide de cette huile essentielle.

L'activité antifongique de *Lippia citriodora* réalisée par la microatmosphère a montré une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne contre *Penicillium sp*, *Fusarium oxysporum*, *F.graminearum*, *Alternaria solani*, mais sans activité vis-à-vis des deux espèces *Aspergillus* et la levure *Candida albicans*.

Ces résultats sont très encourageants et montrent l'intérêt à identifier les composés impliqués dans le processus de l'inhibition des bactéries et fungi pathogènes dans une étude future.

**Mots clés :** huile essentielle, *Lippia citriodora*, activité antioxydante, activité antibactérienne, activité antifongique.

---

## Abstract

Within the work of the valorization of the medicinal plants which were the principal recourse of the medicine of our grandparents, we interested in the present study to determine the parameters (refractive index, rotatory power, relative density), physical criteria and screen the antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Lippia citriodora*.

The extraction of the essential oil from leaves using hydrodistillation (Clevenger) gave a yield of 1.50%. The results of the physical criteria showed that the color of oil is yellow to orange, with a lemony odor. The physical parameters recorded a Refractive Index (87.1), rotatory power (+35°/+36.5°) and relative density (0.94).

The evaluation of the antioxidant activity by the DPPH technique demonstrated a percentage of inhibition of free radicals estimated at 82.18% for a concentration of 94µg.ml<sup>-1</sup>, with an IC<sub>50</sub> equal to 16µg.ml<sup>-1</sup>. These results indicate that the essential oil of *Lippia citriodora* has an interesting antioxidant activity.

The primary screening of antibacterial activity performed by the aromagram method showed significant efficacy against: *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* 25912, *Escherichia coli* 27 and *Micrococcus luteus* at different concentrations (½ ¼ ¾). The lowest MICs were shown against *Escherichia coli* 27 (1.468±1.783mg.ml<sup>-1</sup>), *Bacillus subtilis* (23.5±9.482mg.ml<sup>-1</sup>), and *Enterococcus faecalis* (23.5±23.5mg.ml<sup>-1</sup>). The MBC/MIC ratio demonstrated the bactericidal character of this essential oil.

The antifungal activity of *Lippia citriodora* realized by the microatmosphere method indicated the capacity the inhibition mycelial growth against *Penicillium sp*, *Fusarium oxysporum*, *F.graminearum*, *Alternari asolani*, however, non activity was detected towards the two species of *Aspergillus* and the yeast *Candida albicans*.

These results are very interesting and demonstrate the importance to identify the compounds that exhibits the inhibition toward bacteria and pathogenic fungus in future studies.

**Key words:** essential oil, *Lippia citriodora*, antioxidant activity, antibacterial activity, antifungal activity.

في إطار تثمين النباتات الطبية التي كانت الملاذ الرئيسي لطب أجدادنا لهذا الغرض تمت دراسة الزيت الأساسي لنبات *Lippia citriodora* تم تقييم الكثافة النسبية والقدرة الدورانية، مؤشر الانكسار والمعايير الفيزيائية وكذلك تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والميكروبات للزيت الأساسي

يتم استخراج الزيت الأساسي عن طريق التقطير المائي لأوراق *L. citriodora* باستخدام Clevenger أعطى عائدا قطره 1.50 □ أظهرت النتائج المعايير الفيزيائية ان لون هذا الزيت اصفر الى برتقالي اللون , مع رائحة الليمون وتسجل المعلمات الفيزيائية معامل الانكسار (87.1), الدوران البصري (35°/36.5°) والكثافة النسبية (0.94)

تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيت الأساسي بتقنية DPPH بالنظر إلى نسبة تثبيط الجذور الحرة المقدرة ب82.18 □ ليساوي 16 ميكروغرامم 1- . الذيبيينلنا بذلك بتركيز 94 ميكروغرامم 1- ومنه نستنتج ان هناك نشاط مضاد للأكسدة

أظهرت طريقة الرسم البياني النمطي للنشاط المضاد للبكتيريا فعالية كبيرة ضد السلالات *Salmonella typhi, E.coli 25912, E.coli 27, Micrococcus, Luteus E.faecalis* بتركيزات مختلفة (¼ ¼ ½)، كانت أصغر قيمة ل CMI ضد *Escherichia coli* (1.468 ± 23.5mg.ml-1)، *Bacillus subtilis* (23.5 ± 9.482mg.ml-1)، *E. Faecalis* (23.5 ± 1.783mg.ml-1) أظهر حساب نسبة CMB / CMI طبيعة مييد الجراثيم لهذا الزيت الأساسي .

أظهر النشاط المضاد للفطريات لـ *Lippia citriodora* المنفذ بواسطة microatmosphere قدرة مثبطة للنمو الفطري ضد *Penicillium sp* و *Fusarium oxysporium* و *Alternaria solani* و *graminearum* ، ولكن بدون نشاط ضد النوعين *Aspergillus* و *Candida albicans* خميرة.

هذه النتائج مشجعة للغاية وتظهر الاهتمام في تحديد المركبات المشاركة في عملية تثبيط البكتيريا المسببة للأمراض والفطريات في دراسة مستقبلية.

الكلمات المفتاحية: زيت أساسي ، *Lippia citriodora* ، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للفطريات

---

## Table des matières

Liste des abréviations.....	X
Liste des figures .....	XI
Liste des tableaux.....	XII
Introduction générale .....	1

### Partie bibliographique

Chapitre I. Importance des plantes aromatiques et médicinales .....	4
1. Généralités .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2. Définition et description .....	5
2.1. Classification et taxonomie .....	5
3. Phytothérapie .....	6
4. Habitat, culture et récolte de <i>L. citriodora</i> .....	7
5. Dénominations vernaculaires.....	7
6. Activités biologiques .....	7
6.1 Activité antioxydante.....	8
6.2 Activité antibactérienne et cytotoxique .....	8
6.3. Activité insecticide .....	8
7. Composition chimique de <i>Lippia citriodora</i> .....	8
Chapitre II. Principes actifs des plantes aromatiques, procédés d'extraction et analyses .....	9
1. Huiles essentielle (Généralités) .....	10
2. Biosynthèse.....	10
2.1. Voie des Terpenoïdes .....	10
2.2. Voie des Phenylpropanoïdes .....	10
3. Répartition et localisation dans la plante .....	10
4. Méthode d'extraction des huiles essentielles.....	11
5. Méthodes d'analyse des huiles essentielles .....	12
6. Toxicité des huiles essentielles .....	13
7. Les activités biologiques des huiles essentielles.....	14
7.1 Activité antioxydante.....	14
7.2 Activité antimicrobienne .....	14

---

## Partie expérimentale

1. Matériel végétal .....	17
2. Méthode d'extraction d'huile essentielle .....	17
3. Conservation d'huile essentielle obtenue .....	17
4. Etude physique.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.1 Densité relative .....	18
4.2 Pouvoir rotatoire .....	18
4.3 Indice de réfraction .....	18
5. Etude biologique .....	18
5.1 Etude de l'activité antioxydants (méthode de DPPH).....	18
5.2 Etude de l'activité antimicrobienne .....	19

## Résultats et discussion

1. Rendement .....	27
2. Etude physique.....	28
3. Activité antioxydante (méthode de DPPH) .....	29
4. Etude de l'activité antimicrobienne .....	31
4.1 Evaluation de l'activité antibactérienne .....	31
4.2 Activité antifongique .....	40
Conclusion et perspectives.....	44
Références bibliographiques.....	49
ANNEXE .....	58

---

## Liste des abréviations

**A asc** : Acide ascorbique

**AFNOR** : Association Française de NORmalisation

**ATCC** : American Type culture Collection

**BN** : Bouillon Nutritif

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CFU** : Colony Forming Unit

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse

**DMSO** : Diméthyle sulfoxid

**DPPH** : Diphénylpicrylhydrazyle

**g** : gram

**GPC/SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

**IPP** : isopentylpyrophosphate

**MHA** : Muller Hinton agar

**nm** : nanomètre

**PDA** : Potatoes Dextrose Agar

**PEP** : le phosphoenolpyruvate

**RMN** : La Résonance Magnétique Nucléaire

**IC<sub>50</sub>** : Concentration nécessaire pour atteindre une disparition de 50% de DPPH.

**ISO** : international organization for standardization

**m** : la masse

**µl** : microlitre

---

## Liste des figures

**Figure 1** *Lippia citriodora* (fraîche et séchée)

**Figure 2** Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type Clevenger

**Figure 3** Les sept souches fongiques testées.

**Figure 4** Huile essentielle de *Lippia citriodora*

**Figure 5** Pourcentage d'inhibition d'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

**Figure 6** Valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique et huile essentielle de *Lippia citriodora*

**Figure 7** les diamètres d'inhibition de différentes souches bactériennes vis-à-vis différentes concentrations d'huile essentielle.

**Figure 8** l'activité antibactérienne d'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

**Figure 9** Détermination de la CMI d'huile essentielle de *Lippia citriodora* sur les souches bactériennes testées appartenant des microplaques.

**Figure 10** les CMB d'huile essentielle de *Lippia citriodora* sur différentes souches bactériennes testées.

**Figure 11** les diamètres d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques de l'huile essentielle

**Figure 12** l'activité antifongique d'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

---

## Liste des tableaux

*Tableau 1* Classification systématique de *Lippia citriodora*

*Tableau 2* Dénominations vernaculaires internationales de *Lippia citriodora*

*Tableau 3* la composition chimique de *Lippia citriodora*.

*Tableau 4* Expression des diamètres des zones d'inhibitions

*Tableau 5* Les paramètres physique et rendement de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

*Tableau 6* Les caractères physiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

*Tableau 7* les souches bactériennes testées

*Tableau 8* Diamètres d'inhibition des différentes souches bactériennes en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

*Tableau 9* Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

---

# **Introduction**

## **générale**

---

La médecine traditionnelle existe depuis toujours, elle représente la somme totale des compétences, des connaissances et des pratiques qui reposent, rationnellement ou non, sur les croyances et les expériences propres à une culture et qui sont utilisées pour maintenir les êtres humains en bonne santé ainsi que les prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir des maladies physiques ou mentales (**OMS, 2000**). Grace à l'attraction croissante pour les produits naturels, certains d'entre eux, d'origine végétale ou des compléments à des composés synthétiques de l'industrie chimique, sont devenus des alternatives efficaces, sans effets secondaires manifestés (**BAKKALI et al., 2008**).

Traditionnellement, les plantes aromatiques ont été employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments (**WANG et al., 2010**). La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles *via* leur métabolites secondaires (**RASHID et al., 2010**). Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités antibactérienne, antifongique et antioxydante (**DUNG et al., 2008**), et d'autre part, la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances GRAS (Generally Recognized As Safe), utilisées en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires (**GACHKAR et al., 2007; RASOOLI et al., 2008**). Les huiles essentielles sont couramment utilisées comme aromatisants dans les produits alimentaires, les boissons, en cosmétique, en parfumerie et comme un produit pharmaceutique à base des plantes dans la phytothérapie (**LAHLOU, 2004; SAID et al., 2015**).

Parmi les plantes les plus consommées, la verveine citronnelle ou odorante (*Lippia citriodora* ou *Aloysia triphylla*) est connue pour ses propriétés biologiques et médicinales. Les huiles essentielles extraites de la verveine citronnelle par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Appréciée pour ses propriétés aromatiques, antioxydants, antimicrobiennes, antispasmodiques, antidépressive, sédatrice, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle (**LENOIR, 2011**). Elle est riche en composés phénoliques (polyphénols et flavonoïdes) et son usage traditionnel connu et fréquent dans le monde (**BELKAMEL et al., 2018**).

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques et médicinales en Algérie, il nous semble donc, intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherches. Ainsi, nous

nous sommes intéressés à l'étude des paramètres et critères physiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* ainsi qu'à l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobiennes.

Cette étude comporte deux parties essentielles, la première partie relative à l'étude bibliographique et la seconde partie réservée à l'étude expérimentale. Dans le premier chapitre de la partie bibliographique, nous présenterons les connaissances et généralités sur la plante *Lippia citriodora* à savoir : description, classification /taxonomie et aussi sa composition chimique. Tandis que le second chapitre regroupera des connaissances sur les huiles essentielles et les méthodes de leurs extractions.

Dans la partie expérimentale, nous citerons les techniques et les méthodes employées pour obtenir l'huile essentielle, les activités antimicrobienne et antioxydante suivi par les résultats obtenus ainsi que leur discussion et on finira par une conclusion et des perspectives.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

**Chapitre I.**

**Importance des**

**plantes aromatiques**

**et médicinales**

## 1. Généralités

Les plantes médicinales sédatives fournissent une alternative intéressante à l'utilisation de molécules de synthèse telles que les benzodiazépines, par le peu d'effets indésirables qu'elles entraînent et le faible risque de dépendance.

Le genre *Lippia* comprend une grande diversité génétique, ce qui lui permet de synthétiser une variété des constituants de l'huile essentielle dans des plantes cultivées dans les différentes parties du monde (SLIMANI & DAHMANE, 2013)

## 2. Définition et description

*Lippia citriodora* (Kunth.) est un sous arbrisseau vivace de la famille des *Verbenaceae* (LENOIR, 2011) mesurant 1,50 à 3,00 m de hauteur (DE FIGUEIREDO et al., 2002). Les tiges sont anguleuses, cannelées à branches droites et ramifiées (CHEURFA & ALLEM, 2015), portant des feuilles vertes pâles, allongées, celle-ci ont une longueur de 3 à 7 centimètres et une largeur de 1 à 2 centimètres, verticillées par trois ou quatre sur les tiges, à pétioles très courts, rudes au toucher. Les feuilles dégagent une odeur caractéristique de citron lorsqu'elles sont froissées. Les fleurs longues, disposées en épis, possèdent quatre pétales soudées à la base en un tube et étalés en quatre lobes bicolores: blancs sur la face externe et bleu violacé sur la face interne (GHEDIRA & GOETZ, 2017). (figure1)



*Figure 1* *Lippia citriodora* (fraîche et sèche)

### 2.1. Classification et taxonomie

#### 2.1.1. Noms communs

Selon PIERRE & LIS (2002), *Lippia* vient du nom de lippia, un botaniste du XVII<sup>e</sup> siècle, qui laissa son nom gravé pour marquer la plante; 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.

### 2.1.2 Classification de *L. citriodora*

Selon **TALEB-TOUDERT K. et al., (2002)**, *L. citriodora* est classée comme mentionné dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 1** Classification systématique de *Lippia citriodora* (**TALEB-TOUDERT et al., 2002**)

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

## 3. Phytothérapie

Les feuilles, les parties aériennes et les fleurs de verveine odorante sont les parties utilisées de la plante. L'infusé de ses feuilles est consommé traditionnellement comme traitement gastro-intestinal et sont considérées comme particulièrement efficace pour le traitement des douleurs stomacales et l'indigestion. (**PASCUAL et al., 2007**). Elle est agréable à boire et s'emploie surtout dans les ballonnements, les brûlures d'estomac (**PASCUAL et al., 2007; SAIDI, 2013**). La verveine odorante est également utilisée contre les états nerveux, les palpitations, les migraines, les bourdonnements d'oreille et les vertiges (**SAIDI, 2013**).

