

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF

# **MEMOIRE**

**Présenté à la faculté des Sciences**

**Département de Biologie**

**Pour l'obtention du Diplôme de**

# **MAGISTER**

**Spécialité : Biologie et Physiologie Végétale**

**Option : Valorisation des Ressources Végétales**

**Par : LAMAMRA MEBARKA**

*Thème*

**Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. et de *Filipendula hexapetala* Gibb.**

**Devant le jury**

Président	Pr. D. Harzallah	Professeur à l'université Ferhat Abbas. Sétif
Rapporteur	Pr. H. Laouer	Professeur à l'université Ferhat Abbas. Sétif
Examineurs	Dr. S. Khennouf	M.C à l'université Ferhat Abbas. Sétif
	Pr. S. Akkal	Professeur à l'université Mentouri. Constantine

## Résumé :

Les huiles essentielles possèdent d'importantes activités antimicrobiennes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants, ce qui nous a conduits à effectuer l'analyse chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* et de *Filipendula hexapetala*. L'extraction est effectuée par hydrodistillation. L'analyse des huiles essentielles est réalisée par CPG/SM. L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. L'analyse chimique de *T. sicula* a révélée la présence de 25 constituants dominés par l'apiole (56.8%). L'huile essentielle de *F. hexapetala* est constituée principalement de 33 constituants dont les constituants majoritaires : le thymol (17.5%) et l'aldéhyde salicylique (10.3%). L'huile de *T. sicula* est inactive vis à vis des bactéries testées mais active à l'égard des champignons. L'huile de *F. hexapetala* présente une activité antimicrobienne sur *S. aureus*, *A. niger* et *C. albicans* alors que *P. aeruginosa* est résistant.

Mots clefs : *Tinguarra sicula*, *Filipandula hexapetala*, huiles essentielles, activité antimicrobienne.

## Abstract:

Essential oils have important antimicrobial activities and can replace with success antibiotics which show their inefficiency against resistant microorganisms. In this study we have tested the antimicrobial activities of the essential oils of *Tinguarra. sicula*, and *Filipendula. hexapetala*. The extraction is done by hydrodistillation method. The analyses were obtained by CPG/MS. Antimicrobial activity was tested by using the agar diffusion test. The chemical analysis of *T. sicula* has revealed the existence of 25 constituents dominated by the apiol (56.8%). The essential oil of *F. hexapetala* consists mainly of 33 constituents of which the majority compounds: the thymol (17.5%) and the salicylaldehyde (10.3%). Essential oil of *T. sicula* was inactive against the bacteria tested but active against fungi. Essential oil of *F. hexapetala* exhibited an antimicrobial effect on *S. aureus*, *A. niger* and *C. albicans* but *P. aeruginosa* was resistant.

Key words: *Tinguarra sicula*, *Filipendula hexapetala*, essential oils, antimicrobial activity.

## الملخص:

تملك الزيوت الأساسية نشاطية ضد ميكروبية مهمة و تستطيع ان تعوض بنجاح المضادات الحيوية التي أثبتت عدم فعاليتها ضد البكتيريا المقاومة الشيء الذي حثنا على إجراء التحليل الكيميائي و الدراسة ضد الميكروبية ل *F. hexapetala* و *T. sicula* : تم الاستخلاص بواسطة التقطير المائي. بينما تحليل الزيوت الأساسية فتم بواسطة كروماتوغرافيا طور الغازي المزوج بمطيافية الكتلة. كما تمت دراسة الأثر ضد الميكروبي بواسطة طريقة الانتشار على الوسط الصلب التحليل الكيميائي ل *T. sicula* قد حدد 25 مكونا يهيمن عليه Apiole (56.8%) كما يتكون زيت *F. hexapetala*. أساسا من 33 مكون يهيمن عليه : thymol (17.5%) و salicylaldehyde (10.3%). أبدأ زيت نبات *T. sicula* مقاومة للبكتيريا المدروسة بينما أبدأ نشاطية ضد الاعفان. كما أبدأ زيت *Filipendula hexapetala* نشاطية ضد ميكروبية ضد *S. aureus* و *A. niger* و *C. albicans* بينما أبدأت *P. aeruginosa* مقاومة.

الكلمات المفتاحية: *Tinguarra sicula* ، *Filipendula hexapetala* ، الزيوت الأساسية، النشاطية ضد الميكروبية

# Sommaire

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des figures.....	III
Liste des abréviations.....	V
Introduction	

## Partie Bibliographique

### Chapitre I

#### Etude des plantes médicinales

I-1-Phytothérapie .....	1
I-2-Botanique et propriétés des Apiacées .....	1
I-3-Botanique du genre <i>Tinguarra</i> .....	2
I-4-Les principaux constituants chimiques .....	2
I-5-Usages traditionnels.....	2
I-6- <i>Tinguarra sicala</i> .....	3
I-6-1-Description botanique.....	3
I-6-2-Systématique et nomenclature.....	3
I-6-3-Usages traditionnels.....	4
I-7-Botanique et propriétés des Rosacées.....	4
I-8-Botanique du genre <i>Filipendula</i> .....	4
I-9-Les principaux constituants chimiques.....	5
I-10-Usages traditionnels.....	5
I-11- <i>Filipendula hexapetala</i> .....	5

I-11-1- Description botanique.....	5
I-11-2- Systématique et nomenclature.....	6
I-11-3-Les principaux constituants chimiques de <i>F. hexapetala</i> .....	6
I-11-4-Usages traditionnels.....	6

## Chapitre II

### Valorisation des Ressources Végétales par l'Etude des Huiles Essentielles

II-1-Définition des huiles essentielles .....	8
II-2-Répartition, localisation et fonction.....	8
II-3-propriétés physiques des huiles essentielles.....	10
II-4-Composition chimique.....	11
II-4-1-Les composés terpéniques.....	11
II-4-1-1-Les monoterpènes.....	12
II-4-1-2-Les sesquiterpènes.....	12
II-4-2-Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane.....	12
II-4-3-Les composés d'origines diverses.....	13
II-5-Facteurs de variabilité des huiles essentielles.....	14
II-6-Toxicité des huiles essentielles.....	15
II-7-La filière des huiles essentielles.....	16
II-8-La conservation des huiles essentielles.....	17
II-9-Les procédés d'extraction des huiles essentielles.....	17
II-10-Les méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	23
II-11-Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles.....	25
II-12-Techniques d'étude antimicrobienne des huiles essentielles.....	28
II-12-1-Technique par contact direct.....	28
II-12-2-Technique des micro-atmosphères.....	29
II-13-Mode d'action des huiles essentielles.....	30

II-14-Activité antioxydante.....	32
II-14-1-Les radicaux libres.....	32
II-14-2-Stress oxydant et atteintes pathologiques.....	34
II-14-3-Les moyens de protection.....	35

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre III**

#### **Matériels et méthodes**

III-1-Matériel.....	37
III-1-1-Matériel végétal.....	37
III-1-2- Matériel du test de l'activité antimicrobienne.....	37
III-1-2-1-Souches microbiennes.....	37
III-1-2-2-Les milieux de culture.....	37
III-1-2-3-Les antibiotiques.....	37
III-2-Méthodes expérimentales .....	38
III-2-1-Extraction des huiles essentielles.....	38
III-2-2-Analyse des huiles essentielles.....	40
III-2-3-Etude de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des huiles essentielles.....	40
III-2-3-1-Technique par contact direct.....	40
III-2-3-1-a-Méthode de diffusion.....	40
III-3-Test de l'activité antioxydante.....	44

# **Chapitre IV**

## **Résultats et Discussion**

IV-1-Extraction des huiles essentielles.....	46
IV-2-Analyse chimique des huiles essentielles.....	48
VI-3-Activité antimicrobienne .....	58
VI-4-Activité antioxydante.....	70
<b>Conclusion</b> .....	<b>72</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>75</b>
<b>Annexes</b>	



## DÉDICACES

*A la mémoire de mon père*

*A ma mère que le tout puissant la protège*

*A mon frère: Omar et ma sœur: Soumia*

*A mes aimables petites nièces:*

*Hibat Errahmene, Alaa Errahmene et Roeya*

*A mon fiancé: Mourad*

*A mes fidèles amies: Nawel, Sarah et Assia*

*A toute ma famille*

*Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux.*

*Mebarka LAMAMRA*

## REMERCIEMENTS

*Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'il est, sans l'aide de ALLAH qui m'a donné la force afin de l'accomplir.*

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à mon promoteur, le professeur Hocine LAOUER, qui a su, à sa façon, me conseiller et m'orienter tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Je remercie vivement les membres de ce jury:*