La verveine odorante peut également être consommée pour ses propriétés antispasmodiques ainsi que pour lutter contre la fièvre et de la grippe, l'asthme, le rhume, la fièvre elle est utilisée pour lutter contre les l'insomnie et l'antixiété (**ABUHAMDAH & MOHAMMED, 2013**).

Elle est également utilisée pour baisser le taux de glycémie. Les feuilles peuvent également être utilisées comme assaisonnement dans certaines préparations culinaires (**PASCUAL et al., 2007**). Les huiles essentielles de *L. citriodora* sont utilisées dans le traitement des cancers (**YOUSEF ZADEH & MESHKATALSADAT, 2013**).

#### 4. Habitat, culture et récolte de *L. citriodora*

Comme plante aromatique et ornementale, la verveine odorante est cultivée sous les climats tempérés. Elle s'accommode sur tous les types des sols et exige une quantité d'eau importante (PASCUAL *et al.*, 2007). Cette plante s'acclimate sur un sol perméable, bien drainé et dans des endroits ensoleillés ou semi- ombragés, abrités des vents froids. Elle exige un sol frais en Été, sans excès d'humidité afin d'éviter la pourriture des racines. Elle doit être paillée en Hiver pour la protéger du gel, car elle ne supporte pas des températures inférieures à 4 °C (BOTREL, 2001).

On procède à deux récoltes des feuilles, quand la plante fleurit Juillet-Août en France, généralement entre mi-Juillet et mi-October dans les autres régions du monde. Ceci permet de récolter de six à neuf tonnes de feuilles fraîches par hectare, qui seront par suite séchées à l'ombre, dans des abris aérés. (BONJEAN, 2001).

#### 5. Dénominations vernaculaires

Le nom commun "Verveine odorante" provient du latin "verbena", qui signifiait "branche feuillue" (Palau, 2001). Les autres dénominations sont mentionnées dans le tableau 2.

*Tableau 2 Dénominations vernaculaires internationales (GHEDIRA & GOETZ, 2017).*

Langues	Dénominations
Français	verveine vraie, verveine citronnée ou verveine du Pérou
Anglais	lemon verbena, lemon beebrush
Allemand	Zitronenstrauch, Zitronenduftstrauch
Italien	Verbena odorosa
Espagnol	Cedrón, hierba luisa, verbena de Indias
Portugais	Lúcia-lima, bela-lucia, erva-cidreira, cidró, cidrão, etc.
Guarani	Cedrón
Japonais	レモンバーベナ (Remonbābena)
Arabe	(لويضة) Louiza laymunia

#### 6. Activités biologiques

La verveine citronnelle est une plante médicinale qui contient des flavonoïdes et des acides phénoliques. (KASKOOS, 2019). Ces composés phénoliques seraient responsables de la plupart des activités biologiques de la verveine citronnelle (CARNAT *et al.*, 1999 ; PASCUAL *et al.*, 2001 , QUIRANTES-PINE *et al.*, 2009) telles que les effets analgésiques, anti-inflammatoires et antioxydants (NAKAMURA *et al.*, 1997, LAPORTA *et al.*, 2004).

### 6.1 Activité antioxydante

L'infusé de *L. citriodora* présente une forte activité de piégeage du radical superoxyde et une activité plus modérée vis-à-vis du radical hydroxyle et de l'acide hypochloreux (VALENTAO *et al.*, 2002).

L'extrait de la verveine citronnelle a montré une forte activité antioxydante dans le milieu lipophile, ce qui indique une capacité à piéger les radicaux libres au niveau des membranes biologiques (FUNES *et al.*, 2009).

### 6.2 Activité antibactérienne et cytotoxique

L'huile essentielle des feuilles d'*L. citriodora* possède un effet antibactérien significatif contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif et une activité cytotoxique contre les lignées cellulaires P815, MCF7 et VERO ainsi que contre les cellules mononucléaires normales du sang périphérique humain a été évaluée. Moulay Ali Oukerrou *et al.* (2017).

### 6.3. Activité insecticide

L'huile essentielle de *L. citriodora* possède une activité insecticide de contre *Callosobruchus maculatus* que *Tribolium confusum* qui attaquent les denrées alimentaires stockées, ce qui indique que l'huile essentielle pourrait être utilisée comme un agent de contrôle potentiel contre les insectes (KHANI *et al.*, 2012)

## 7. Composition chimique de *Lippia citriodora*

La composition qualitative et quantitative des feuilles de la verveine odorante en polyphénols est encore mal connue. Une première analyse de composition de l'infusé a été réalisée par CARNAT *et al.* (1999) et a montré la présence dans de flavonoïdes (tableau 3).

Tableau 3 la composition chimique de *Lippia citriodora*.

<b>Les Flavonoïdes</b>	Salvigénine, eupatorine, eupafoline, 6-hydroxylutéoline, lutéoline, lutéoline-7-O-β-glucoside, hispidutine, cirsimarine, diosmétine, chrysoérol, apigénine, pectolinarigénine et cirsilol
------------------------	---

**Chapitre II. Principes actifs  
des plantes aromatiques,  
procédés d'extraction et  
analyses**

## **1. Huiles essentielle (Généralités)**

Selon la norme AFNOR(2006), l'huile essentielle est définie comme un produit obtenu à partir de la matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits, mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. L'hydrodistillation reste le moyen le plus employé pour produire les huiles essentielles à des fins commerciales (**BURT, 2004**).

## **2. Biosynthèse**

Les Terpenoïdes et les Phénylpropanoïdes sont les deux principales voies de la biosynthèse (**MANN, 1987**).

### **2.1. Voie des Terpenoïdes**

Dans cette voie, l'isopentylpyrophosphate (IPP) est le tronc de base; c'est une molécule à cinq atomes de carbones ayant une structure semi-alvéolaire. Il est dérivé de l'acétyl CoA, issu du phosphoenolpyruvate (PEP) provenant directement du fructose. La construction des squelettes hydrocarbonés a lieu par la juxtaposition "tête à queue" d'unités isopréniques, avec les unités pentacarbonés ramifiées assemblées enzymatiquement. Ainsi, on trouve des squelettes hydrocarbonés à dix carbones (monoterpènes), à quinze carbones (sesquiterpènes) et plus rarement, à vingt carbones (diterpènes) (**MANN, 1987**).

### **2.2. Voie des Phénylpropanoïdes**

Cette voie débute par le métabolite issu du fructose, le phosphoenolpyruvate (PEP). Elle génère un grand nombre de substances aromatiques, *via* une série d'acides. Les métabolites terminaux importants en thérapeutique sont les acides aromatiques suivants : acide salicylique, cinnamique, benzoïque et ainsi que leurs esters dont le salicylate de méthyle, les cinnamates, les benzoates, certains phénols et les coumarines. Quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles sont aussi produites par cette voie comme les tannoïdes et les flavonoïdes (**SPURGEON & PORTER, 1981**).

## **3. Répartition et localisation dans la plante**

Les huiles essentielles sont répandues dans la plupart des plantes, généralement en petites quantités. Cependant, ils sont produits en quantité suffisante par des plantes dites aromatiques, réparties en plusieurs familles. (**LARDRY & HABERKORN 2007**).

Ces plantes aromatiques se caractérisent par la présence de cellules qui sécrètent des huiles essentielles dans la quasi-totalité de leurs organes. Ces cellules sont des structures tissulaires sécrétoires spécialisées dans la synthèse et le stockage de l'huile essentielle. Il est donc possible d'obtenir de l'huile essentielle de la plante entière ou seulement à partir des parties séparées de la plante, telles que les fleurs, les feuilles, les fruits ou les racines ; mais aussi, à partir des bourgeons, des graines, des racines, de l'écorce (tiges, tronc et racines), des tiges et des brindilles (**BRENES&ROURA 2010 ; BOUHADID et al. 2012 ; KALUSTIYAN &HADJI MINAGLOU 2013**).

### **4. Méthode d'extraction des huiles essentielles**

Le procédé d'obtention des huiles essentielles intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (**GARNERO, 1991**). Plusieurs méthodes sont utilisées pour l'extraction des huiles essentielles.

#### **a. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau**

Ce système fonctionne sur l'exposition du matériel végétale à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatiles sont intensifiées puis décantées dans l'essencier avant d'être séparées en une phase aqueuse et en phase organique (**BOUKHATEM et al., 2019**).

#### **b. Extraction par hydrodistillation**

Dans ce système d'extraction, la matière première est immergée dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement faite à pression atmosphérique, la distillation peut s'épuiser avec ou sans symbiose des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation. Cette technique présente des inconvénients dus à l'effet de la vapeur ou de l'eau bouillante; certains parties de la plante, notamment les fleurs, sont très fragiles et ne supportent pas ce type de traitement (**BOUKHATEM et al., 2019**).

#### **c. Expression à froid**

La méthode est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique qui consiste à démonter et casser les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe situé juste sous l'écorce du fruit, l'épicarpe, pour en recueillir le contenu qui n'a subi aucune modification (**BOUKHATEM et al., 2019**).

**d. Extraction par solvant organique**

Elle consiste à immerger dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale sous réserve de traitement pendant une période de temps déterminée après décantation et concentration. Ensuite, le solvant est éliminé par distillation partielle. L'extraction est effectuée pour obtenir de « concrète », mélange de substances aromatiques volatiles avec de la cire et des acides gras à partir d'organes végétaux très fragiles qui ne tolèrent pas la chaleur (thermolabiles) (ZIEMONS, 2006).

**e. Extraction assistée par micro-ondes**

L'avantage de cette technique est de diminuer considérablement le temps de distillation et d'augmenter le rendement. Dans cette technique, la matrice végétale est placée dans micro-ondes dans une enceinte close pour le chauffer sous pression réduite de manière séquentielle. Les composés volatiles sont transportés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre de la plante. Puis par des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation, et les composés volatiles sont restaurés. (BOUKHATEM *et al.*, 2019)

**f. Extraction par CO<sub>2</sub> supercritique**

Le CO<sub>2</sub> supercritique (sous pression et réfrigéré) est un solvant idéal pour extraire des composés volatiles. Dans cette technique, la matière végétale est déposée dans l'extracteur, ensuite le CO<sub>2</sub> supercritique est introduit puis le mélange est recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO<sub>2</sub> s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle (GROSSO *et al.* 2008 ; SAFARALIE *et al.* 2008)

**g. Extraction par enfleurage**

Ce procédé consiste à placer des plantes en particulier des organes fragiles sur une couche de graisse animale qui se sature en essence puis, on épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (BELAICHE, 1979 ; FRANCE IDA, 1996).

**5. Méthodes d'analyse des huiles essentielles**

Il existe plusieurs techniques complexes pour l'analyse des huiles essentielles, cette diversité des techniques est due au nombre de composants chimiques volatils mais aussi, à la détermination des composés traces qui font la caractéristique propre à l'huile (FRANCE-IDA, 1998).

### **a. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

C'est la technique de référence dans l'analyse des huiles essentielles (LEHOTAY & HAJŠLOVA, 2002). Elle met en œuvre des substances gazeuses ou susceptibles de s'évaporer sans se décomposer dans l'injecteur. Le gaz vecteur (hélium, azote, argon ou hydrogène) est le gaz de phase mobile. Le principe de CPG est basé sur la séparation des divers solutés gazeux le long de la phase stationnaire selon la migration différentielle (AUDIGIE *et al.*, 1995).

### **b. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM)**

Bien que la séparation chromatographique soit la seule qui permet de bien séparer les différents composants du mélange, il est difficile de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine.

Le principe de cette technique basé sur le transfert des composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse, par le gaz vecteur (DESJOBERT *et al.* 1997; BRUNETON, 1999).

### **c. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

La RMN est une méthode exceptionnelle pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou artificielle grâce à la diversité des paramètres mesurables. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait qu'elle fournit des informations précises et individuelles sur la grande majorité des atomes qui composent la molécule, donnant ainsi la possibilité d'identifier les liens entre les atomes de différentes entités des groupes fonctionnels ce qui permet la détermination de la structure. Pour les molécules de taille moyenne, les méthodes RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent efficaces pour atteindre l'objectif fixé (PLATZER, 2002).

## **6. Toxicité des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont populaires, de plus en plus utilisées, et tendent à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques comme l'aromathérapie. Cependant, ces huiles ne sont pas des produits sans risques comme tous les produits naturels. Certaines d'entre elles sont dangereuses si elles sont appliquées sur la peau et provoquent des irritations (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), des allergies (huiles riches en cinnamaldéhyde)

(SMITH *et al.*, 2000) ou bien elles sont phototoxiques (huiles de citrus contenant des furocoumarines) (NAGANUMA *et al.*, 1985 ; ABID & LAIFAOU, 2017).

## **7. Les activités biologiques des huiles essentielles**

### **7.1 Activité antioxydante**

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance capable, à une concentration relativement faible, de rivaliser avec d'autres substrats antioxydants et donc de retarder ou d'empêcher l'oxydation du substrat.

Ces composés sont produits quotidiennement par l'organisme (SHAHIDI, 1997), hautement interactifs avec un seul électron et sont nécessaires aux mécanismes vitaux (BARTOSZ, 2003). Cependant, ils deviennent nocifs lorsqu'ils sont excessifs et stimulent certains dommages à la structure des protéines, des acides gras (POURRUT, 2008), et des acides nucléiques (FAVIER, 2003). Ces dommages provoquent un stress oxydatif qui contribue à l'accélération du processus de vieillissement cellulaire et au développement des maladies telles que la maladie d'Alzheimer (BUTTERFIELD & LAUDERBACK, 2002), l'athérosclérose et le cancer (GARDNER, 1997).

En raison des effets secondaires indésirables des antioxydants synthétiques tels que la toxicité et le cancer, l'intérêt a considérablement augmenté pour trouver des antioxydants naturels adaptés à une utilisation dans les aliments et / ou en médecine (BAMONIRI *et al.* 2010). Certains travaux ont rapporté que quelques huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques (HUSSAIN *et al.*, 2008, 2010).

### **7.2 Activité antimicrobienne**

Les huiles essentielles sont connues pour posséder l'activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (GACHKAR *et al.*, 2007; RASOOLI *et al.*, 2008)

#### **7.2.1 Activité antibactérienne**

Pour lutter contre les bactéries pathogènes particulièrement le problème de la résistance bactérienne aux agents thérapeutiques connus, les chercheurs doivent trouver des nouvelles molécules antimicrobiennes pour inhiber ces bactéries pathogènes (RUDRAMURTHY *et al.*, 2016).

Ainsi, les huiles essentielles sont exploitées dans le contrôle de diverses maladies infectieuses (MULYANINGSIH *et al.* 2010). L'effet antimicrobien des huiles essentielles et de leurs composants chimiques a été rapporté par de nombreuses études antérieures (DUSCHATZKY *et al.* 2005 ; LANG & BUCHBAUER, 2012 ; AKHTAR *et al.*, 2016).

L'action des huiles essentielles est pratiquée sur un large éventail de bactéries : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Selon la paroi cellulaire, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action d'Huiles essentielles (RAUT & KARUPPAYIL, 2014). En revanche, les bactéries à Gram négatif sont moins sensibles au fonctionnement des huiles essentielles, car elles ont une membrane externe imperméable qui empêche la pénétration de ces molécules (LOUIS & OSOBEL, 2006).

### 7.2.2 Activité antifongique

Les huiles essentielles sont utilisées comme une source pour des médicaments antifongiques soit sous leur forme pure soit diluée pour une optimisation thérapeutique plus efficace et plus sûre (PERALTA *et al.*, 2015).

Les huiles essentielles contiennent des composés phénoliques, ces derniers altèrent la perméabilité des cellules fongiques en interagissant avec les protéines membranaires. Cela conduit à une distorsion de la structure cellulaire, une perturbation de la fonction entraînant une perte de macromolécules et une inhibition de la croissance fongique (BARILSI *et al.*, 2012). L'exposition des cellules fongiques à l'huile essentielle conduit généralement, à la coagulation des composants cellulaires dus à des dommages irréversibles de la membrane cellulaire. Chez la levure, l'huile essentielle établit un potentiel membranaire en perturbant la production d'ATP, ce qui conduit à la lyse cellulaire (ALEKSIC & KNEZEVIC, 2014).

Les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer et de perturber la paroi cellulaire des champignons et des membranes cytoplasmiques grâce à un processus de perméabilisation, ce qui conduit à la désintégration des membranes mitochondriales. Ceci est causé par des altérations dans le flux. Cela peut aussi endommager les lipides, les protéines et les acides nucléiques contenus dans les cellules infectées par les champignons pathogènes (ARNAL-SCHNEBELEN *et al.*, 2004)

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

### 1. Matériel végétal

Les feuilles sèches de *Lippiacitriodora* (*verveine odorante*) ont été achetées chez un herboriste de Tlemcen

### 2. Méthode d'extraction d'huile essentielle

L'extraction a été réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger. Avant l'emploi, l'appareil a été rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières probablement présentes dans l'appareil. (figure2). Jusqu'à l'ébullition pendant 2h°.



*Figure2* Dispositif d'extraction d'huile essentielle de type Clevenger (photo personnel)

### 3. Conservation d'huile essentielle obtenue

Huile essentielle a été conservées dans un tube en verre enveloppée dans du papier d'aluminium et mise dans le réfrigérateur.

### 4. Propriétés physique

Selon la norme NF ISO 4731 :2006 (NF T 75-212), les caractères physiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Nos essais ont été effectués selon un protocole précis obéissant.

### 4.1 Densité relative

Selon la **Norme NFT 75-111, ISO 279-1981**, la densité relative est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à la masse d'un volume égal d'eau distillée.

La détermination de la densité des huiles essentielles de *L. citriodora* est réalisée à l'aide d'un tube sec d'une capacité de 4 ml, le volume prélevé est de 0.2 ml d'huile essentielle, ainsi que pour l'eau, la formule est comme suite :

$$D_{20} = \frac{m_1 - m_0}{m - m_0}$$

$m_1$  → masse du tube rempli d'huile essentielle

$m$  → masse du tube rempli d'eau

$m_0$  → masse du tube vide

### 4.2 Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire est la propriété que présentent certaines substances chimiques de dévier le plan de polarisation de la lumière polarisée, ce qui signifie un atome asymétrique.

La technique consiste à préparer une solution éthanoïque d'huile essentielle de 0,2g/100 ml d'éthanol. Ensuite, remplir le tube avec la solution préparée en assurant la disparition complète des bulles d'air interposées puis, ce tube est placé dans le polarimètre, qui permet de lire l'angle de rotation de l'échantillon.

### 4.3 Indice de réfraction

Cet indice est le rapport entre le sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré

A l'aide d'un réfractomètre, la technique consiste à déposer une goutte de l'échantillon entre les prismes du réfractomètre, et noter la valeur de l'indice par l'échelle de lecture.

## 5.1. Etude biologique

### 5.1. Etude de l'activité antioxydants (méthode de DPPH)

On prépare la solution de DPPH par solubilisation de 0,005 g de DPPH dans 200 ml de l'éthanol, la couleur de la solution de DPPH est violette. On prépare par la suite, 12 tubes à hémolyse contenant chacun 100 µl de l'éthanol marqués sur le bouchon par l'ordre décroissant, dans la première hémolyse on introduit 100 µl des huiles essentielles de *L.citriodora* et on homogénéise bien puis à l'aide d'une micropipette on prend 100 µl de la première hémolyse et on le verse dans l'autre tube qui contient 100 µl de l'éthanol et on

homogénéise et on procède de la même manière jusqu'à la dernière dilution. Pour chaque dilution on prépare 3 tubes à hémolyse (qui constituent les trois répétitions) et on met 975 µl de la solution éthanolique de DPPH, puis on ajoute 25 µl de chaque dilution des huiles essentielles qu'on laisse 60 minutes à l'obscurité et à température ambiante. Une mesure d'absorbance de l'échantillon contenant 975 µl de la solution éthanolique du DPPH a été considérée comme témoin négatif. Les absorbances sont mesurées directement par le spectrophotomètre à 517 nm après l'avoir taré et remis à zéro par du méthanol. (MANSOURI *et al.*, 2005).

### 5.2 Etude de l'activité antimicrobienne

Nous avons réalisé la méthode de diffusion sur disque (aromatogramme), CMI et CMB pour évaluer l'effet antibactérienne vis-à-vis des 8 souches testées, et la méthode microatmosphère pour déterminer l'activité antifongiques (7 souches fongiques).

#### 5.2.1 Activité antibactérienne

##### a. Confirmation des souches bactériennes

Pour tester l'activité antibactérienne de *L. citriodora*, huit souches de référence provenant du laboratoire de Microbiologie-Centre Universitaire de Naâma ont été utilisées. Afin de s'assurer de leur qualité, l'état frais, la coloration de Gram et test catalase ont été réalisés.

##### i. L'état frais

La technique consiste à déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame en verre propre, puis à l'aide d'une anse de platine stérile, apporter une fraction de la colonie bactérienne à identifier et le dissocier dans la goutte d'eau physiologique, ensuite recouvrir la lame par une lamelle en évitant la formation de bulles d'air, l'observation est réalisée au microscope optique (grossissement 40 et 100)

##### ii. Coloration de Gram

Déposer une goutte d'eau distillée stérile sur une lame propre

Prélever une fraction de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, tout on disperse le mélange par des mouvements circulaires. La lame est séchée et fixée par passage rapide sur la flamme d'un bec Bunsen.

Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60s

Laver l'excès du colorant avec l'eau distillée

Couvrir la préparation par le Lugol pendant 30s

Laver la préparation par l'eau distillée pendant 5s

Rincer immédiatement le frottis avec l'alcool on inclinant la lame et jusqu'à la disparition complète de la coloration violette.

Laver la préparation avec l'eau distillée pendant 5s

Couvrir avec la préparation Fuschine pendant 15s

Laver la préparation avec l'eau distillée pendant 10s

Sécher la lame avec des papiers buvard

Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope (objectif 100)

### **iii. Test catalase**

L'activité catalytique consiste à prélever une colonie et la dissociée dans une goutte d'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ), l'apparition de bulles révélant le dégagement d'oxygène.

### **b. Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune (37° à 24 h) sur Bouillon Nutritif, l'inoculum bactérienne a été préparée. A l'aide d'une micropipette, on prélève 1 ml de BNensemencé et on le met dans 9 ml d'eau physiologique stérile (NaCl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à 580nm doit être entre 0.08 à 0.10, On admet que cette densité mesurée à 580 nm est équivalente à  $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup> (MOHAMMEDI, 2006). L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

### **c. Préparation des disques**

Le papier Wattman N°40 est utilisé pour la préparation des disques de 6 mm de diamètre. Les disques préparés, sont placés dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave, et stockés.

### **d. Méthode de diffusion sur disques (Méthode aromatogramme)**

vingt millilitres de MHA en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne à tester ( $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>) sont étalés en surface par écouvillonnage. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman N°40 (4disques/boite) préalablement imbibé par 15 µl

d'huile essentielle a raison de trois concentration ( $1/2$ ,  $1/4$ ,  $3/4$ ) de *Lippia citriodora* sont déposés à la surface de gélose.

Les boîtes sont maintenues pendant 30 min à température ambiante pour que l'huile essentielle puisse diffuser. Puis, incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h. les zones d'inhibition sont mesurées par suite et l'activité de l'huile essentielle était comparée avec l'échelle de PONCE.A et al (2003). Voir l'échelle

**Tableau 4** Expression des diamètres des zones d'inhibitions (PONCE.A et al.2003)

Diamètre de la zone d'inhibition en (mm)	Sensibilité du germe	
$D < 8$	-	Résistant
$8 < D < 14$	+	Sensible
$14 < D < 20$	++	Très sensible
$D > 20$	+++	Extrêmement sensible

### e. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la concentration la plus faible capable d'inhiber la croissance bactérienne. Elle a été déterminée par la méthode de microdilution en milieu liquide on utilise les microplaques de 96 puits à fond rond.

L'huile essentielle a été diluée dans le DMSO afin d'obtenir des concentrations initiales de  $1/2$  et  $1/4$ ,  $3/4$ . Par suite des dilutions semi-logarithmiques à raison 2 ont été faites à partir du premier puits contenant les concentrations initiales de l'huile essentielle. Enfin, 100µl du Bouillon nutritif (BN)ensemencé par une culture jeune de bactéries ayant une charge de  $10^6$  CFU.ml<sup>-1</sup> ont été rajoutés dans les puits de la microplaque. Les deux derniers puits de chaque ligne représentaient respectivement le contrôle positif (200µl du BNensemencé par la souche étudiée) et le contrôle négatif (200µl du BN stérile). Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 16 à 20 h, par suite, la CMI était déterminée dans le puits qui ne présentait aucune croissance visible à l'œil nu.

**f. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La CMB est définie comme étant la plus faible concentration de l'huile essentielle qui détruit 99.9% de la concentration cellulaire finale.

Les puits de la microplaque n'ayant pas présentés une croissance ont été repiqués en stries sur milieu MHA. Les boites ont été incubées à 37 ° C pendant 24h.

**5.2.2 Activité antifongique**

**a. Préparation des suspensions et préculture des moisissures**

Pour la préparation des suspensions et préculture des moisissures dans des boites de Pétri contenant le milieu Potatoes Dextrose Agar (PDA), On dépose un disque de 6mm de chaque moisissure au centre de chaque boite, et on les incube jusqu'à ce que la croissance mycélienne atteint les bords des boites de Pétri. (Figure 3)

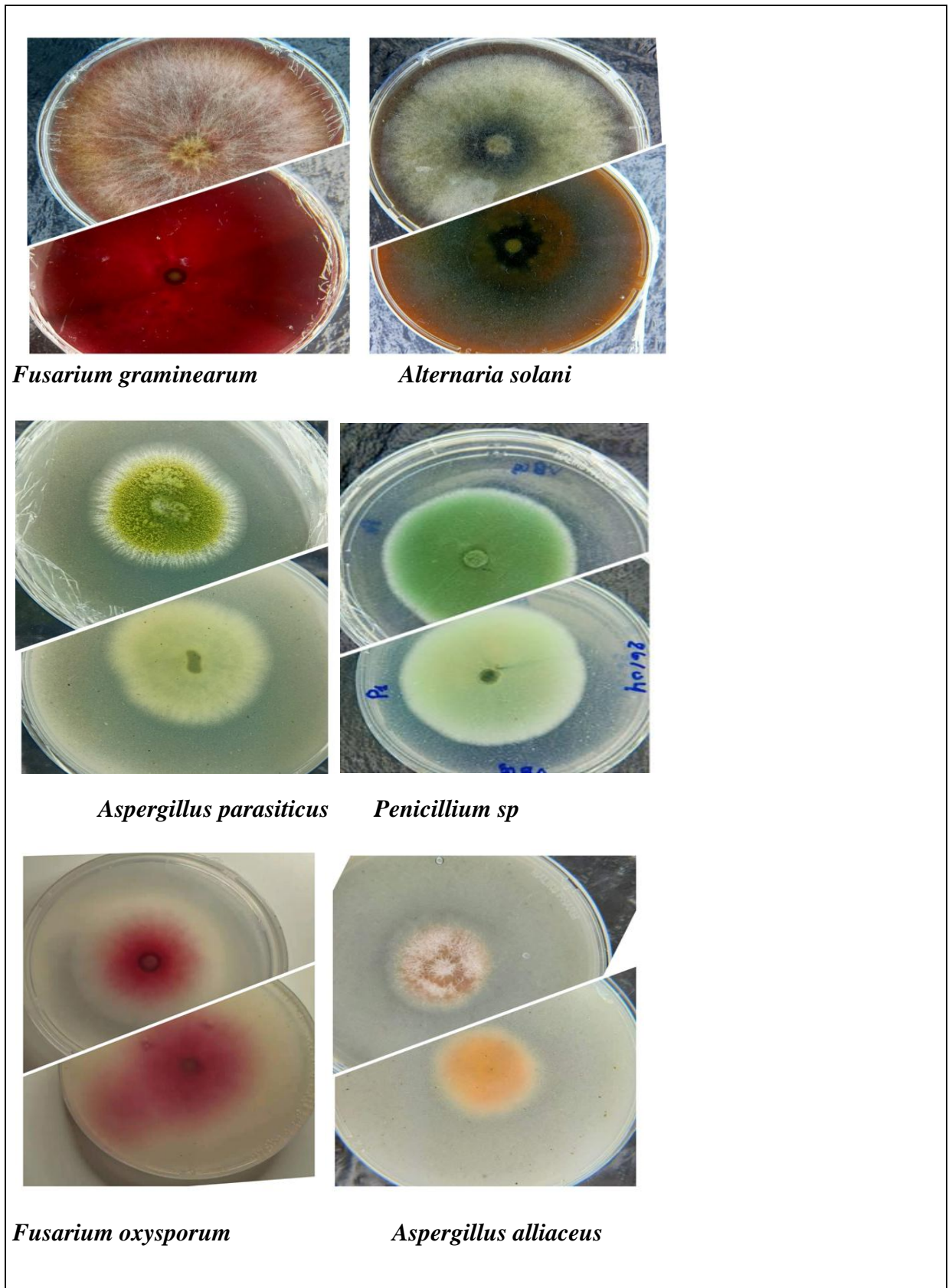


Figure 3 Aspect macroscopique de six moisissures testées.