- *Monsieur le professeur D. HARZALLAH*  
*Je suis très honorée que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude.*
- *Monsieur le docteur S. KHENNOUF, votre venue en tant qu'examineur m'honore, je vous suis très reconnaissante et je vous adresse mes vifs remerciements.*
- *Monsieur le professeur S. AKKAL, Merci pour avoir accepté de faire partie du jury de ce mémoire, pour l'intérêt que vous portez à mon travail et pour le temps consacré afin de l'évaluer.*

*Mes vifs remerciements s'adressent au docteur N. BOULACHÈB pour son aide et sa contribution à la récolte durant les sorties à djebel Megress.*

*Je remercie également monsieur P. SOIZIC de l'université de Paris (France) et N. BALDOVINI de l'université de Nice (France) pour leurs contributions et leurs aides concernant la réalisation des analyses chimiques des huiles essentielles.*

*Je remercie de même Dr. F. SAHLI qui m'a accueilli dans son laboratoire de bactériologie du CHU de Sétif, pour les conditions techniques mises à ma disposition afin de réaliser la partie de l'activité antibactérienne.*

*Un immense merci au personnel du laboratoire de bactériologie du CHU de Sétif: IBRAHIM, SACI, FOUAD, HALIM, BIAZ et SOUHILA.*

*ABDENOUR ADJAÛD, maître assistant à l'université Mira de Bejaia, permettez moi de vous remercier pour votre soutien, votre disponibilité ainsi que pour votre aide technique si précieux.*

*Mes remerciements particuliers sont adressés à mes amies : MERJEM EL-KOLLI, NAOUEL BOUSOUALIM, et MERJEM JARMOUNI de m'avoir procuré l'aide quand j'en avais besoin.*

*Toutes mes salutations à tous mes collègues de la promotion de magister 2007 pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.*

*Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements*



## Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>A. sicula</i> .....	50
Tableau 2: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>F. hexapetala</i> .....	54
Tableau 3: Activité antibactérienne des antibiotiques standards.....	59
Tableau 4 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Filipendula hexapetala</i> .....	64

## Liste des figures

Figure 1: <i>Athamanta sicula</i> .....	3
Figure 2: <i>Filipendula hexapetala</i> .....	6
Figure 3: Glande sécrétrice avec cuticule dans la face inférieure..... de la feuille d' <i>Origanum vulgare</i>	9
Figure 4: Les poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan.....	9
Figure 5: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles.....	14
Figure 6: Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile.....	19
Figure 7: Principe schématisé de l'appareillage .....	21
d'hydrodistillation sous micro-ondes	
Figure 8: Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM.....	24
Figure 9: Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles.....	32
Figure 10: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants..... et de leurs cofacteurs métalliques	35
Figure 11: Dispositif d'extraction Clevenger.....	39
Figure 12: Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne.....	43
Figure 13: Forme libre et réduite du DPPH.....	44
Figure 14: Rendement en huile essentielle obtenu par hydrodistillation.....	47
Figure 15: Profil chromatographique de l'huile essentielle d' <i>Athamanta sicula</i> .....	49
Figure 16: Pourcentage de différents composants de l'huile essentielle d' <i>A. sicula</i> .....	51

Figure 17: Profil chromatographique de l'huile essentielle .....53 de <i>Filipendula hexapetala</i>	53
Figure 18: Pourcentage de differents composants de l'huile essentielle .....55 de <i>Filipendula hexapetala</i> .	55
Figure 19: Sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques testés.....60	60
Figure 20: Expression de l'activité de l'HE d' <i>A. sicala</i> sur quelques .....61 souches bactériennes testées	61
Figure 21: Expression de l'activité de l'HE de <i>F. hexapetala</i> sur .....65 quelques souches bactériennes testées.	65

## Liste des abréviations

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µl: microlitre

ADN: acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de NORmalisation

ATCC : American Type Collection Culture

BHA : Butylhydroxyanisol

BHT : Butylhydroxtoluene

CCM: chromatographie sur couche mince

CFU: Colony forming units

CLHP: chromatographie liquide à haute performance

CMI : concentration minimale inhibitrice

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DO : densité optique

DPPH : Diphénylpicrylhydrazine

GC/MS: Gas chromatograph/ mass spectrometer

HE: huiles essentielle

IC<sub>50</sub> : concentration d'inhibition de 50% des radicaux libres

MH: milieu de Mueller Hinton

min : minute

ml : millilitre

mM : milliMolaire

mm: millimètre

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standartrd

PI : pourcentage d'inhibition

RMN: résonance magnétique nucléaire

ROS : Reactive oxygen spices

UV : Ultra-violet

## Introduction

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant l'efficacité et la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, le développement de la résistance des micro-organismes aux divers antibiotiques préoccupent les spécialistes en médecine. D'un autre côté, l'utilisation des additifs tels que les antioxydants est suspectée d'avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur.

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes de la résistance bactérienne et de l'oxydation des aliments. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien et antioxydant. Ainsi les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (Bruneton, 1999; Teuscher *et al.*, 2005). Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative pour le traitement des maladies infectieuses (Chalchat *et al.*, 1997; Baser *et al.*, 2001) et pour la protection des aliments contre l'oxydation (Deans *et al.*, 1994 ; Miguel *et al.*, 2003).

Les plantes aromatiques sources de ces substances sont largement répandues dans la nature. L'Algérie abrite un ensemble d'espèces importantes et variées et témoigne de ce fait d'une richesse floristique incontestable. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier certaines plantes, poussant à l'état spontané dans les monts de la région de Sétif et de Bejaia. Ce travail a pour objet l'extraction et l'analyse chimique puis l'activité biologique des huiles essentielles de deux espèces appartenant à deux familles botaniques différentes; la famille des Apiacées représentée par l'espèce *Tinguarra sicula* et la famille des Rosacées représentée par l'espèce *Filipendula hexapetala*.

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties. La première partie propose une mise au point bibliographique. Elle est divisée en deux chapitres. Le premier chapitre est consacré à l'étude des plantes médicinales. Le second chapitre traite la valorisation des ressources végétales par une meilleure connaissance de la composition chimique et de l'activité biologique des huiles essentielles. Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal, puis l'extraction des huiles essentielles et enfin, l'étude de son activité biologique. Les résultats obtenus sont ensuite amplement discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, les annexes et la liste des références bibliographiques.

*PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE*

*CHAPITRE I*

*ETUDE DES PLANTES MEDICINALES*

## **I-1- Phytothérapie**

Le recours à la phytothérapie s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité, non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans le système de santé. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% de la population mondiale compte toujours sur l'utilisation des plantes médicinales comme un premier traitement (Khalil et *al.*, 2007).

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie: en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. C'est pour cela que l'industrie pharmaceutique se tourne vers la nature et a entrepris une vaste étude sur le terrain pour répertorier les plantes les plus prometteuses parce qu'il est nécessaire aujourd'hui, de valider l'usage traditionnel de ces plantes et d'évaluer scientifiquement leurs activités pharmacologiques retenues (Bahorun, 1997).

## **I-2- Botanique et propriétés des Apiacées (ex-Ombellifères)**

La famille des Apiacées est caractérisée par les rayons de l'inflorescence disposés comme ceux d'une ombrelle. Cette famille comprend environ 300 – 455 genres et 3000 – 3750 espèces (Tabanca et *al.*, 2006). En Algérie, selon Quezel et Santa (1962), elle est représentée par 55 genres, 130 espèces et 27 sous – espèces. Les espèces présentent une distribution bipolaire (dans toutes les régions tempérées), mais la majorité habitant l'hémisphère Nord tempéré, d'autres comme la carotte sont cosmopolites.

Les ombellifères ont une homogénéité morphologique si remarquable grâce à ses inflorescences en ombelles. Elles sont généralement des herbes, parfois arbustes annuelles, bisannuelles ou vivaces à tiges souvent cannelées et creuses par résorption de la moelle, certaines ont une racine tuberculeuse (carottes) ou même un véritable tubercule, certaines possèdent un rhizome (angéliques), les feuilles, alternes, différemment composées ou découpées, rarement entières engainants au niveau des nœuds, les inflorescences ombellifères simples ou le plus souvent composées d'ombelles, les fleurs sont blanches ou, plus rarement, jaunâtres, verdâtres ou rosées, toujours de dimensions réduites. En général actinomorphes et épigynes, les fleurs sont hermaphrodites. Le fruit est un schizocarpe à deux méricarpes cylindriques ou aplaties avec une graine à tégument très mince, un albumen charnu, huileux et un très petit embryon droit à cotylédons inégaux. Les Apiacées possèdent un système de canaux sécréteurs schizogènes dans tous

les organes libérant des monoterpènes, caractérisant l'odeur de la famille. Elle contient également des oléorésines et des alcaloïdes (Caratini, 1971 ; Laouer, 2004; Spichiger, 2004).

La famille des Apiacées renferme de nombreuses espèces économiquement importantes, certaines sont des plantes alimentaires (carotte, fenouil, céleri...), d'autres sont des condiments utilisés depuis longtemps en cuisine à cause des huiles essentielles produites par leurs canaux sécréteurs (persil, coriandre, carvi...). En phytothérapie, on leur attribue principalement des propriétés digestives (Bruneton, 1999; Reynaud, 2002).

### **I-3- Botanique du genre *Tinguarra* (synonyme: *Athamanta*)**

Le genre *Athamanta* (du nom *Athamas*, montagne de Crète où se trouve la plante) est composé d'environ 9 espèces, qui sont distribuées principalement dans le Sud-Est de l'Europe. Ce sont des plantes vivaces appartenant à la famille des Apiacées, dont les fleurs sont principalement blanches à cinq pétales, velus en dehors, à peine échancrés, avec une pointe recourbée en dedans. Les ombelles et les ombellules sont munies d'une collerette à plusieurs folioles simples, étroites et membraneuses. Le fruit est velu, plus de deux fois plus long que large, chaque moitié du fruit porte 5 côtes égales arrondies, peu saillantes (Bonnier, 1990; Camarda et *al.*, 2008). Selon Quezel et Santa(1962), le genre *Athamanta* est constitué de plantes grisâtres tomenteuses des rochers verticaux, surtout calcaires. Les feuilles sont molles et pennatiséquées.

### **I-4- Les principaux constituants chimiques**

Les plantes nous offrent plus de composés nouveaux que tous les chimistes du monde ne pourraient jamais synthétiser pendant mille ans d'efforts. Les études phytochimiques entreprises jusqu'à maintenant sur le genre *Athamanta* rapportent la présence de coumarines, de flavonoïdes et d'acides gras (Camarda et *al.*, 2008). Cependant les fruits d'*Athamanta cretensis* renferment une essence et de l'athamantine, une poudre blanche, cristalline, insoluble dans l'eau, très soluble dans l'alcool et les huiles (Fournier, 1947).

### **I-5- Usages traditionnels**

Camarda et *al.* (2008) disaient que quelques espèces du genre *Athamanta* sont utilisées dans la médecine traditionnelle comme antiseptiques, diurétiques et dans la thérapie des scléroses. Les fruits d'*Athamanta cretensis* ont été très réputés autrefois comme diurétiques, stomachiques, nervins, emménagogues, on les utilisait également contre la flatulence, la gravelle, l'atonie vésicale, les coliques spasmodiques, la toux chronique, la plante entière est aussi aromatique, apéritive et digestive (Fournier, 1947).

## **I-6- *Athamanta sicula* (synonyme: *Tinguarra sicula*) (Fig.1)**

### **I-6-1- Description botanique**

C'est une plante annuelle vivace, sa taille varie entre 30 et 100 cm, entièrement grisâtre tomenteuse, tiges de 20-60 cm, ses feuilles sont luisantes en dessus tripennatiséquées, molles, à divisions très nombreuses ovales oblongues, fortement crénelées. Involucre et involucelle à 2-5 bractées. Ombelles à 10-20 rayons, les fleurs sont blanches, les semences oblongues, le fruit très hispide, 4-6 fois plus long que large. Elle croit dans les falaises calcaires et verticales dans une fourchette d'altitude variant de 100 mètres jusqu'à 1500 mètres en Afrique et dans le sud de l'Italie particulièrement en Sicile sur les rochers et dans tout le Tell algérien (Quezel et Santa, 1962; Camarda et *al*, 2008).



**Fig. 1 : *Athamanta sicula***

### **I-6-2- Systématique et nomenclature**

*Athamanta sicula* appartient au:

- Règne: Végétal
- Embranchement: Spermaphytes
- Sous embranchement: Angiospermes
- Classe: Dicotylédones
- Ordre: Apiales
- Famille: Apiacées
- Genre: *Athamanta*
- Espèce: *Athamanta sicula*



### **I-6-3- Usages traditionnels**

Dans la médecine populaire, *Athamanta sicula* est connue en Italie sous le nom de “spaccapietre” (fendeur des roches), l’infusion de ses racines fraîches est indiquée dans le traitement des maladies de l’appareil urinaire. Elle est conseillée spécifiquement pour faire dissoudre les calculs rénaux (Camarda et *al.*, 2008).

### **I-7- Botanique et propriétés des Rosacées**

La famille des Rosacées réunit selon Cartini (1971), 3000 – 3500 espèces réparties en 100 – 115 genres. Cette famille cosmopolite, habite spécialement dans les régions tempérées de l’hémisphère Nord. Elle comprend des plantes herbacées (aussi bien des annuelles que des vivaces, fréquemment rampantes) des arbustes souvent épineux ou encore des arbres. Les feuilles généralement alternes, simples ou composées, stipulées. Les fleurs régulières à symétrie rayonnée et parfois réunis en inflorescences: épis, grappes, corymbes, etc. les fruits très divers : une drupe, un akène, une baie, plus rarement une capsule, un follicule et les graines sont petites pratiquement sans albumen. Certaines Rosacées sont des plantes alimentaires (pomme, nèfle, abricot, cerise, pêche, poire...). D’autres sont des plantes médicinales (alchémille, aubépine, reine des près, amande...) (Spichiger, 2004).

### **I-8- Botanique du genre *Filipendula***

Le genre *Filipendula* (mot du latin, signifie « suspendu à un fil ») comprend environ 52 espèces habitant les contrées tempérées de l’Europe, de l’Asie, du Nord de l’Afrique et de l’Amérique. Ce sont des plantes herbacées, des arbrisseaux ou des arbustes de 30-60 cm d’hauteur, à racines portantes au sommet des renflements ovoïdes. Les feuilles sont composées de nombreuses folioles dentées, opposées, le long du rachis, par paires alternativement grandes et petites. L’inflorescence est en cyme ou en anthères paniculées, plus ou moins corymbiforme, très ramifiée, très florifère. Les fleurs sont petites avec 5-6 sépales ; 5-6 pétales, blancs, roses ou purpurins et de nombreuses étamines. L’ovaire est constitué de 5-12 carpelles, libres et dressés (Fournier, 1947 ; Maire, 1980 ; Bonnier, 1990). La filipendule est assez rare çà et là dans le Tell et représentée par une seule espèce en Algérie (*Filipendula hexapetala* Gibb.) Synonyme : *Spireae filipendula* L (Quezel et santa, 1962).

### **I-9- Les principaux constituants chimiques :**

Des études phytochimiques du genre *Filipendula hexapetala* ont prouvé la présence de l'acide salicylique et de ses dérivés, des flavonoïdes, de l'acide ascorbique, des acides phénolcarboxyliques, des tannins hydrolysables et des procyanidines. (Pavlovic et *al.*, 2007).

La reine des prés (*F. ulmaria*) renferme des hétérosides de flavonols, des tannins et des hétérosides d'acides-phénols, xyloglucosides du salicylate de méthyle et de l'aldéhyde salicylique, son huile essentielle obtenue par hydrodistillation contient, entre autre, du salicylate de méthyle et de l'aldéhyde salicylique, ce dernier étant largement majoritaire dans l'huile essentielle des fleurs (Bruneton, 1999).

### **I-10- Usages traditionnels**

Les extraits de la filipendule ont été utilisés comme : anti-inflammatoire, analgésique, antirhumatismales, diurétique, astringent et agents diaphorétiques dans la médecine traditionnelle en Europe et d'autres pays. La reine des prés (*F. ulmaria*) est réputée pour ses propriétés antirhumatismales, antispasmodiques, diurétiques, analgésiques, anti-inflammatoires et fébrifuges (Donadieu, 2006).

### **I-11- *Filipendula hexapetala* (synonyme: *Filipendula vulgaris*, *Spiraea filipendula*) (Fig.2)**

#### **I-11-1- Description botanique**

Cette plante vivace verte, presque glabre, aux racines portant des rhizomes à leurs extrémités, tiges raides, dressés, mesure entre 30- 80 cm d'hauteur, les feuilles pennées d'un vert plus foncé, à nombreuses folioles petites, serrées, incisées-dentées et un peu frisées, la plupart des feuilles en rosette basilaires. Les fleurs blanches ou d'un blanc mêlé de rougeâtre, odorantes en rosette, la corolle a normalement 5 pétales, mais assez souvent 6 ou 7 pétales d'où l'adjectif hexapetala, le fruit un akène brun velue. Cette espèce originaire d'Europe et d'Asie est très répandue en Serbie, tolère des conditions relativement sèches et pousse souvent dans les prairies maigres et les pentes sèches sur calcaires (Fournier, 1947 ; Maire, 1980 ; McClintock et *al.*, 1997; Burnie et *al.*, 2006; Pavlovic et *al.*, 2007).