### **b. Méthode microatmosphère**

L'activité antifongique des composés volatiles de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* a été testée par la méthode des microatmosphères décrite par SINGH *et al.*, (2006) et SIRIPORNVISAL *et al.*, (2009).

Des boîtes de Pétri (90mm de diamètre) contenant 20ml de PDA ont été préparées. Un disque d'agar d'inoculum fongique (6mm de diamètre) a été prélevé de chaque souche fongique à tester et placé au centre des boîtes de Pétri.

Un disque stérile de papier Wattman N°40 (6mm) imbibé par 5µL de l'huile essentielle (sans dilution) a été placé au centre du couvercle déposé en position inversée, sur le couvercle. De chaque boîte de Pétri. Les boîtes sont bien fermées et incubées sur le couvercle de sorte que les composés volatiles puissent atteindre les souches fongiques pendant 2 à 14 jours à 30°C, jusqu'à ce que la croissance dans les boîtes de contrôle atteigne les bords des boîtes de Pétri.

### **c. Activité contre *Candida albicans* (ATCC 26790)**

A été réalisé de la même façon de celle des bactéries (méthode de diffusion sur disque, page 22) sauf que la densité optique comprise entre 0.12 et 0.15, on admet que cette densité mesurée à 580 nm est équivalente à  $10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>. Les boîtes incubées à l'étuve à 30°C pendant 48h.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

Cette étude vise à réaliser une extraction d'huile essentielle des feuilles de *Lippia citriodora*, et contribue à étudier ses paramètres physiques (mesure de la densité relative, pouvoir rotatoire et indice de réfraction), ainsi que la détermination de l'activité biologique par : l'estimation de l'effet antioxydant par le test DPPH, et l'évaluation de l'activité antimicrobienne contre 8 souches bactériennes et 7 champignons.

### 1. Rendement

Nous rappelons que l'huile essentielle a été extraite à partir des feuilles sèches de *Lippia citriodora* par un hydrodistillateur de type Clevenger. Nous avons récupéré une quantité huileuse importante de couleur jaune avec une odeur citronnelle.

Le rendement est calculé selon la formule suivante

**Rendement = le poids (huile essentielle) en g / le poids (matière sèche) en g × 100**

$$R = \frac{9.744g}{650g} \times 100 = 1.50\%$$



**Figure 4** Huile essentielle de *Lippia citriodora*

L'extraction de notre huile essentielle effectuée par l'hydrodistillation a fourni un rendement intéressant de 1.50% obtenus à partir de 3 extractions.

Ce rendement est nettement plus important que celui enregistré par **Saidi, 2014** qui était de l'ordre de 0.22%

Le rendement de l'huile essentielle est fortement lié à plusieurs facteurs à savoir l'espèce, la zone géographique, la période de récolte, les pratiques culturales, la technique d'extraction, Etc. (OLLE&BENDER, 2010)

### 2. Propriétés physique

Les propriétés physiques des huiles essentielles dépendent principalement de trois critères aspect, couleur et l'odeur qui eux même dépendent de l'origine de la plante, des techniques d'extraction utilisées, de la conservation etc. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle extraite à partir de la plante "*Lippia citriodora*" est de couleur jaune à orange avec une odeur citronnée (Tableau5).

**Tableau 5** Paramètres physiques et le rendement de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

Huile essentielle de <i>L. citriodora</i>	Paramètres physiques			Rendement
	Aspect	Couleur	Odeur	1.50 □
	Liquide mobile	Jaune à orange	Citronnée	

Les propriétés physiques des huiles essentielles constituent un paramètre majeur dans la détermination de la qualité de l'huile essentielle.

Une huile essentielle de très haute qualité présente une densité relative et un pouvoir rotatoire plus élevé avec un indice de réfraction très bas. La densité relative inférieure à 1 constitue un critère d'évaluation de la qualité de l'huile essentielle très important dans différents domaines (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire, chimique, etc...)(KANKO et al., 2004). Les résultats obtenus ont montré que le pouvoir rotatoire de l'huile essentielle à une valeur de +35°/+36°. Il est à noter que de ces résultats sont rattachés avec les constituants qui sont considérablement influencés par les conditions édaphiques, climatiques et les pratiques culturales (LIS-BALCHIN, 2002). Par ailleurs, les résultats obtenus de la détermination des propriétés physico-chimiques sont répertoriés sur le Tableau(6)

**Tableau 6** Caractères physiques de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Caractères physicochimiques	Huile essentielle de <i>Lippia citriodora</i>
<b>Densité relative</b>	0.94
<b>Pouvoir rotatoire</b>	+35°/+36.5°
<b>Indice de réfraction</b>	87.1

### 3. Activité antioxydante(méthode de DPPH)

Les plantes sont une source importante de composés antioxydants, ces substances naturelles se présentent sous forme d'un mélange complexe qui assurent la protection de la plante contre le stress (PRATT, 1980 ; MOURE et al., 2001). En effet, l'utilisation des extraits de plantes ou de parties enrichies par ces composés est devenue aujourd'hui une façon très attractive pour conserver les aliments. De plus, il a été démontré que plusieurs produits naturels possédant un pouvoir antioxydant avaient aussi des anti-cancérogènes et anti-inflammatoires (MADHAVI et al., 1995).

Nous avons utilisé la méthode du DPPH. Ce radical libre présente une coloration violette sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes. La forme réduite est d'une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration ainsi que son intensité dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (MOHAMMEDI, 2006).

La figure 5 nous donne une image claire sur l'efficacité antioxydante de l'huile essentielle de *L.citriodora* qui traduit par des pourcentages d'inhibition des radicaux libres frôlant les 82.18% pour une concentration de 94µg/ml d'huile essentielle de cette plante, avec une concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres  $IC_{50} = 16\mu\text{g/ml}$

La concentration inhibitrice  $IC_{50}$  est la concentration nécessaire pour diminuer 50% de concentration de radical libre de DPPH. Plus la valeur d' $IC_{50}$  est faible, plus l'activité antioxydante d'huile essentielle n'est pas forte.

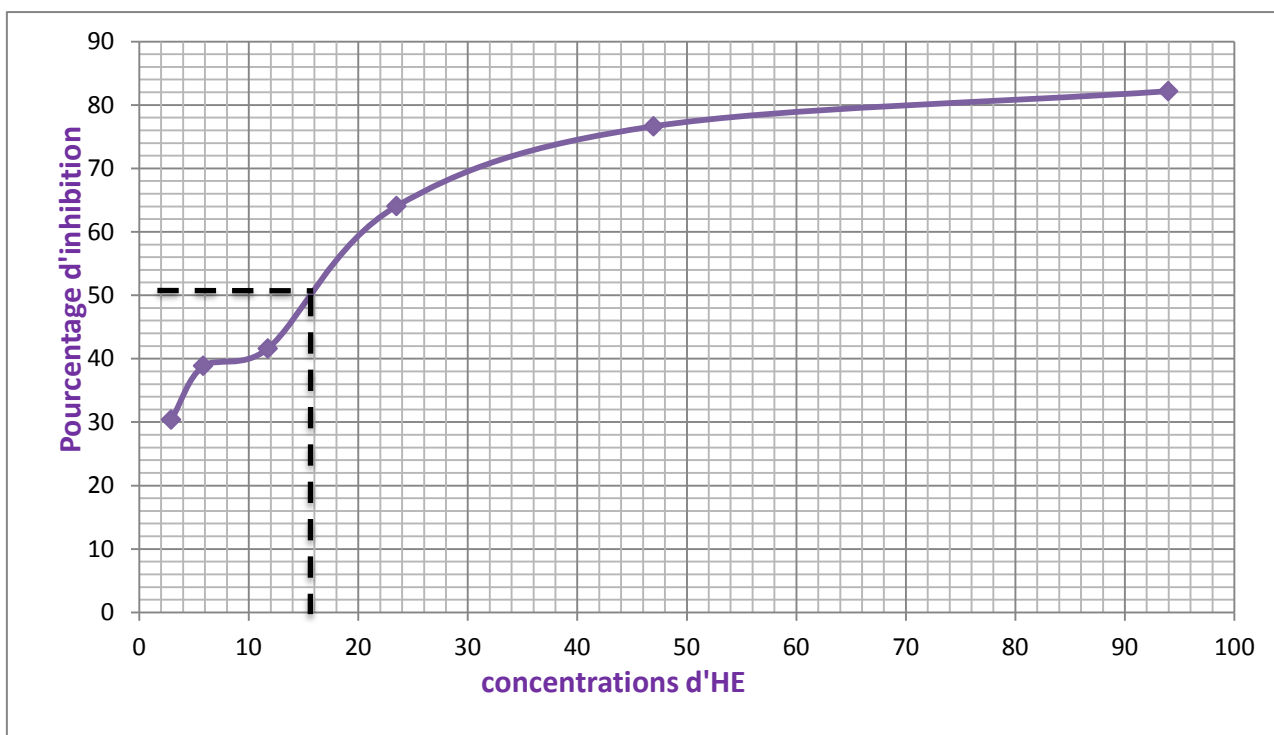


Figure 5 Le pourcentage d'inhibition d'huile essentielle de *Lippia citriodora*.

En comparant l'IC<sub>50</sub> d'huile essentielle, qui est égal à 16  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  avec la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique qui est égale à 5.92  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , on trouve que l'efficacité antioxydante d'huile essentielle est faible en comparant avec l'acide ascorbique (figure6).

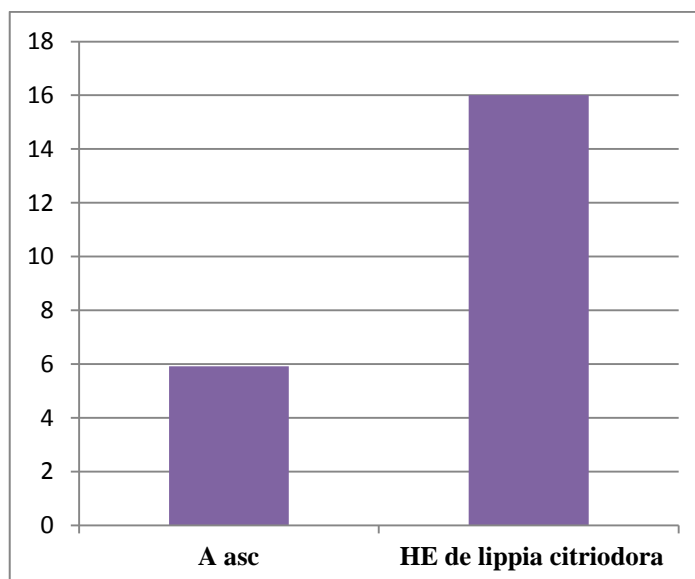


Figure 6 Valeur d'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique et huile essentielle de *Lippia citriodora*

Selon MOTHANA et al. (2008) sur *L. citriodora* du Yemen ont obtenus une IC<sub>50</sub> de 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Dans une autre étude faite par ALAVI *et al.* (2008), ils ont montré une l'activité antioxydante remarquable où la IC<sub>50</sub> était de 3.2±0.15 µg.mlmg.ml<sup>-1</sup> en raison du pourcentage élevé des monoterpènes oxygénés dans *L.citriodora*.

Selon ZHENG &WANG (2001)la présence de certains phénols dans l'huile *L. citriodora* augmente l'activité antioxydante.

#### 4. Etude de l'activité antimicrobienne

Les résultats de l'activité antimicrobienne indiquent que l'huile essentielle de *Lippia citriodora* possède un large spectre d'action sur les souches microbiennes testées.

##### 4.1 Evaluation de l'activité antibactérienne

###### A. Purification des souches bactériennes

L'identification des souches a été réalisée selon les recommandations de (Hammes&Hertel, 2006). L'ensemble des tests des confirmations sont regroupées dans le tableau 7.

Tableau 7 les souches bactériennes testées

Bactéries à Gram positif				
La souche	Forme	Mobilité	Gram	Catalase
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 10876)	Bacilles	+	Positif	Positive
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6363)	Bacilles (irrégulier)	+	Positif	Positive
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 49452)	Cocci	-	Positif	Positive
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	Cocci	-	Positif	Positive
Bactéries à Gram négatif				
La souche	Forme	Mobilité	Gram	Catalase
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25912)	Bacilles	+	Négatif	Positive
<i>Escherichia coli</i>	Bacilles	+	Négatif	Positive

(ATCC 325)				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Bacilles	+	Négatif	Positive
<i>Salmonella typhi</i> (ATCC 13311)	Bacilles	+	Négatif	Positive

L'activité antibactérienne d'huile essentielle évaluée par aromagramme, a permis de révéler une activité intéressante (**Tableau 8**). Les résultats de l'aromagramme indiquent que les souches bactériennes sensibles à toutes les dilutions ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{3}{4}$ ) sont *Enterococcus faecalis* (17,5±5,201mm), *Escherichia coli*25922 (11,5 ±2,273mm), et *E.coli*27 (12±0,9428mm).

D'un autre côté, les souches considérées comme très sensible à une seul concentration d'huile essentielle sont *Salmonella typhi* d'un diamètre de 20± 6,599mm à la dilution  $\frac{3}{4}$ , *Bacillus subtilis* avec un diamètre égale à 20±5,887mm obtenu avec les dilution  $\frac{3}{4}$  et  $\frac{1}{4}$ , et *Micrococcus luteus* dont le diamètre était de 14 ± 3,7712mm à la dilution  $\frac{1}{2}$ .