**Fig. 2 :** *Filipendula hexapetala*

### **I-11-2- Systématique et nomenclature**

*Filipendula hexapetala* appartient au

- Règne: Végétal
- Embranchement: Spermaphytes
- Sous embranchement: Angiospermes
- Classe: Dicotylédones
- Ordre: Rosales
- Famille: Rosaceae
- Sous-famille : Rosidées
- Genre: *Filipendula*
- Espèce: *Filipendula hexapetala*

### **I-11-3- Les principaux constituants chimiques de *Filipendula hexapetala***

Des études antérieures des fleurs de *F. hexapetala* ont montré l'existence de flavonoïdes, d'acides phénoliques, de salicylate, d'acide ascorbique, de tannins, d'acides gras et des polysaccharides, des traces de coumarines un glucoside : la gaulthérine et une diastase : la gaulthérase (Bonnier, 1990 ; Pavlovic et *al.*, 2007).

### **I-11-4- Usages traditionnels de *Filipendula hexapetala***

*Filipendula vulgaris* a une longue histoire d'usage dans la médecine traditionnelle et la phytothérapie dans plusieurs pays comme: la Serbie, la Pologne, l'Ukraine et la Bulgarie, c'est

l'une des plus fréquente plante médicinale utilisée dans les régions montagneuses de la partie centrale du Nord Balkan (Radulović et *al.*, 2007).

Maksimovic et *al.* (2007) indiquent que les fleurs du *F. hexapetala* sont diaphorétiques, diurétiques, astringent, antirhumatismales et anti inflammatoire au même titre que les fleurs de *F. ulmaria*. Cette plante a les mêmes usages ethnopharmacologique que *Filipendula ulmaria*, ses racines tubéreuses contiennent de l'amidon, elles sont comestibles mais amers. La décoction de ces racines saupoudrées est utilisée pour traiter les problèmes de reins, l'essoufflement, le cornage, les angines et la congestion.

A cause de la présence d'une grande quantité des tannins dans ses racines par rapport à *F.ulmaria*, *F.vulgaris* est fréquemment utilisée pour le traitement des maux d'estomac et de la diarrhée, d'autres propriétés ont été exploité pour soigner la grippe et la goutte. Le thé préparé des feuilles de *F.vulgaris* est efficace pour le nettoyage des blessures et des plaies des yeux, des propriétés anti- inflammatoire, antipyrétique, analgésique et antirhumatismales ont aussi été constatées (Radulović et *al.*, 2007).

*CHAPITRE II*

*VALORISATION DES RESSOURCES VEGETALES*

*PAR*

*L'UTILISATION DES HUILES ESSENTIELLES*

## II-1- Définition des huiles essentielles

Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveur généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes (Belaiche, 1979 ; Valnet, 1984 ; Wichtel et Anthon, 1999). Pour Bruneton (1999), les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont «des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation». La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme: «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (Garnero, 1996).

## II-2- Répartition, localisation et fonction:

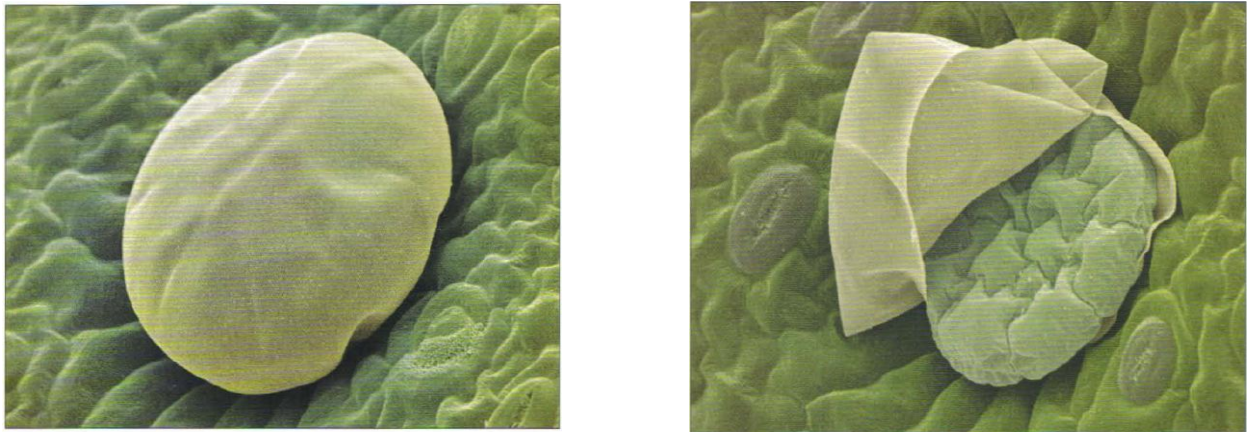
Selon Bruneton (1999), les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent ces huiles essentielles sont connues sous le nom de plantes aromatiques, réparties dans un nombre limité de familles, ex : Myrtacées, Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiacées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées, etc.

Tous les organes végétaux peuvent renfermer des huiles essentielles en particulier les sommités fleuries (Lavande, Menthe). On les trouve aussi dans les écorces (Cannelier), les racines (Vétiver), les rhizomes (Gingembre), les fruits (Anis, Fenouil, Badiane), le bois (Camphrier), les feuilles (Citronnelle, Eucalyptus), les graines (Muscade) et les boutons floraux (clou de Girofle) (Belaiche, 1979 ; Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999 ; Ghestem et *al.*, 2001).

Pour Guignard et *al.* (1985), il n'existe pas de règle générale concernant les lieux d'accumulation des métabolites secondaires telles que les huiles essentielles dans l'organisme végétal. Par contre pour Garneau (2004), la plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes (Fig.3). Les structures glandulaires et les cellules sécrétrices isolées peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe.

Les structures anatomiques spécifiques spécialisées dans la sécrétion des huiles essentielles sont très diverses: poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou poches sécrétrices schizolyziques (Aurantiacées), des canaux sécréteurs (Conifères et Apiacées), poils sécréteurs (Lamiacées et Astéracées) (Fig.4), et cellules sécrétrices isolées (Lauracées, Magnoliacées et Pipéracées) (Belaiche, 1979 ; Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1999 ; Ghestem et *al.*, 2001).

Binet et Brunel (1968) signalent que ces canaux et ces poches sont dit schizogènes s'ils se forment par écartement des cellules sécrétrices et lysigènes s'ils se forment grâce à leur lyse, mais il est fréquent que les deux modes de formation coexistent (canaux et poches schizolyzigènes). Ghestem et *al.* (2001) indiquent, que la teneur des plantes en huiles essentielles est faible, souvent inférieure à 1%. Il existe, cependant, des exceptions telles que le clou de girofle qui renferme plus de 15%.



**Fig.3: Glande sécrétrice avec cuticule dans la face inférieure de la feuille d'*Origanum vulgare* (Svoboda et *al.*, 2000)**



**Fig. 4: Les poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan (Porter, 2001).**

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (Rai et *al.*, 2003). Elles sont en général considérées comme des déchets du métabolisme (Amiot, 2005) ou des sous produits de l'activité métabolique d'une plante (Banthrope et *al.*, 1992 in Amiot, 2005). Cependant, plusieurs effets apparent utiles ont été décrits telles que la réduction de la compétition des autres espèces de plantes (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines par exemple le cinéole et le camphre, libérés dans l'atmosphère par *Salvia leucophylla* sont absorbés par le sol sec, inhibant la germination des espèces prairiales ainsi que la protection contre la flore

microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (Porter, 2001; Guignard et *al.*, 2004).

Certains auteurs pensent que les huiles essentielles pourraient avoir un rôle attractif vis-à-vis des insectes pollinisateurs et favoriseraient ainsi la pollinisation (Bruneton, 1999 ; Abou Zeid, 2000 ; Guignard, 2000). D'autres auteurs affirment que les huiles essentielles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement. Belaiche (1979) signale que l'utilité des huiles essentielles pour les plantes désertiques est liée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes. Les vapeurs aromatiques permettent de saturer l'air autour de la plante empêchant, le jour, la température de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de baisser de façon excessive.

Les essences pourraient constituer des supports à une communication et ce d'autant mieux que leur variété structurale autorise le transfert de messages biologiques sélectifs (Bruneton, 1999), tandis que Guignard et *al.* (1985) considèrent l'huile comme une source énergétique : «mis en réserve pendant le jour, ils seraient dégradés durant la nuit en acétyl CoA ».

### **II-3- Propriétés physiques des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des liquides à température ordinaire, d'odeur aromatique très prononcée, généralement incolores ou jaune pâle à l'exception de quelques huiles essentielles telles que l'huile de l'Achillée et l'huile de la Matricaire. Ces dernières se caractérisent par une coloration bleu à bleu verdâtre, due à la présence de l'azulène et du chamazulène (Abou Zeid, 2000).

La plupart des huiles essentielles ont une densité inférieure à celle de l'eau et sont entraînable à la vapeur d'eau ; il existe, cependant, des exceptions telles que les huiles essentielles de Safran, de Girofle et de Cannelle dont la densité est supérieure à celle de l'eau. Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire (Paris et Hurabille, 1981 ; Duraffourd et *al.*, 1990 ; Salle et Pelletier, 1991). La densité nous renseigne selon Garner (1996) sur la composition chimique : ainsi une densité inférieure à 0.9 indique la présence, dans cette huile, de composés terpéniques et aliphatiques à des taux élevés, alors qu'une densité supérieure à 1 indique une composition très variée en composés terpéniques polycycliques.

Les huiles essentielles s'évaporent et se volatilisent à température ambiante. Très peu solubles dans l'eau à laquelle elles communiquent leurs odeurs, cette eau est dite «eau distillée florale». Les huiles essentielles sont solubles dans les alcools, dans les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques (Paris et Hurabille, 1981 ; Bruneton, 1999 ; Abou Zeid, 2000 ; Ghestem et *al.*, 2001). Leur point d'ébullition est toujours supérieur à 100°C et dépend de leurs poids moléculaires par exemple les points d'ébullition du caryophyllène, du géraniol, du citral et du  $\alpha$ -pinène sont 260°,



230°, 228° et 156°C respectivement (Abou Zeid, 2000), mais d'après Valnet (1984), ce point varie de 160°C à 240°C.

Les huiles essentielles s'oxydent facilement à la lumière et se résinifient en absorbant de l'oxygène, en même temps, leurs odeurs se modifient, leurs points d'ébullition augmentent et leurs solubilités diminuent. Elles absorbent le chlore, le brome et l'iode en dégageant de la chaleur (Duraffourd *et al.*, 1990).

## **II-4- Composition chimique**

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir (BACIS, 1999). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) (Fig.5) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane (Fig.5), beaucoup moins fréquents. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

### **II-4-1- Les composés terpéniques**

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone ( $C_5H_8$ ) reconnue par Wallach dès 1887 in Lamarti *et al.* (1994). Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» énoncée en 1953 par Ruzicka in Lamarti *et al.* (1994). Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique. Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion (IPP en composés terpéniques dans les trois compartiments: cytoplasmes, mitochondries et plastes) sont hydrosolubles ou membranaires. Ces derniers permettent l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20 et 30 atomes de carbones (Lamarti *et al.*, 1994). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999) et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives (Pibiri, 2006).

Il convient de souligner que la synthèse des terpènes n'est pas propre aux végétaux. Le squalène, ainsi que son nom l'indique est un terpène abondant chez les requins. Des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent également chez les spongiaires et les coelentérés (Guignard, 2000)

Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures prédominent (ex.

l'essence de Térébenthine) dans d'autres, la majeure partie de l'essence est constituée de composés oxygénés. Il est à noter que l'odeur et le goût des huiles essentielles sont donnés par ces composés oxygénés. Parmi ces composés oxygénés, on note d'alcools (géraniol, linalol), d'esters (acétate de linalyle), d'aldéhydes (menthone, camphre, thuyone), les cétones, les éthers, les phénols et les peroxydes (Paris et Hurabielle, 1981; Svoboda et Hampson, 1999).

#### **II-4-1-1- Les monoterpènes**

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est  $C_{10}H_{16}$  (Rahal, 2004). Ces composés peuvent être: monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes), monoterpènes monocycliques ( $\alpha$ - et  $\gamma$ -terpinène, p-cymène) et aux monoterpènes bicycliques (pinènes,  $\Delta^3$ -carène, camphène, sabinène). Selon Bruneton (1999), la réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions: alcools, cétones, esters, aldéhydes, éthers, peroxydes, phénols.

#### **II-4-1-2- Les sesquiterpènes**

Ils comportent trois unités d'isoprène, leur formule est  $C_{15}H_{24}$  soit une fois et demie (sesqui) la molécule des terpènes (Belaiche, 1979). Ils présentent une grande variété dans les structures conduisant à un nombre élevé de possibilités, ce qui a retardé l'élucidation de leurs structures (Rahal, 2004). Les sesquiterpènes peuvent être également, comme les monoterpènes, acycliques (farnésol), monocycliques (humulène,  $\alpha$ -zingibèrene) ou polycycliques (matricine, artéannuine,  $\beta$ ,artémisinine). Ils renferment aussi des fonctions comme alcools (farnésol, carotol,  $\beta$ -santalol, patchoulol), cétones (nootkatone, cis-longipinane-2.7-dione,  $\beta$ -vétivone), aldéhydes (sinensals), esters (acétate de cédryle) (Bruneton, 1999 ; Laouer, 2004).

#### **II-4-2- Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane**

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogenèse est totalement différente (Paris et Hurabielle, 1981). Bruneton (1999) considère que ces composés sont très souvent des allyl- et propenyl phénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (Anis, Fenouil: anéthole, anisaldehyde, méthyl-chavicol=estragole. Persil : apiole) mais aussi de celles du Girofle (eugénol), de la Muscade (safrol, eugénol), de l'Estragon (eugénol), du Basilic (eugénol), de l'Acore (asarones) ou des Cannelles (cinnamaldéhyde eugénol safrol). On peut également selon le même auteur, rencontrer dans les huiles essentielles des composés en  $C_6-C_1$  comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'anthranilate de méthyle. Les lactones dérivées des cinnamiques (par exemple les coumarines) étant, au moins pour les plus

simples d'entre elles, entraînaibles par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles.

#### **II-4-3- Les composés d'origines diverses**

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras, de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister mais sont rares. Enfin, il n'est pas rare de trouver dans les concrètes des produits de masses moléculaires plus importantes non entraînaibles à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants : homologues des phénylpropanes, diterpènes, etc... (Bruneton, 1999). Abou Zeid (1988) signale que le composé soufré le plus rencontré est l'allyl-isothiocyanate issu de la dégradation d'un glucoside sinigroside qui se trouve dans les graines de moutarde noire. Ce composé est incolore, fluide et de saveur piquante. Certaines plantes aromatiques produisent des huiles essentielles dont les composés terpéniques renfermant l'élément nitrogène. Parmi ces composés on cite l'indole, qui se trouve dans l'huile essentielle de citron et des fleurs de jasmin.