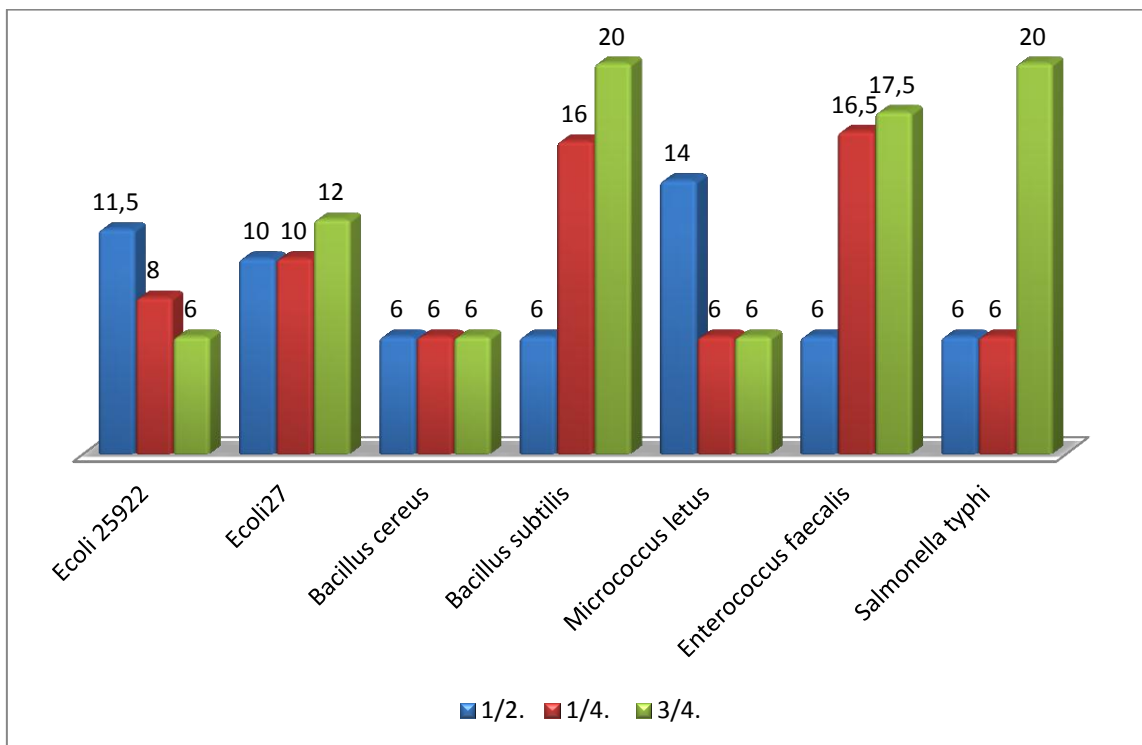
A l'instar, aucune inhibition n'a été observée contre *Bacillus cereus* et *Pseudomonas aeruginosa* (**figure 7 et 8**).

**Tableau 8** diamètres d'inhibition des différentes souches bactériennes en fonction de différentes concentrations de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* (le diamètre de la zone d'inhibition compris le diamètre de disques utilisées égale 6 mm).

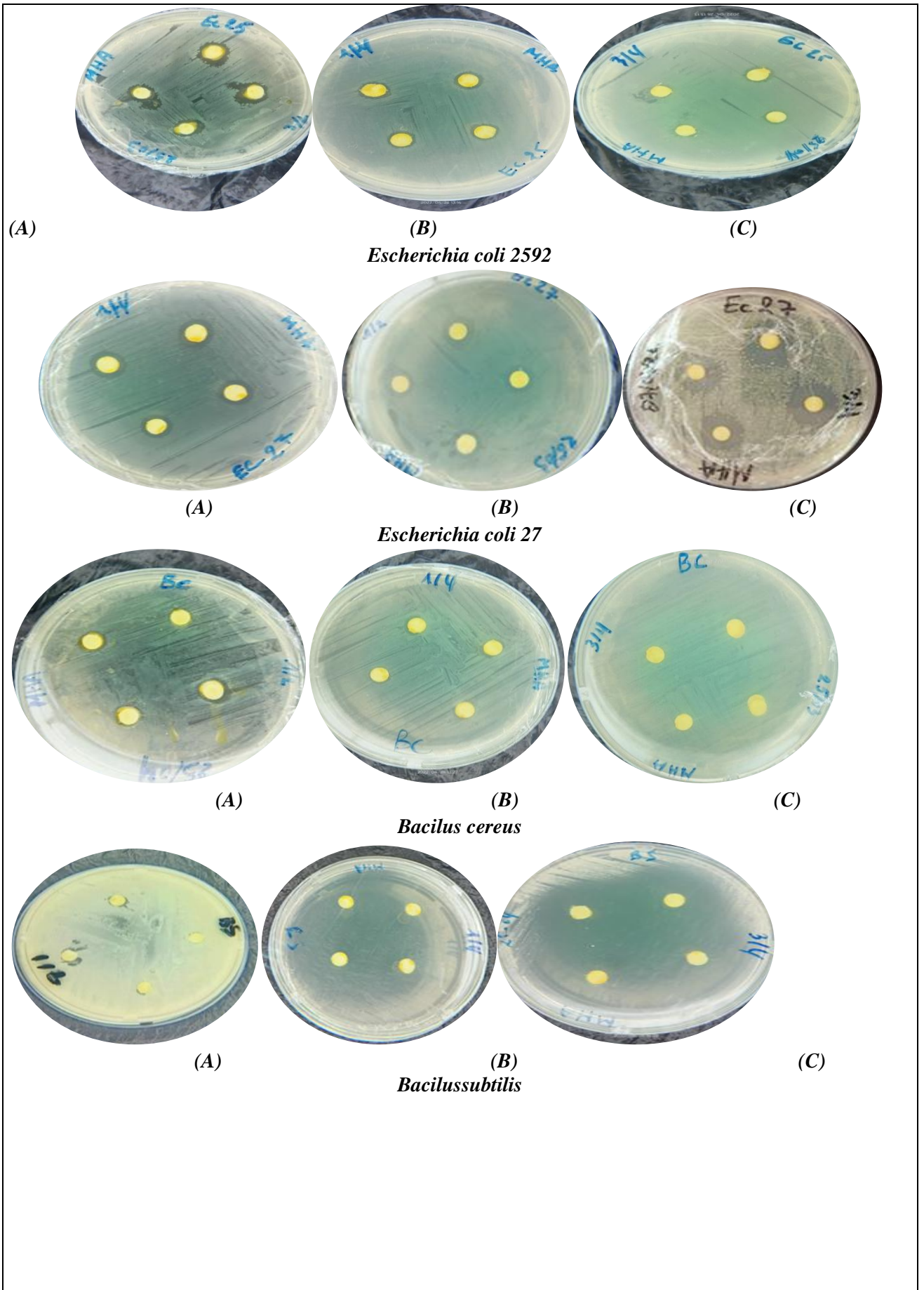
Bactéries	L'huile essentielle <i>L. citriodora</i> dilué à DMSO			Contrôle DMSO
	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{3}{4}$	
<i>Escherichia coli</i> 25922	11.5 mm	8 mm	6 mm	6 mm
	Sensible	Résistante	Résistante	
<i>Escherichia coli</i> 27	10 mm	10mm	12 mm	6 mm
	Sensible	Sensible	Sensible	
<i>Bacillus cereus</i>	6 mm	6 mm	6mm	6 mm
	Résistante	Résistante	Résistante	
<i>Bacillus subtilis</i>	6 mm	16 mm	20 mm	6 mm

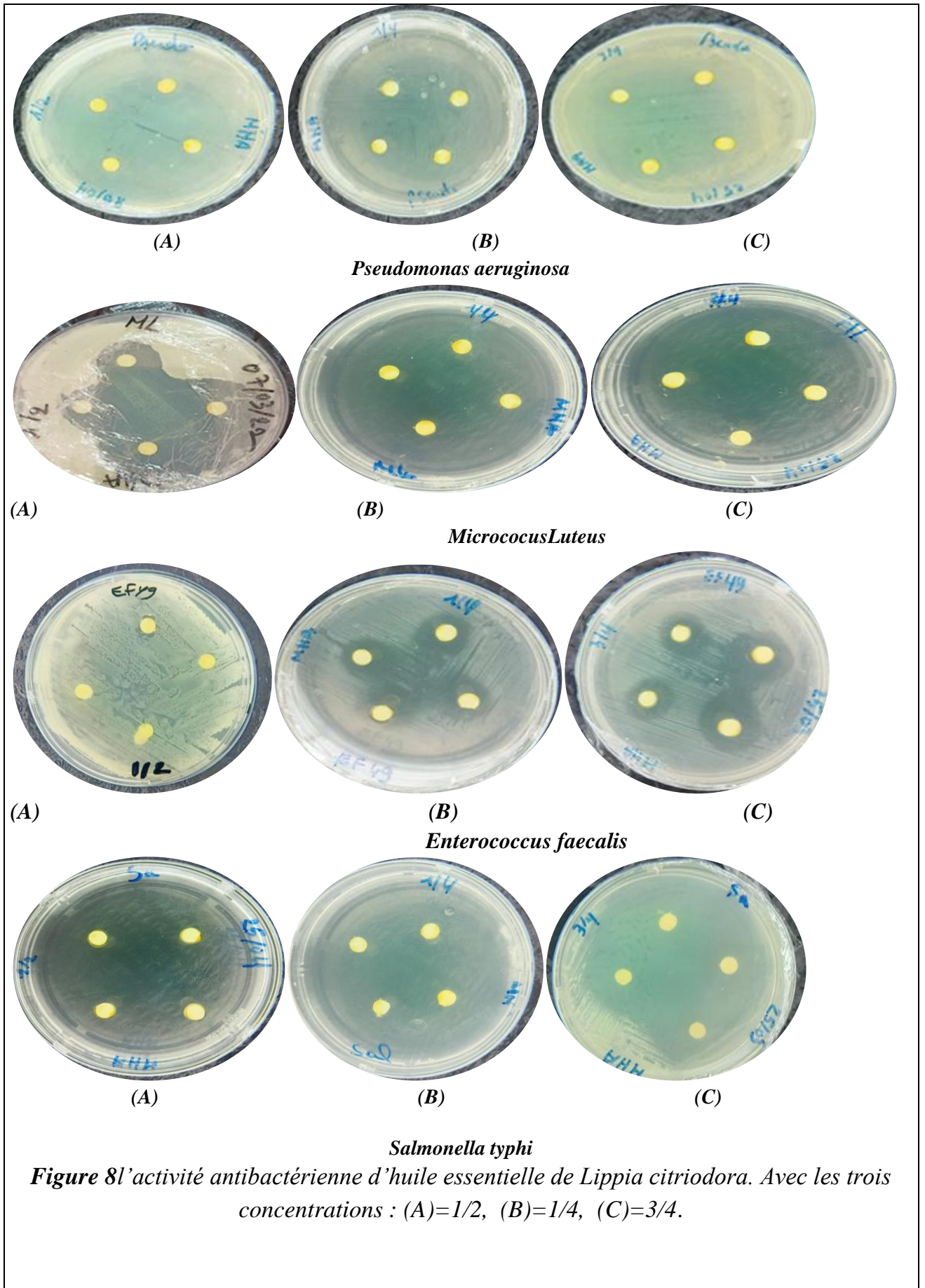
	Résistante	Très sensible	Très sensible	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 mm	6 mm	6 mm	6 mm
	Résistante	Résistante	Résistante	
<i>Micrococcus luteus</i>	14 mm	6 mm	6 mm	6 mm
	Très Sensible	Résistante	Résistante	
<i>Enterococcus faecalis</i>	6 mm	16.5 mm	17.5 mm	6 mm
	Résistante	Très sensible	Très sensible	
<i>Salmonella typhi</i>	6 mm	6 mm	20mm	6 mm
	Résistante	Résistant	Très sensible	

-- DMSO : diméthyle sulfoxid



**Figure 7** les diamètres d'inhibition de différentes souches bactériennes vis-à-vis différentes concentrations d'huile essentielle





**Figure 8** l'activité antibactérienne d'huile essentielle de *Lippia citriodora*. Avec les trois concentrations : (A)=1/2, (B)=1/4, (C)=3/4.

Les résultats de l'aromatogramme montrent que l'huile essentielle de *Lippia citriodora* possède une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En générale, les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes que les bactéries à Gram positif et cela est due à leur structure membranaire externe (POOL, 2001). Les bactéries à Gram négatif ont une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et une couche externe qui contient des lipo-polysaccharides et des protéines (CHAO et al. 2000). Cette structure protège le peptidoglycane de l'action des huiles. De plus, Les lipo-polysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif constituent une barrière imperméable aux substances hydrophobe capables de pénétrer à l'intérieur des bactéries et d'empêcher ainsi leur croissance.

L'étude d'OUKERROU et al.,(2017)ont signalé une activité antibactérienne moyenne de l'huile essentielle *L. citriodora* avec des diamètre des zones d'inhibition de  $14.21 \pm 0.13$ mm contre *E.coli*,  $10.42 \pm 0.14$ mm contre *P.aeruginosa*,  $19.64 \pm 0.24$ mm contre *B.cereus* et de  $14.42 \pm 0.16$  mm contre *S.typhi*. Cette différence dans l'activité comparée avec nos résultats peut s'expliquer par la différence de la concentration de l'huile utilisée.

Dans notre étude, l'huile essentielle de *Lippia citriodora* avait un large éventail d'activité et les 3 concentrations utilisées avaient une activité différente sur les souches bactériennes testées, ce qui nous mène à conclure que l'huile essentielle est dose-dépendante. En fait, le mode d'action des huiles essentielles dépend de la composition chimique et de la concentration de ses constituants. Généralement, l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est attribuée aux composés phénoliques. KIL et al., (2009)ont rapporté que les métabolites considérés comme minoritaires exerçaient eux aussi un rôle primordial dans l'activité antimicrobienne, puisque ces composés fonctionnent en synergie avec les composés majoritaire et que leur action est mal connue (DELAQUIS et al., 2002).

L'activité antimicrobienne peut être attribuée aussi au caractère hydrophobe des huiles essentielles qui permet de traverser aisément la bicouche (BURT, 2004), et à l'emplacement et le nombre de groupes hydroxyle (FALLEH et al., 2008).

#### 4.1.1 Détermination de la CMI et la CMB

Les valeurs des CMI de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* sont déterminées par la méthode de microdillution sur milieu liquide. L'huile essentielle de cette plante a montré un effet inhibiteur à la dilution  $\frac{3}{4}$  contre *Escherichia coli* ATCC 325 qui correspond à la concentration de  $1.4868 \text{ mg.ml}^{-1}$ , contre *Bacillus subtilis* à la concentration de  $23.5 \text{ mg.ml}^{-1}$  et contre *Enterococcus faecalis* à la concentration de  $23.5 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Pour la dilution de  $\frac{1}{2}$ , les résultats ont montré une activité vis-à-vis d'*Escherichia coli* 25922 et *Micrococcus luteus* qui correspond à la concentration de  $35.25 \text{ mg.ml}^{-1}$  et  $70.5 \text{ mg.ml}^{-1}$  respectivement. En revanche à la dilution  $\frac{1}{4}$ , l'huile essentielle inhibée seulement *Salmonella typhi* à une concentration de  $70.5 \text{ mg.ml}^{-1}$  (figure 9).