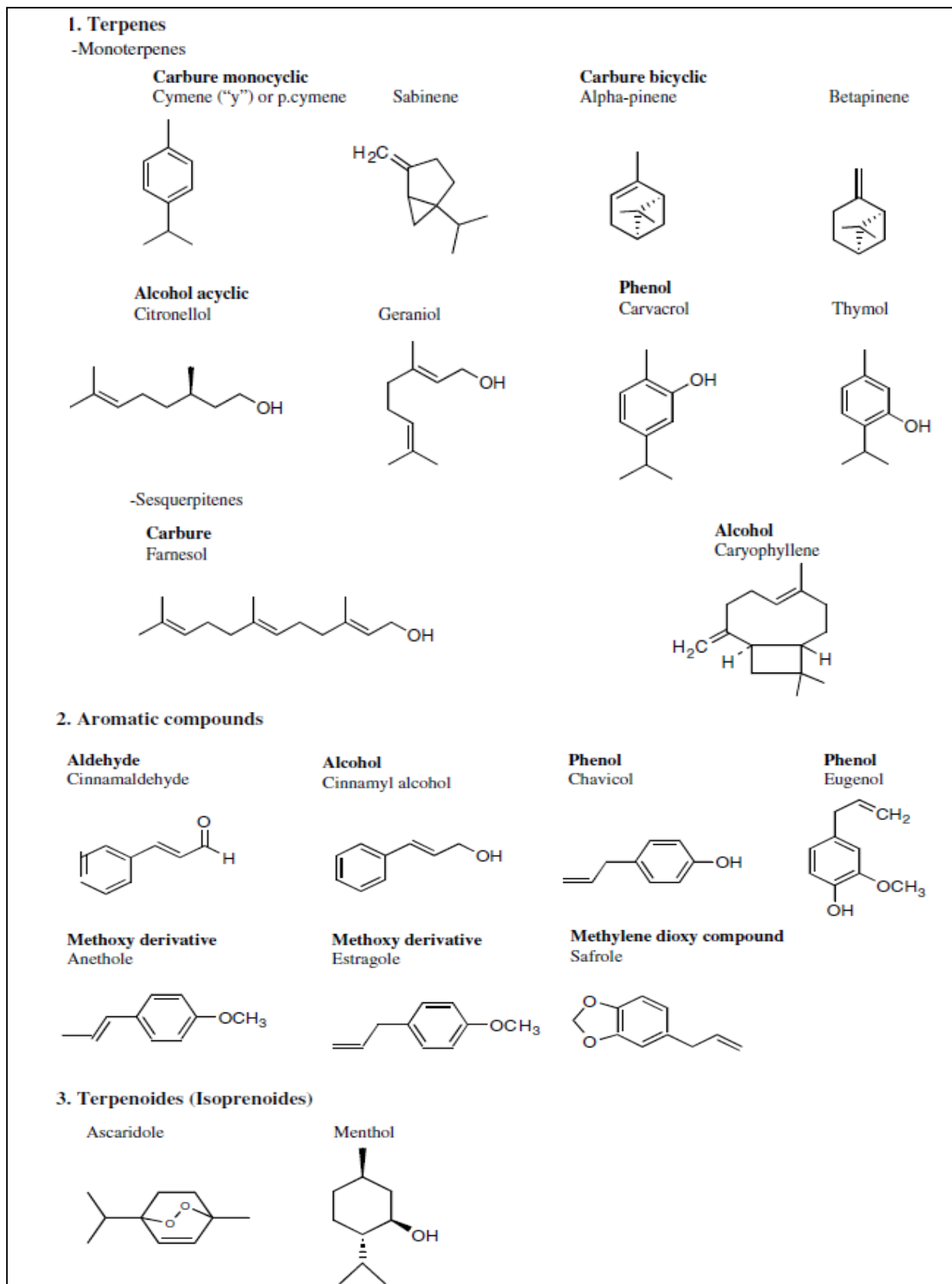


Fig. 5: Structure chimique de quelques composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008)

## II-5- Facteurs de variabilité des huiles essentielles

Selon Senator (1996) in Djibo et al. (2004) la présence ou l'absence de certains constituants dans la plante dépend de l'un ou de la combinaison de trois facteurs (le patrimoine génétique, l'âge

et l'environnement de la plante). En effet, l'influence des facteurs environnementaux, comme la température, l'humidité (Boira et Blanquer, 1998 ; Palà-paul et *al.*, 2001), l'altitude et latitude (Azevedo et *al.*, 2001 ; Oliveira et *al.*, 2005 ) la nature du sol (Oliveira et *al.*, 2005 ; Peng et Yang, 2005 ; Zheljaskov et *al.*, 2005) sur la composition chimique et le rendement des huiles essentielles a été décrite. Certaines auteurs se sont préoccupés d'autres facteurs tels que le cycle végétatif (Juteau et *al.*, 2002 ; Schwob et *al.*, 2004 ; Yayi et *al.*, 2004 ; Jordan et *al.*, 2006 ; Sefidkon et *al.*, 2007), l'âge et l'organe végétal (Skoula et *al.*, 1996 ; Silvestre et *al.*, 1997 ; Mockute et Judzentiene, 2003 ; Laouer, 2004), la période de récolte (Angelopoulou et *al.*, 2002 ; Cavaleiro et *al.*, 2003 ; Maderia et *al.*, 2005 ; Randrianalijaona et *al.* , 2005) les parasites, les virus et les mauvaises herbes (Svoboda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2001) qui influent sur le rendement et la composition chimique des huiles essentielles.

C'est ainsi que l'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Svoboda et Hampson, 1999).

Le rendement et la composition chimique des huiles essentielles varient également en fonction de la méthode d'extraction (khajeh et *al.*, 2004 et 2005 ; Viljoen et *al.*, 2006 ; Sefidkon et *al.*, 2007). La durée de séchage affecte aussi bien le rendement que la composition (Yayi et *al.*, 2004).

Les conditions principales requises pour une production rentable en huile essentielle sont : un bon matériel végétal, la variété de la plante, le sol, l'équipement de distillation, le climat (Smallfield, 2001).

- **Chémotype**

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce. En effet une même plante aromatique, botaniquement définie, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente en fonction du biotope dans lequel elle se développera ; ces variétés chimiques sont communément appelées chémotypes, types biogénétiques, races chimiques ou races biologiques.

Biochimiquement différent, deux chémotypes présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes (Lydie, 2002) mais aussi des toxicités très variables (Baudoux, 1997). La non-connaissance de cette notion capitale et le manque de précision laissent la porte ouverte aux échecs thérapeutiques et à la toxicité de certaines d'entre elles (Laouer, 2004).

On voit selon Bruneton (1999) l'importance qu'il y a, pour assurer la qualité du produit et sa constance, à étudier, définir, et contrôler l'ensemble des paramètres, de la culture à l'élaboration du produit final. Toute généralisation s'avère hasardeuse.

## **II-6- Toxicité des huiles essentielles**

Les HE sont des molécules actives. Elles peuvent avoir de graves effets secondaires. Il est important de respecter la posologie et la durée de la prise. Parmi ces effets, citons : des allergisants ou hypersensibilisants, photosensibilisants dus aux furocoumarines, neurotoxiques dus aux cétones, néphrotoxiques dus aux terpènes majoritaires dans l'huile essentielle de Térébenthine et des rameaux de Genévrier, hépatotoxiques dus aux phénols pris pendant des laps de temps trop importants ou à doses massives. L'eugénol, qui est l'un des constituants du Thym, est hépatotoxique. Chez l'enfant, 10 ml eugénol peut conduire à une insuffisance rénale. Il a été démontré que le linalol, l'un des constituants d'une autre espèce de thym, est cytotoxique pour les cellules de la peau humaine (Eisenhut, 2007 in Elkolli, 2008).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : la majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une dose létale (DL<sub>50</sub>) comprise entre 2 et 5 g/kg (Anis, Eucalyptus, Girofle...etc.) ou, ce qui est le plus fréquent, supérieure à 5 g/kg (Camomille, Lavande...etc.). D'autres, une quinzaine, ont une DL<sub>50</sub> comprise entre 1 et 2 g/kg : Basilic, Estragon, Hysope (1,5ml/kg). Les plus toxiques sont les huiles essentielles de Boldo (0,13 g/kg ; convulsions apparaissant dès 0,07 g/kg), de Chénopode (0,25 g/kg), de Thuya (0,83 g/kg), ainsi que l'essence de moutarde (0,34 g/kg) (Bruneton, 1999).

## **II-7- La filière des huiles essentielles**

Les plantes aromatiques donnent les huiles essentielles (HE), essences destinées à l'utilisation industrielle. Ces HE ne sont pas forcément des produits finaux dans la mesure où, une fois produites, elles peuvent servir d'intrants à la fabrication de plusieurs produits : elles sont destinées en effet à quatre grands secteurs industriels (Grysole, 2004).

- Secteur parfumerie/ cosmétique

L'utilisation des huiles essentielles comme base dans la fabrication de parfums constitue une pratique courante depuis des siècles dans la plupart des civilisations. L'Europe et les Etats-Unis ont développé des industries importantes qui démarquent par leur haut niveau d'exportation dans ce domaine. La consommation d'huiles dans ce secteur se caractérise par le besoin d'une très grande variété de produits, de quantités relativement faibles et de prix souvent élevés.

- Secteur parfumerie technique

La parfumerie technique (qui comprend les produits d'entretien ménager domestiques ou industriels) a également recours aux huiles essentielles pour l'image de propreté à laquelle elles sont associées, mais aussi parfois pour leurs propriétés antiseptiques. Par exemple, la citronnelle dégage un parfum qui indique au visiteur que l'endroit a été fraîchement lavé. Dans ce secteur, l'industrie consomme de grandes quantités d'huiles, au meilleur prix possible, car l'industrie désire garder le prix de revient de son produit au minimum.

- Secteur alimentation

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût des aliments, pour parfumer et colorer. Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros consommateur d'huiles. Aussi, les fabricants d'aliments préparés les utilisent de plus en plus parce que le nombre de produits augmente et le consommateur recherche d'avantage les produits avec des ingrédients naturels. Dans ce secteur, les volumes d'huiles essentielles peuvent être très importants. L'huile la plus utilisée dans le monde est l'huile essentielle d'orange.

- Secteur médecine

Dans le domaine de la santé, il faut distinguer le secteur pharmaceutique de celui des médecines douces. Dans ce deuxième secteur, les vertus thérapeutiques des huiles sont reconnues et utilisées depuis des siècles dans beaucoup de pays. En effet, ce marché a donné naissance à une industrie des produits naturels comme les produits homéopathiques. Cette industrie, très développée en Europe, bénéficie d'un attrait croissant de la part des consommateurs non seulement en Europe mais aussi en Amérique du Nord. De plus, les produits naturels avec effets thérapeutiques ont attiré l'attention des divers groupes pharmaceutiques.

Les huiles à utilisation médicinale peuvent être vendues pures en petits flacons ou sous forme de vaporisateurs, de pastilles, de bonbons... ces huiles peuvent également être utilisées comme inhalant pour soulager les difficultés respiratoires, comme dentifrice (dans l'eau), ainsi que pour rafraîchir ou soulager la gorge (Grysole, 2004). Par conséquent, les huiles essentielles ont une variété d'applications et, dans bien des cas, la même huile peut être recherchée pour des propriétés différentes selon les secteurs industriels. Les propriétés médicinales des HE sont nombreuses, mais chacune possède ses vertus particulières (Nicole, 1996).