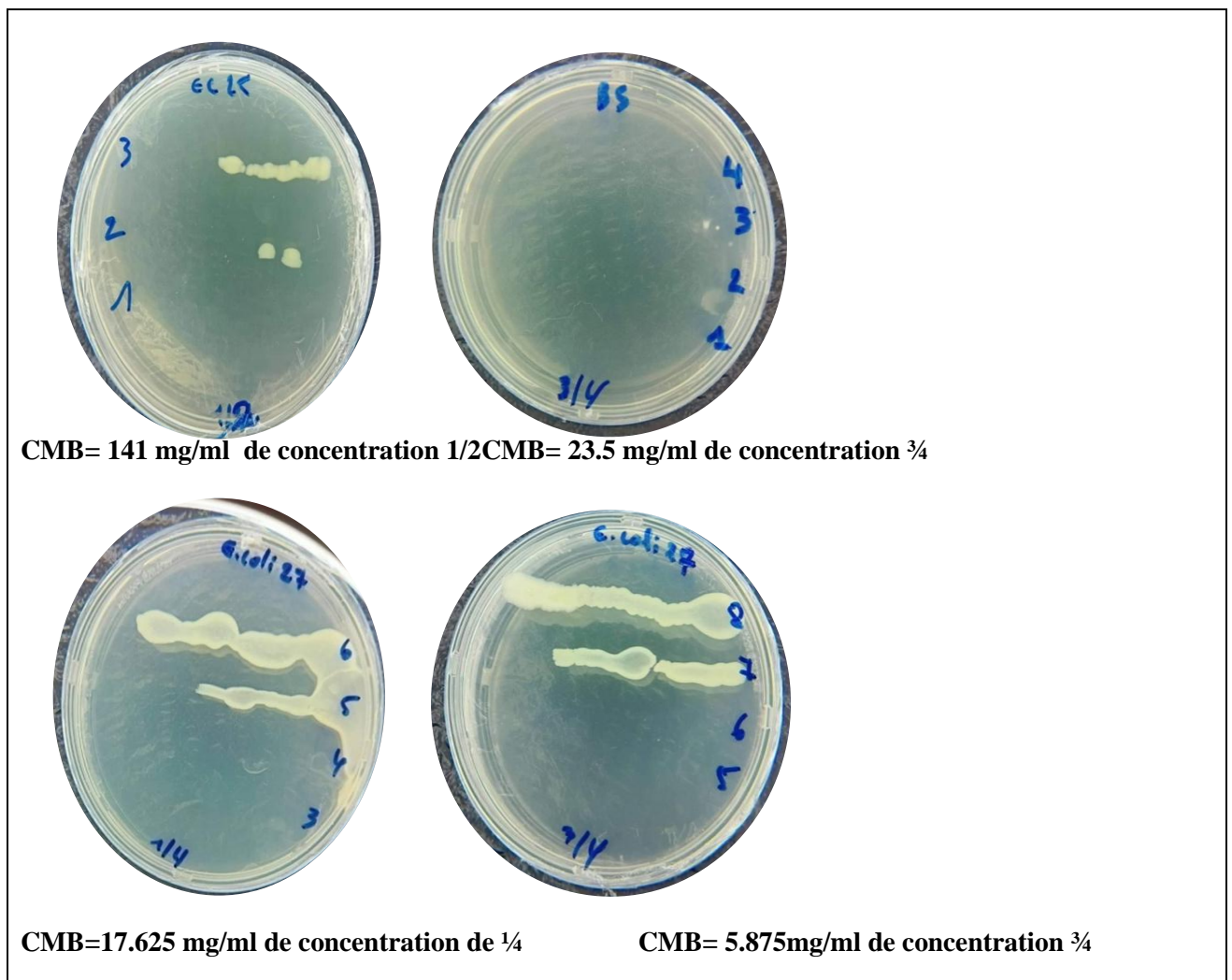


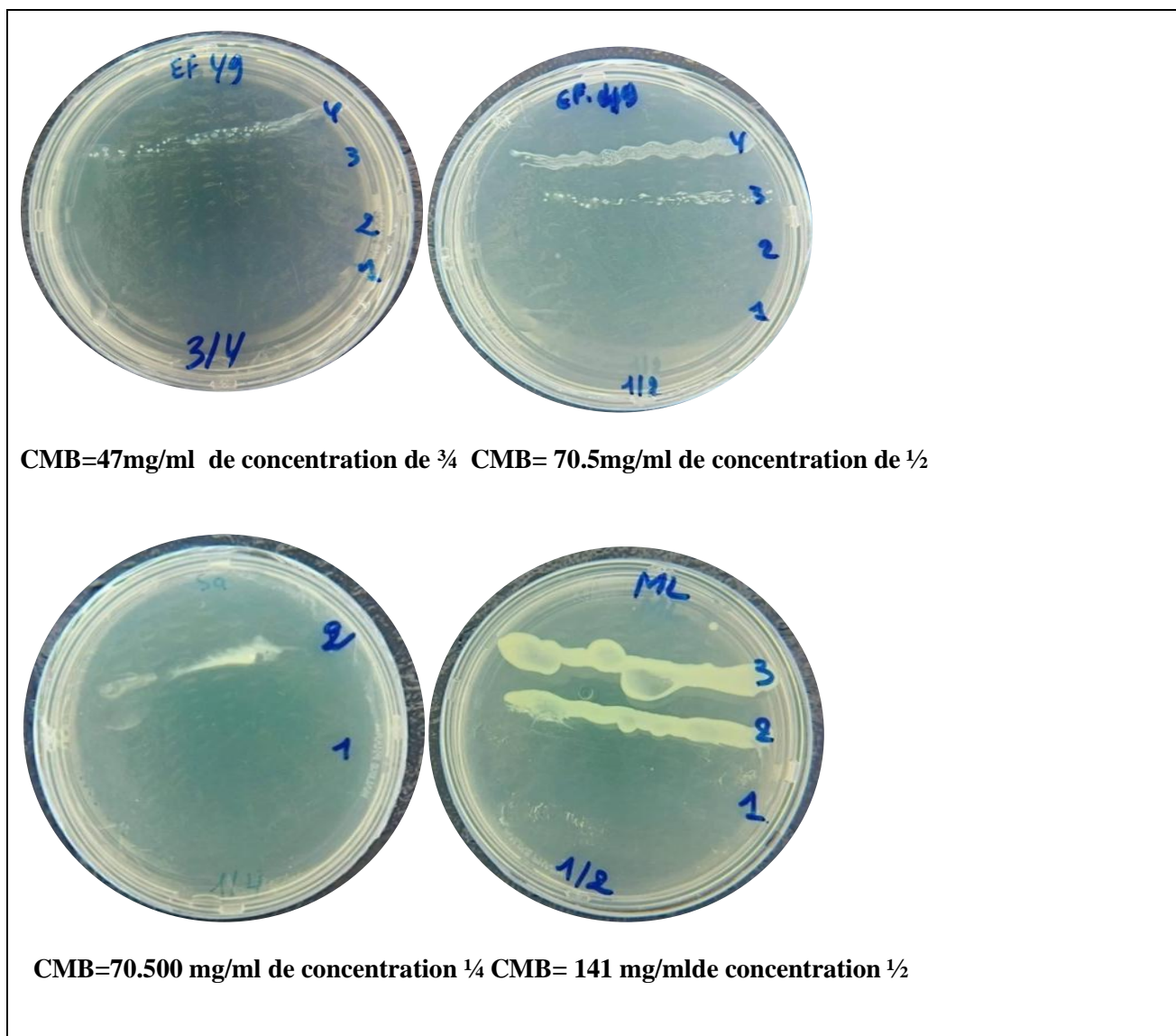
Figure 9 Déterminations de la CMI d'huile essentielle de *Lippia citriodora* sur les souches bactériennes testées appartenant des microplaques.

Les résultats de la CMI permettent de déterminer le fort pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* vis-à-vis d'*Escherichia coli* 27(1.468mg.ml<sup>-1</sup>),*Bacillus subtilis* (23.5±9.482mg.ml<sup>-1</sup>) et *Enterococcus faecalis* (23.5±23.5mg.ml<sup>-1</sup>).Le rapport CMB/CMI est inférieur de 4 ce qui confère à l'huile essentielle de *Lippia citriodora* un effet bactéricide (**tableau 9**).

**Tableau 9** Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile essentielle de *Lippia citriodora*

Les souches bactériennes	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMB/CMI
<i>Escherichia coli</i> 25912	35.25±29.375	141	4
<i>Escherichia coli</i> 27	1.468±1.783	5.875	4
<i>Bacillus subtilis</i>	23.5±9.482	23.5	1
<i>Micrococcus luteus</i>	70.5±29.836	141	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	23.5±23.5	47	2
<i>Salmonella typhi</i>	70.5±29.836	70.5	1





**Figure 10** les CMB d'huile essentielle de *Lippia citriodora* sur différentes souches bactériennes testées.

L'activité antibactérienne a été estimée qualitativement *via* la technique de l'aromatogramme. Pour une évaluation quantitative, les CMI, CMB et le rapport CMB/CMI ont été déterminées. Les résultats de la CMI sont en corrélation avec ceux de l'aromatogramme: des zones d'inhibition plus grandes impliquent des CMI plus faibles. (**figure 10**)

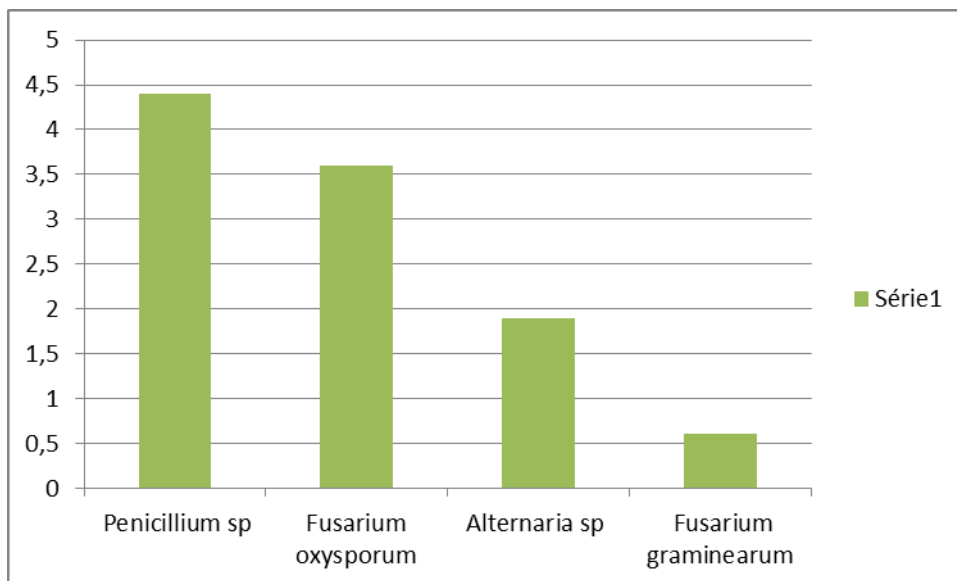
Les résultats de la CMI montrent que l'huile étudiée est très active contre *E.coli*. Cette constatation a été aussi rapportée lors de les études de **DERWICH et al. (2009)** ; **SEWANU (2012)** ; **CHOUTAH et al. (2013)**, où ils ont constaté que les bactéries à Gram négatif particulièrement *E. coli* peuvent être sensibles à de faibles concentrations.

Hormis la composition chimique, la nature de l'huile essentielle étudiée, le milieu de croissance et la technique du screening utilisée, la forme du microorganisme influence sur l'activité de l'huile. Selon **Nazzaro et al.,(2013)**, les formes bacillaires sont plus sensibles que les coccoïdes.

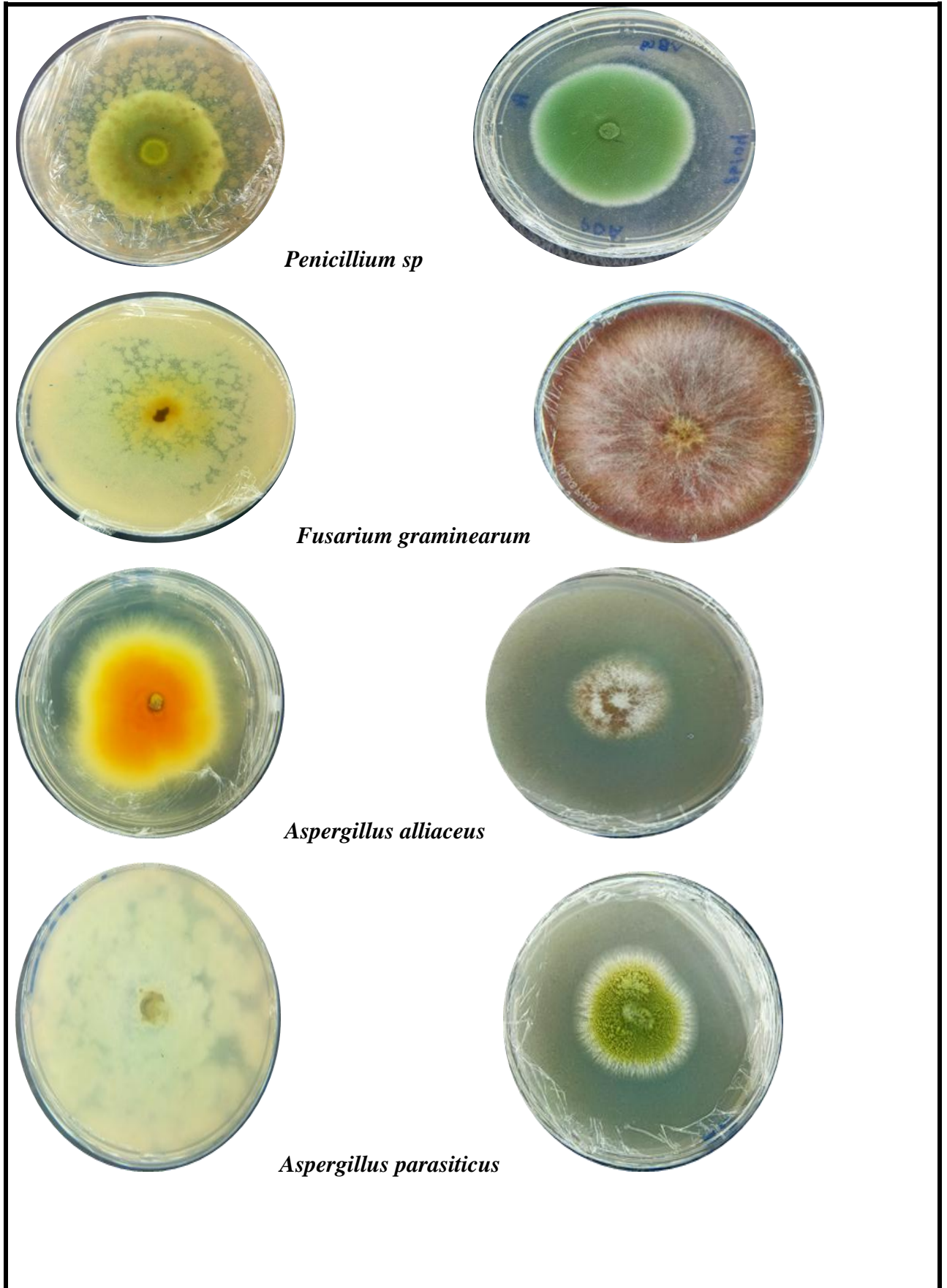
### 4.2 Activité antifongique

L'activité antifongique d'huile essentielle évaluée par la méthode microatmosphère a permis de révéler une activité moyenne (**Figure 11**).

Les résultats obtenus ont montré que la croissance de mycélienne des contaminants fongiques *Penicillium sp*, *Fusarium oxysprum*, *Alternaria solaniet F. graminearum* était réduite à  $4,4\pm 0,329\text{cm}$ ,  $3,6\pm 0,449\text{cm}$ ,  $1,9\pm 0,711\text{cm}$  et  $0,5 \pm 0,70\text{cm}$ , respectivement. Cependant, l'huile essentielle de *Lippia citridora* n'a montré aucune inhibition vis-à-vis d'*Aspergillus alliceus* *A. parasiticus*, et *Candida albicans* (**Figure12**).



**Figure11** les diamètres d'inhibition de la croissance mycélienne des souches fongiques de l'huile essentielle



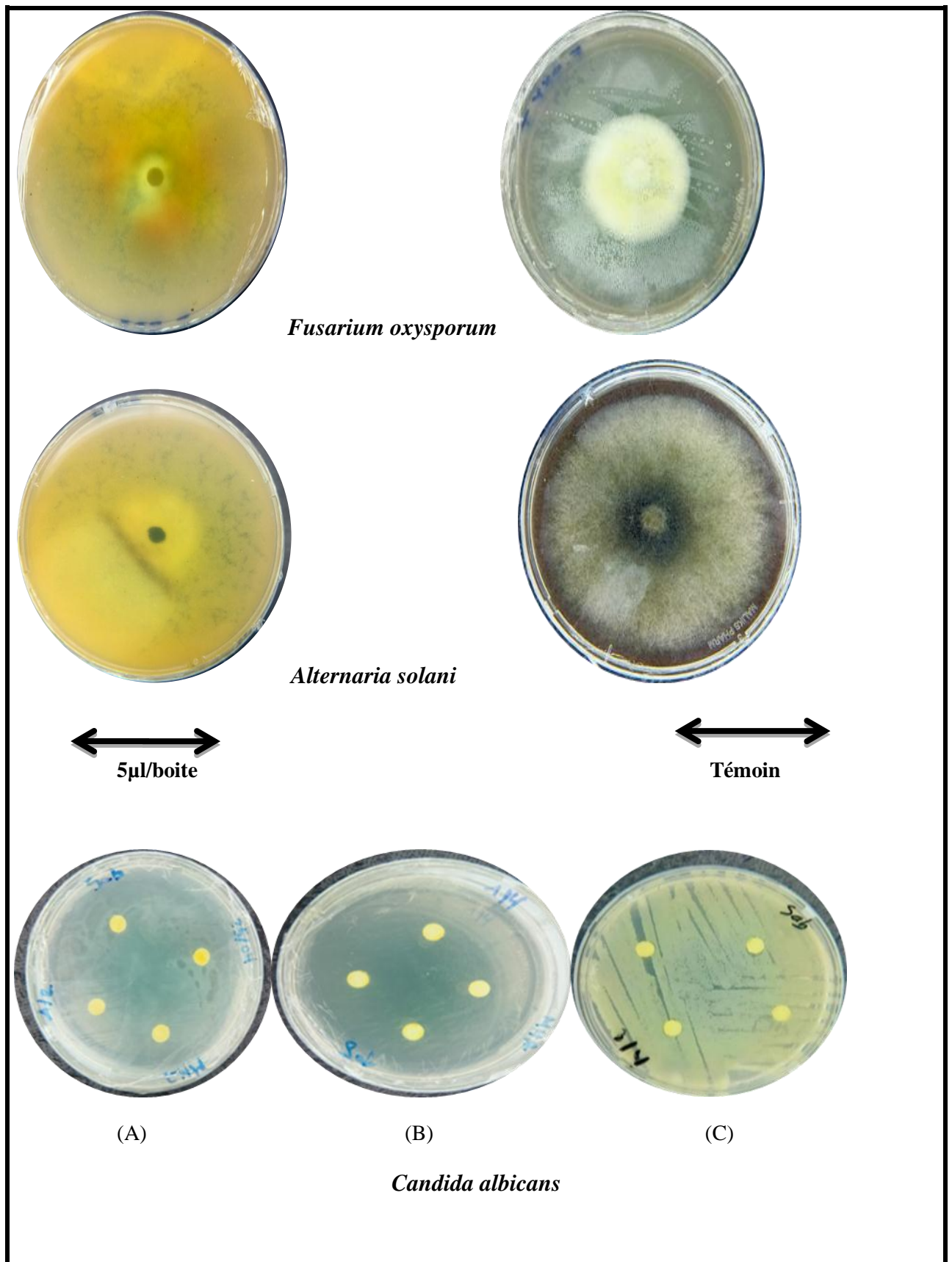


Figure 12l'activité antifongique d'huile essentielle de *L. citriodora* par la méthode microatmosphère, pour les *Candidas albicans* (A) et (B), (C) représentes les trois concentrations respectivement  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  et  $\frac{3}{4}$ .

En ce qui concerne l'activité antifongique des huiles essentielles, la technique de micro atmosphère a montré un effet inhibiteur relativement moyen.

L'activité antifongique des huiles essentielles est principalement due à leur composition en molécules bioactives variées, appartenant à différentes classes chimiques, qui peuvent être utilisées pour réduire la contamination fongique (**OURAINI et al., 2005**). Un large spectre des composés ont été purifiés et ont montré des propriétés antifongiques (**DeLUCCA et al., 2005**; **MARZOUK et al., 2009**).

Cependant, la résistance des espèces d'*Aspergillus* peut s'expliquer par la variété des enzymes produites par le mycélium qui peuvent rendre les composés de l'huile inactifs (**FAROOQ et al., 2002**). **SOYLU et al. (2005)** ont annoncé que la nature lipophile de l'huile essentielle la rend plus absorbable par les mycéliums fongiques que par la gélose de nature qui est de nature hydrophile. De plus, la présence d'ergostérol sur les membranes assure sa rigidité et réduit donc l'effet perturbateur des huiles essentielles (**KNOBLOCH, et al., 1989**).

L'activité antifongique d'huile essentielle, peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés d'huile essentielle. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique de cette huile essentielle (**GIORDANI et al., 2008**).

# **Conclusion et perspectives**

Les produits naturels occupent une place de plus en plus importante comme agent thérapeutique. Les extraits de plantes aromatiques sont utilisés dans divers formulations telles que les médicaments et les parfums. Ces substances naturelles ont été proposées dans la sécurité des denrées alimentaires car ils ont des propriétés antimicrobiennes importantes contre les bactéries et champignons tout en exprimant une activité antioxydante. En plus de leur utilisation comme conservateurs afin de garantir une sécurité sanitaire des aliments manufacturés, contrairement aux conservateurs chimiques sont cancérigènes et expriment une toxicité résiduelle potentielle.

Les travaux expérimentaux qui ont été menés lors de cette étude s'inscrivent dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques et médicinales. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'huile essentielle de *Lippia citriodora* et à évaluer ses potentialités biologiques, ce qui nous a permis de conclure ce qui suit :

- l'extraction par hydrodistillation a permis de récupérer un rendement d'huile essentielle de *L. citriodora* égale à 1.50 %. La méthode d'hydrodistillation pour obtenir les huiles essentielles reste la méthode la plus efficace et simple avec un rendement limité.
- les paramètres physiques de cette huile essentielle se sont basés sur les trois critères: aspect, couleur et d'arôme qui sont une caractéristique de cette plante ;
- l'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle *L. citriodora* a été réalisée par la méthode de réduction du DPPH• libre et s'est traduite par des pourcentages d'inhibition des radicaux libres frôlant les 82.18% pour une concentration de  $94\mu\text{g.ml}^{-1}$  d'huile ce qui est équivalent à une  $\text{IC}_{50} = 16\mu\text{g.ml}^{-1}$ .
- pour l'activité antibactérienne, la méthode de l'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *L. citriodora* vis-à-vis de 8 souches bactériennes. Le pouvoir est relativement moyen avec des zones d'inhibition variant entre 8 et 20 mm. La méthode de microdilution a confirmé les résultats de l'aromatogramme; les CMI obtenues sont comprises entre 1,468 et 70,5  $\text{mg.ml}^{-1}$ , les valeurs de CMB sont comprises entre 5,875 et 141  $\text{mg.ml}^{-1}$ .
- l'activité antifongique réalisée par la méthode microatmosphère, nous a indiqué que l'huile essentielle de *L. citriodora* a une capacité inhibitrice de la croissance de mycélienne des souches testées, les zones d'inhibition varient entre 0,6 et 8 cm, sans efficacité contre *C.albicans*.

Ces résultats très prometteurs et indiquent que l'huile essentielle de *L. citriodora* peut être utilisée de plusieurs façons: en médecine traditionnelle, industrie pharmaceutique, et agroalimentaires capable d'empêcher l'oxydation et de réduire la croissance mycélienne responsable des dommages et d'altération des aliments.

Il sera judicieux de compléter ce travail par une identifier des composés impliqués dans le processus de l'inhibition des bactéries et fungi pathogènes et de tester l'efficacité de cette huile sur ces souches par une étude future *in-vivo*.

# **Références bibliographiques**

- Abdelly, C. (2008) Phenolic composition of *Cynaracardunculus* L. organs, and their biological activities. *C.R. Biologies*. 331:372-379.
- Abuhamdah R et Mohammed A, 2013. Chemical, molecular pharmacology and neuroprotective properties of the essential oil derived from *Aloysia citrodora* palau: durham university.
- Ait Salem, L. (2016). Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pinus sylvestris* et *Pelargonium asperum* en combinaison avec la nisine sur des bactéries pathogènes (doctoral dissertation, université Mouloud Mammeri).
- Akhtar S., Degaga B. and Azam T. 2016. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. (2)1:1-7.
- Alavi L., Jabbari A., Barzegar M., Naghdibadi H. (2008) : Chemical composition and antioxidant properties of essential oils (*Lippia citriodora*, *Thymus daenensis*). *Food Chem*. 89:27-36.
- Aleksic V. and Knezevic P. 2014. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*. (169)4:240-254.
- Athamena, S. (2021). Etude de l'activité biologique de *Juniperus thurifera* et *Fraxinus xanthoxyloides* (doctoral dissertation, université de Batna 2).
- Audigie C.L., Dupon G. and Zongain F. (1995). *Principes des méthodes d'analyse biochimique*. T1, 2ème ED. Doin, Paris. 44.
- Arnal-Schnebel B., Hadji-Minaglou F., Peroteau J.F., Ribeyre F., De Billerbeck V.G. 2004. Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *International Journal of Aromatherapy*. 14(4):192-197
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. And Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils, a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46 : 446-475.
- Bamoniri, A., Abdolrasoul H. Ebrahimabadi, Mazoochi A., Behpour M., Kashi J.F. and Batooli H. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semeniatripterygioides* Boiss. from Iran. *Food Chemistry*. 122. 553-558.
- Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9 : 5-21.
- Belaiche P. (1979). *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome 1 : l'aromatogramme. éd. Maloine. Paris.
- Belkamel Aj, Bammi J, Janneot V, Belkamel Af, Dehbi Y Et Douira A, 2018. Contribution à l'étude de la composition chimique de la verveine odorante : *Aloysia triphylla* (L'herb.) Britt cultivée au Maroc. *International journal of environment, agriculture and biotechnology*, 3(2): 321-331.
- Ben Nadji S., Bouzrag C., (2018). Extraction et caractérisation des huiles essentielles à partir de *Cymbopogon schoenanthus* dans la région de Ghardaïa. mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master.

- Ben Seddik, K. Z., & Ben Seddik, M. O. (2021). L'effet de méthode d'extraction sur la production d'huiles essentielles à partir de *Citrus aurantium* (région de Ghardaïa) (doctoral dissertation).
- Bonjean, A., (2001). « *Aloysia triphylla*-Verveine odorante (Verbenaceae), systématique et répartition géographique, combinaison spécifique, morphologie, histoire, culture et récolte.
- Botrel, A. ; « Encyclopédie Des Plantes Médicinales » ; Edition Larousse ; France ; 2001 ; Pp 228.
- Bouali-Chlef ; 2013 *Basilicum* Sur Quelques Bactéries Pathogènes » ; Thèse De Master ; Université De Hassiba Ben Bouali
- Bouderhem, A. (2014) Effet Des Huiles Essentielles De La Plante *Laurus nobilis* Sur L'aspect Toxicologique Et Morphométrique Des Larves Des Moustiques (*Culex pipiens* Et *Culiseta longiareolata*). Mémoire De Fin D'étude En Vue De L'obtention Du Diplôme De Master.
- Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & Kameli, A. (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. *une*, 3(4), 1653-1659.
- Bouzi, D. (2018). Évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle d'une plante endémique *Helichrysum italicum* (roth) g. don (doctoral dissertation).
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- Bruneton J. (2009): "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales." Paris. Lavoisier. 1269 P.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods □ a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253
- Burt S.A., 2004. Essential oils: their antimicrobial properties and potential application in foods. *International Journal of Food Microbiology*, vol 94 (3), p22-25.
- Butterfield D. and Lauderback C. (2002). Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine.* 32, 1050-1060.
- Carnat, A. et Carnat A.P. et Fraisse, D., Lamaison J.L ; « The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea fitoterapia »; 1999 ; vol70 ; pp 44-49.
- Catalan C., De Lampasona P. (2002): The chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae). In S.E. Kintzios, (ed.) *Oregano: The genera Origanum and Lippia*, Taylor and Francis; London 127-149.
- Chao S.C., Young D.G. et Oberg G.J., 2000: Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res.*, Vol.12,(Sep/Oct2000),pp:639-649.
- Cheurfa M et Allem R, 2015. Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla*. *phytothérapie*, 14(3): 181-187.
- De Figueiredo R, Stefanini Mb, Ming Lc, Marques M et Facanali R, 2002. Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'herit) Britton leaves cultivated in Botucatu, São Paulo, Brazil, page 131-134.