## **II-8- La conservation des huiles essentielles**

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (Valnet, 1984 ; Salle et Pelletier, 1991).

## **II-9- Procédés d'extraction des huiles essentielles**

De tous temps, on connaît les vertus des «essences de plante» et on s'efforça de les extraire depuis la plus haute antiquité. C'est vers le 13<sup>ème</sup> siècle, en Europe, plus précisément dans le Sud de la France, au royaume des parfums, que l'on a commencé à explorer diverses méthodes d'extraction de ces huiles volatiles (France-Ida, 1996). Connaissant mieux les constituants des huiles, des techniques se sont développées visant à optimiser la qualité de l'huile tout en maintenant un rendement intéressant. La distillation est de loin, le procédé le plus utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.

- **La distillation**

Selon Benjilali (2004) la distillation peut être définie comme étant la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux (ébullition ou sublimation). La distillation peut s'effectuer avec recyclage de l'eau de distillation (cohobation), ou sans recyclage. La production des huiles essentielles se ferait donc en deux étapes : la diffusion de l'huile essentielle de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal, et l'évaporation et entraînement à la vapeur d'eau.

Bruneton (1999) signale que le principe de la distillation repose sur la propriété qu'ont les huiles essentielles d'être volatiles sous l'effet de la chaleur, l'huile est alors entraînée par la vapeur d'eau. Après condensation, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation.

Il existe deux méthodes de base de distillation pour l'obtention des huiles essentielles qui reposent sur le même principe : entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau. La différence entre eux réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal (Anes et *al.*, 1968 in Benjilali, 2004) :

- \* **L'hydrodistillation**

\*Distillation à l'eau ou «hydrodistillation» (Fig.6): le matériel végétal est en contact direct avec l'eau. Lorsque le végétal est broyé on parle de turbo distillation. Selon Bruneton (1999), l'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs



hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont : la calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle (Abou Zeid, 2000), La non maîtrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux) et la modification de l'odeur, de la couleur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation (Chalchat et *al.*, 1997).

Cette méthode est généralement utilisée en cas des huiles essentielles dont les constituants chimiques sont thermorésistants. Elle est aussi utilisée dans l'extraction des huiles à partir des feuilles et des fleurs fraîches ou séchées. Parmi les huiles extraites par cette méthode, on cite l'huile de menthe, de myrte et de l'herbe à citron (Haekel et Omar, 1993).

### **\* La distillation à la vapeur**

Distillation à la vapeur saturée : «vapo-hydrodistillation» : c'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des fins thérapeutiques (Bego, 2001). Le matériel végétal, dans ce cas, n'est en contact avec l'eau, se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (Anes et *al.*, 1968 in Benjilali, 2004; Belaiche, 1979).

Cette méthode est utilisée dans la distillation à partir de plantes fraîches telles que la menthe et le myrte et les plantes qui portent leurs huiles essentielles dans les feuilles qui sont cueillies puis partiellement coupées ensuite portées au dispositif de distillation. Puisque la plante fraîche est riche en eau, donc il n'est pas nécessaire de l'immerger (Haeckel et Omar, 1993).

Distillation à la vapeur directe : c'est une variante de l'entraînement à la vapeur qui consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0.02-0.15 bar) à travers la masse végétale du haut vers le bas, en utilisant la pesanteur comme force de déplacement de la vapeur, la composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie ; ce procédé est appelé distillation par hydrodiffusion (Anes et *al.*, 1968 in Benjilali, 2004; Bruneton, 1999). Il découle des recherches de Fathy et *al.* (1965), Rudolf (1968), de Vernon et Richard (1976) que l'entraînement à la vapeur d'eau est préférable à l'hydrodistillation du fait qu'elle permet une extraction totale des huiles essentielles en améliorant le rendement de 33% par rapport à l'hydrodistillation.

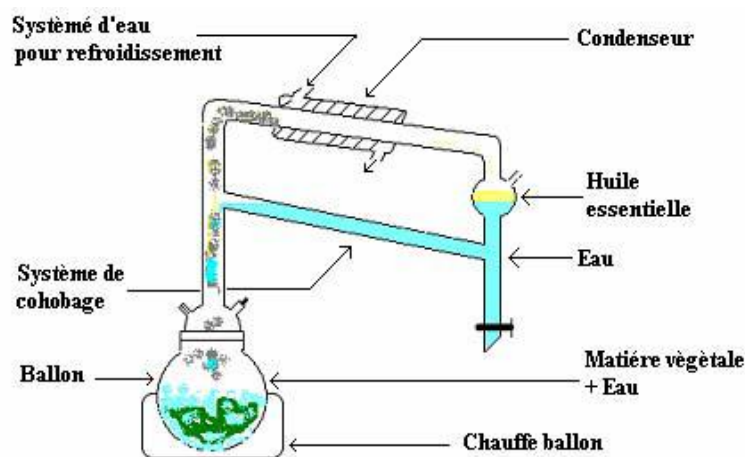


Fig. 6 : Appareillage utilisé pour l'hydrodistillation de l'huile (Hernandez Ochoa, 2005)

- **L'extraction par enfleurage**

Ce procédé met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisse (graisse animale type saindoux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (Jasmin) à 72 heures (Tubéreuse). Les pétales sont éliminées et remplacées par des pétales fraîches jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (Belaiche, 1979 ; France Ida, 1996). Pour certaines plantes, on procède à une immersion des fleurs dans de la graisse chauffée, c'est ce que l'on appelle enfleurage à chaud ou «digestion» (Bruneton, 1999). Cette méthode appelée également macération à chaud par d'autres auteurs est surtout utilisée pour les fleurs délicates qui perdent leurs arômes très rapidement après la cueillette, comme les violettes et certains lys (France-Ida, 1996). Cette technique laborieuse, qui demande une grande labilité, est de moins en moins employée au profit de l'extraction par les solvants, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvre qu'elle nécessite (Abou Zeid, 1988).

- **L'extraction par les solvants volatils**

Cette méthode est utilisée pour les organes végétaux présentant une concentration en essence relativement faible ou pour les essences que l'on ne peut extraire par distillation. Elle est basée sur le pouvoir qu'ont certains solvants organiques à dissoudre les composants des huiles essentielles. Dans ce procédé, un épuisement des plantes est effectué à l'aide d'un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux, très coloré et très aromatique appelé «concrète». Le traitement de cette concrète par l'alcool absolu conduit à «l'absolue» (Belaiche, 1979 ; Duraffourd et *al.*, 1990). Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité (pouvoir solvant à l'égard des constituants odorants), stabilité, inertie chimique, température

d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale, pas trop faible pour éviter les pertes et donc une élévation des coûts, sécurité de manipulation c'est à dire non toxique ou inflammable. Les solvants les plus utilisés sont les hydrocarbures aliphatiques : l'éther de pétrole et l'hexane, mais aussi le propane ou le butane liquide (sous pression). Si le benzène est un bon solvant, sa toxicité limite de plus en plus son utilisation. On a également recours aux solvants halogénés (dérivés chlorés et fluorés du méthane et de l'éthane) ainsi qu'à l'éthanol. Après l'extraction, le solvant est distillé et en fin de l'opération, le solvant qui imbibe la masse végétale est récupéré par injection de vapeur d'eau dans celle-ci (Bruneton, 1999).

L'extraction par les solvants présente toutefois des contraintes diverses liées en premier lieu au manque de sélectivité de ces produits : de nombreuses substances peuvent de ce fait se retrouver dans les concrètes (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, certaines coumarines) et imposer une purification ultérieure, et en second lieu, à la toxicité des solvants et leur présence sous forme de traces résiduelles dans l'extrait final (Bruneton, 1999). En effet, Viaud (1993) affirme que des analyses sérieuses, par les méthodes les plus modernes, montrent que les proportions de solvants résiduels dans les concrètes se situent entre 2 et 4% atteignant souvent 6% et même parfois 25%. Les absolues obtenues par lavage à l'alcool des concrètes contiennent encore des ppm importantes de ces solvants. De telles huiles ne sont donc pas admissibles à l'usage médical par contre, elles sont admissibles en parfumerie.