- De Maack F. et Sablier M. (1994). Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Dossier: P2614. vol papier n°: TA3. Bases documentaires, Techniques d'analyse.
- Deans, S.G., Ritchie G., (1987). Antimicrobial properties of plant essential oils.int.j.food microbiol., vol. 5, p : 165-180.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. EtMazza G., 2002: Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils. Int .J.FoodMicrobiol., vol.74, pp:101-109.
- Derwich E.; Benziane Z.; Boukir A. (2009). Gc/Ms Analysis of volatile constituents and antibacterial activity of the essential oil of leaves of eucalyptus globulus in atlas median from morocco. ad in nat and appl sciences. 3(3), 305-313.
- Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. and Bernardini A. F. (1997).Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. Analysis, 25 (6): 13-16.
- Dung N.T., Kim J.M. and Kang S.C., 2008. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology 46: pp.3632-3639.
- Duschatzky C.B., Possetto M.L., alaricoet L.B.T., et al. 2005.Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils fromSouth American plants. Antiviral Chemistry and Chemotherapy.16(4):247-251.
- Falleh,H.,Ksouri ,R.,Chaieb,K.,Karray-Bouraoui,N.,Trabelsi,N.,Boulaaba,M.,
- Farooq A., Choudhary M.I., Rahman A. and Tahara S. 2002a.Detoxification of terpinolene by plant pathogenicfungus *Botrytis cinerea*.ZeitschriftfürNaturforschung. 57:863-866.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
- Fernnell C.W., Lindsey K.L., Mcgaw L.J., Et Al., 2004. Assessing african medicinal plants for efficacy and safety: pharmacology screening and toxicology. Journal of ethnopharmacology. 94:205-217.
- France-Ida J. (1996). Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Infoessence. 3 : 5-6.
- France-Ida J. (1998) – Comment s'assurer de la pureté d'une huile essentielle? Info – essences. 7 : 1-2.
- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chem., 102: pp.898-904.
- Gardner P. (1997). Superoxide-driven a conitase FE-S center cycling. Bioscience Reports.17, 3342.

- Giordani R., Hadeff Y., et Kaloustjan J., 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79 : pp199-203
- Ghedira K Et Goetz P, 2017. Verveine odorante aloysia citriodora palau (lippia citriodora). *phytotherapie*, 15(1): 33-37.
- Grosso C., Ferraro V., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Coelho J. A. and Palavra, A.M. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds, *Food chemistry*. 111 (1): 197-203.
- Hammes W.P., Hertel C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Chap.1.2.10. In *prokaryotes*. 4: 320-403.
- Hashim G., Almasaudi S., Azhar E., Al Jaouni S., Et Harakeh, S. (2016). Biological activity of cymbopogon choenanthus essential oil. *saudi journal of biological sciences*.
- Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S., (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:1070-1078.
- Hussain A.I., Anwar F., Sherazi T.H.S. and Przybylski R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108:986-995.
- Kalemba D, Kunicka A (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829
- Kanko C., Sawaliho B. E., Kone S. Koukoua G., N'guessan Y. T. (2004). « Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». *Comptes rendus Chimie* 7 (1039–1042).
- Kil, H.Y., Seong, E.S., Ghimire, B.K., Chung, I.M., Kwon, S.S., Goh, E.J., Heo, K., Kim, M.J., Lim, J.D., Lee, D., Yu, C.Y. (2009) Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem.* 115:1234-1239.
- Knobloch K., Pauli P., Iberl B., Weigand H., Weiss N. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*. 1:119-128.
- König W.A. (2001). Hochmuth D.H., Joulain D., Terpenoids and related constituents of essential oils. library of massfinder 2.1 university of hamburg, institute of organic chemistry, hamburg,.
- Labio R., (2016). Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Salvia calaminthana* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. université badji mokhtar-annaba. p: 78.
- Lakhdar, L. (2015). Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: étude in vitro (doctoral dissertation).

- Lamamra, M. (2018). Activités Biologiques Et Composition Chimique Des Huiles Essentielles D'ammiosisaristidiscoss.(Syn. Daucus Aristidiscoss.) Et D'achilleasantolinoideslag (Doctoral Dissertation).
- Lang G. and Buchbauer G. 2012.A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals.Areview. Flavour and Fragrance Journal.27(1):13–39.
- Lehotay S.J. and Hajslova, J. (2002).Application of gas chromatography in food analysis.Trends in Analytical Chemistry, 21: 686-697.
- Lenoir L, 2011. Effet protecteur des polyphenols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat: universite d'auvergne-clermont-ferrand i
- Lenoir L. (2011) : Effet protecteur des polyphenols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Université d'auvergne. école doctorale des sciences de la vie et de la sante. p. 290
- Lewis K., Ausubel F.M. 2006. Prospects for plant derived antibacterials. National Biotechnology. 24:1504-1507.
- Liu, D. (2018). Hal Id: Tel-02364954 <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02364954> Submitted On 15 Nov 2019 Hal Is A Multi-Disciplinary Open Access Archive For The Deposit And Dissemination Of Sci-Entific Research Documents, Whether They Are Pub-Lished Or Not. The Documents May Come From Teaching And Research Institutions In France Or Abroad, Or From Public Or Private Research Centers. L'archive Ouverte Pluridisciplinaire Hal, Est Destinee Au Depot Et A La Diffusion De Documents Scientifiques De Niveau Recherche .... Ph. D. Thesis.
- Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. et Salunkhe, D.K. (1995). "Toxicological aspects of food antioxidants."Food antioxidants.Technological and Health perspectives.
- Makram, S., Alaoui, K., Benabboyha, T., Faridi, B., Cherrah, Y., & Zellou, A. (2015).Extraction et activite psychotrope de l'huile essentielle de la verveine odorante lippia citriodora. phytotherapie, 13(3), 163-167
- Mansouri V., Ingram C., Echard B.X., Bagchi D. (2005): Antifungal activities oforiganum oil against candida albicans. mol. gel. biochem. 228 : p.111- 117.
- Mohammedi Z. (2006): Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. thèse de - magister, universite Abou bekr belkaid Tlemcen, 155p
- Mothana R., Abdo S., Hasson S., Althawab F., Alaghabari S., Lindequist U. (2008): Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening Of some yemeni medicinal plants. department of pharmacognosy, faculty of pharmacy, sana'a-university, p0 box 33039, 21institute of phannacy, college of medical science, - university of science and teehnology, sana'a, yemen and 3department of pharmaceutical biology, institute of pharmacy, ernst-moritz-arndt-university, greifswald, f-l-jahn str. 15a, d 17487 greifswald, germany. p. s.

Moulay Ali Oukerrou, Mounir Tilaoui, Hassan Ait Mouse, Inass Leouifoudi, Abdeslam Jaafari, and Abdelmajid Ziad. (2017) Chemical Composition and Cytotoxic and Antibacterial Activities of the Essential Oil of *Aloysiacitriodora*, Laboratory of Biological Engineering, Natural Substances, Cellular and Molecular Immuno-Pharmacology, Immunobiology of Cancer Cells Cluster, Faculty of Science and Technology, Sultan Moulay Slimane University, Beni Mellal, Morocco

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M. et Sineiro, J. (2001). "Natural antioxidants from residual sources." *Food Chemistry*, 72: 145-171.

Mulyaningsih S., Sporer F., Zimmermann S., Reichling J., Wink M. 2010. Synergistic properties of the terpenoids  $\alpha$ -pinene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*. 17(13):1061-1066.

Naser Aldeen Mg, Mansoor R Et Aljoubbeh M, 2015. Fluctuations of phenols and flavonoids in infusion of lemon verbena (*Lippia citriodora*) dried leaves during growth stages. *Nutrition et food science*, 45(5): 766-773.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. and De Feo, V., 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451-1474; doi:10.3390/ph6121451

Nea, F. (2021). Etude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales de Côte d'Ivoire: *Lantana camara* et *Lantana rhodesiensis* (Verbenaceae) (doctoral dissertation, Université de Liège, Gembloux, Belgique).

Nuzhat T., and Vidyasagar G.M. 2013. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5(2):19-28.

OMS. 2000. Organisation Mondiale De La Santé, principes méthodologiques généraux et l'évaluation relative à la médecine traditionnelle.

Pascual M, Slowing K, Carretero E, Mata Ds Et Villar A, (2001). *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 76(3): 201-214.

Pascual Me. Et Slowing K Et Carretero E. Sanchez Mata D. Villar ; « *Lippia* Traditional Uses, Chemistry And Pharmacology »; *J. Ethnopharmacol* ; 2007; Vol 76; Pp 201-214.

Paun G, Zrira S, Boutakiout A, Ungureanu O, Simion D, Chelaru C Et Radu GI, 2013. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of essential oils from Moroccan aromatic herbs. *Revue romaine de chimie*, 58 (11-12): 891-897.

Peralta M.A., Silva Da., Ortega M.G., Cabrera J.L., Paraje M.G. 2015. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine*. 22(11):975-980.

Pierre M. Et Lis M. (2002) : *Secrets Des Plantes. Pour Se Soigner Naturellement 250 Plantes Et 230 Recettes*. Artemis Edition.

Piochon M. (2008): Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémisynthèse. Mémoire présentée à l'université du Québec comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables.

- Platzer N. (2002). Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1
- Pool E, K.2001.Multidrug resistance in Gram-negative bacteria-current opinion in Microbiology, 4:pp500-508.
- Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C. E., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. 36 :679-684
- Pourrut B. (2008). Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat, Toulouse, France.
- Pratt, D.E. (1980). "Natural antioxidants of soybean and other oil seeds." Ed. M.G. Simic, and M. Karel, Plenum, Autoxidation in food and biological systems: 261-282.
- Rabhallah, C., & Aouachria, A. (2020).Etude de l'huile essentielle de *lippiacitriodora* et leur bioactivite sur l'espèce de moustique culex pipiens (doctoral dissertation, université la arbi tebessi tebessa).
- Rashid ch A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J. and Arshad M., 2010.Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. Analele Universităţii din Bucureşti – Chimie (serie nouă), vol. 19 №1, pp. 23-30.
- Rasooli I. and Abyaneh M.R., 2004. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and afltoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control, 15, pp. 479-483.
- Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., 2008.Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils.Food Chemistry ; pp.135-140.
- Raut J. S. and Karuppayil S. M. 2014.A status review on the medicinal properties of essential oils.Industrial Crops and Products. 62:250-264.
- Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R., Ghasemzadeh A. 2016. Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. Molecules.21:7-8.
- Safaralie A., Fatemi S. and Sefidkon F. (2008).Essential oil composition of *valerianaofficinalis* L. roots cultivated in Iran Comparative analysis between supercritical CO2 extraction &hydrodistillation.Journal of chromatography A. 1180:159.
- Saidi, S. (2014). Etude de l'effet antioxydant des huiles essentielles de *lippia ciiriodora* de la région de tlemcen). en vue de l'obtention du diplôme du master.
- Salha, G. B. (2020). Deterpenation de l'huile essentielle d'*origanum majorana l.* et evaluation des activites biologiques (doctoral dissertation, universidadelpais vasco-euskalherrikounibertsitatea).
- Sewanu S. (2012). The chemical composition, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils of *tulbaghiaviolaceaharv* and *eucalyptus grandisw.hill ex maiden*.these de magister de l'universitezuland, kwadlangezwa, sud d'afrique.

- Shahidi F. (1997). Natural Antioxidants: chemistry, health effects and applications, Ed aocs mission statement. 174-197
- Singh G., Maurya S., De Lampasona M.P. And Catalan C., 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of foeniculum vulgare volatile oil and its acetone extract. food control, vol. 17, pp.745–752.
- Siripornvisal S., Rungprom W. And Sawatdikarn S., 2009. Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (botrytis cinerea). as. j. food agind., pp.229-233.
- Skaltsa, H., & Shammass, G. (1988).Flavonoids from lippia citriodora.planta medica, 54(05), 465-465.
- Soylu E. M., Yiğitbaş H., Tok F. M., et al. 2005. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of Artemisia annua L. against foliar and soil-borne fungal pathogens. Journal of Plant Diseases and Protection. 112:229-239.
- Taleb-Toudert K., Bellanteur K., Haddad N., Ouazzoug T., Kellouche A. (2002) : Extraction et caracterisation de l'huile essentielle de aloysia triphylla. evaluation in vitro de son effet sur la croissance de certains agents pathogenes de l'homme. departement de biologie faculte des sciences biologiques et des sciences agronomiques universite mouloud mammeri de tizi-ouzou algerie. p.14.
- Toure, D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques medicinales de côte d'ivoire (doctoral dissertation, universite felix houphouetboigny, cote d'ivoire).
- Vasconcelos Silva M.G. ; Craveiro A.A. ; Abreu Matos F.J. ; Machado M.I.L. ; Alencar J.W. (1999).Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of ocimum gratissimum. fitoterapia. 70, 32-34.
- Wang H.F., Yih K.H. and Huang K.F., 2010.Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components.Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 18, №1, pp. 24-33.
- Yousefzadeh N Et Meshkatalasadat Mh, 2013.Quantitative and qualitative study of bioactive compound of essential oils of plant lippia citriodora by use of gc-ms technique.journal of novel applied sciences, 2(2s): 964-968.
- Zambonelli A., D'Aurelio A.Z., Severi A., Benvenuti E., Maggi L., Bianchi A. 2004. Chemical composition and fungicidal activity of comercial oils of thymus vulgaris L. Journal Essential Oil Research. 16(1):69-74.
- Zheng W., Wang S. Y. (2001): Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. j. agric. food chem. p: 49: 5265 – 2001

# ANNEXE

**ANNEXE : milieux de culture****Gélose nutritive :**

Eau distillée .....1000 ml

Gélose nutritive (en poudre).....28g

pH=7.2

**Bouillon nutritive :**

Eau distillée.....1000 ml

Bouillon nutritive (en poudre).....8g

pH=6.5

**Milieu sabouraud :**

Eau distillée.....1000ml

Milieu (poudre).....65 g

pH=6.3

**Potatoes Dextrose Agar (PDA)**

Eau distillée.....1000ml

Filtrat de pomme de terre.....260g

Glucose .....20g

Agar .....15 g

pH=4.5

**Agar Mueller Hinton**

Eau distillée.....1000ml

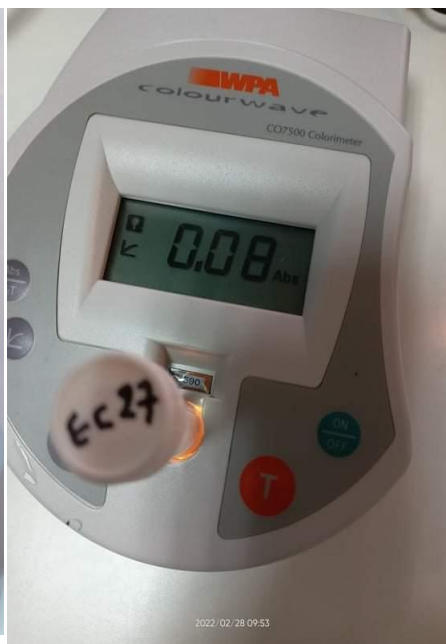
MHA .....38 g

pH=6.8

ANNEXE : les appareils



Hydrodistillateur (cleverger)



colorimètre



Polarimètre



réfractomètre