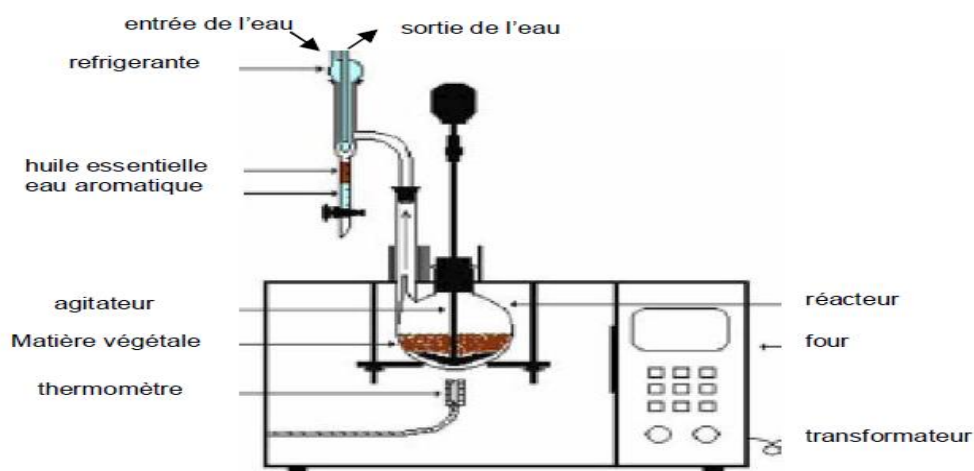
- **L'extraction par expression**

L'essence, altérable par entraînement à la vapeur d'eau, est ici extraite du péricarpe frais d'agrumes par différents modes d'extractions : dans l'industrie, les zestes sont dilacérés et le contenu des poches sécrétrices est récupéré par expression manuelle ou à l'aide de machines qui rompent les poches par expression et recueillent directement l'huile essentielle (Bruneton, 1999) ; ou encore après scarifications mécaniques, un entraînement de l'huile essentielle par un courant d'eau. L'essence est séparée par décantation comme précédemment (Paris et Hurabielle, 1981). Cette méthode artisanale est totalement abandonnée au bénéfice des machines utilisées pour permettre l'extraction des jus des fruits d'une part, et d'essence d'autre part (Belaiche, 1979).

- **L'extraction par micro-ondes**

C'est un procédé utilisant les micro-ondes et les solvants transparents aux micro-ondes pour extraire de façon rapide et sélective des produits chimiques de diverses substances (Paré, 1997). Le matériel végétal est immergé dans un solvant transparent aux micro-ondes de manière à ce que seul le végétal soit chauffé. Les micro-ondes vont chauffer l'eau présente dans le système glandulaire et

vasculaire de la plante, libérant ainsi les produits volatils qui passent dans le solvant (non chauffé). On filtre et on récupère ensuite l'extrait. L'extraction par micro-ondes a le grand avantage de réduire le temps d'extraction à quelques secondes (France Ida, 1996). Ce procédé (Fig. 7), très rapide et peu consommateur d'énergie, livre un produit qui, est le plus souvent, de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation traditionnelle (Bruneton, 1999). Par ailleurs, l'analyse des huiles essentielles obtenues par cette méthode a montré selon Scheffer (1996) que la composition qualitative des huiles essentielles était la même que celle des huiles obtenues par distillation mais le pourcentage des constituants variait de manière significative.



**Fig. 7: Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation sous micro-ondes (Lagunez-Rivera, 2006)**

- **Extraction par ultrasons**

Les micro-cavitations, générées par ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines celluloses. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation, des constituants des huiles essentielles. L'extraction par les ultrasons est une technique de choix, pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de faciliter l'extraction de molécules thermosensibles (Lagunez-Rivera, 2006).

- **Extraction au fluide supercritique**

Procédé relativement nouveau semblait à priori intéressant pour augmenter le rendement dans le cas de plantes peu riches en huiles essentielles. Il utilise les fluides à l'état supercritique pour extraire les composants contenus dans les végétaux. En effet, dans des conditions particulières de température et de pression situées au-delà du point critique, les fluides à l'état supercritique acquièrent des propriétés importantes qui se caractérisent par une bonne diffusibilité dans les

matières solides et un bon pouvoir solvant. C'est ainsi que plusieurs gaz sont actuellement utilisés industriellement, mais l'intérêt s'est porté tout particulièrement sur le dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> car, celui-ci présente d'incontestables atouts : produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, facile à éliminer totalement, sélectif, aisément disponible et peu coûteux (Bruneton, 1999 ; Wichtl et Anton, 1999).

L'extraction au fluide supercritique consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C). Le fluide ainsi obtenu traverse le produit à traiter et le charge en composé à extraire ensuite, il est détendu et passe en phase gazeuse et finalement se sépare du composé extrait. L'extraction des huiles essentielles par le CO<sub>2</sub> supercritique fournit selon Scheffer (1996) des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques. Bruneton (1999) précise aussi que cette méthode est utilisée maintenant pour préparer des extraits d'épices (gingembre, paprika, céleri), des arômes (thé noir, bois de chêne fumé) et des essences végétales pures (débarrassées des terpènes, dépourvues d'intérêts olfactifs et oxydables, ou privées de certains constituants) et que les produits obtenus par cette technique ont une composition proche de celle des produits naturels et ne comportent aucune trace résiduelle de solvant, contrairement à ce que l'on peut obtenir avec des solvants ordinaires.

En conclusion, et selon Collin (2000), il n'existe pas de procédé meilleur que d'autres. Chaque végétal, chaque partie du végétal, et l'utilisation du produit obtenu commandent la technologie à employer. Bien entendu, les aspects de rentabilité économique sont tout aussi importants.

## **II-10- Les méthodes d'analyse des huiles essentielles**

L'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituant présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter. En effet l'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile (France-Ida, 1998).

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase (Schwedt, 1993). Plusieurs méthodes existent :

- **Chromatographie sur couche mince**

La CCM (Fig. 8) est utilisée comme technique de routine, pour l'analyse rapide de fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. L'efficacité de la CCM comme technique de séparation est souvent mise à profit dans la phase ultime de purification, au moins sur de faibles quantités, lorsque les autres techniques ont montré leurs limites (Pradeau et Dauphin, 2007). La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption: la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (Caude et Jardy, 1996). Après la migration, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode. La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale  $R_f$  caractéristique de chaque composé. Bruneton (1999) précise que la technique du CCM, bien que beaucoup moins performante que la chromatographie en phase gazeuse, peut être utilisée en routine pour le contrôle de qualité des huiles essentielles.

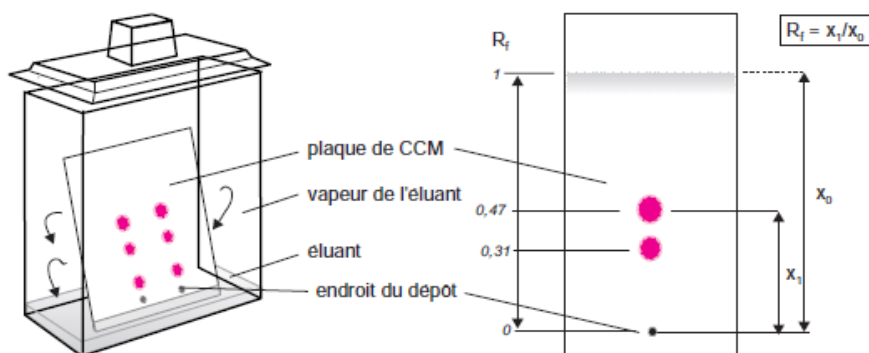


Fig. 8 : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM (Rouessac, 2004)

- **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Elle s'applique à des échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition dans l'injecteur. C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur. Le principe de la chromatographie en phase gazeuse basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou chromatographie de partage. Si la phase stationnaire est un solide

absorbant (silice, alumine...), on parle de chromatographie gaz-solide ou chromatographie d'adsorption (Audigie *et al.*, 1995).

La CPG permet une évaluation quantitative et qualitative de la composition chimique des huiles essentielles. Elle présente de nombreux avantages : facilité de mise en œuvre, temps d'analyse assez court et fiabilité des résultats (Bruneton, 1999).

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

Si la chromatographie permet à elle seule de séparer correctement les différents constituants d'un mélange, il est néanmoins délicat de se livrer à une interprétation structurale permettant une identification certaine, car les paramètres déduits de la rétention sélective des solutés au travers de la colonne sont souvent lourds à manier et, dans la plupart des cas, peu reliés aux édifices moléculaires organiques. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, dans le but d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique, s'est concrétisée dès 1960 dans la combinaison entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM (De Maack et Sablier, 1994).

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les 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. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables (Desjobert *et al.*, 1997; Bruneton, 1999).

- **La chromatographie liquide à haute performance**

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine. Les particules solides ont un diamètre pouvant atteindre jusqu'à 5  $\mu\text{m}$ . Le garnissage est tassé dans une colonne fermée. La phase mobile liquide circule sous l'effet d'une haute pression. L'injection de l'échantillon à analyser est pratiquée en introduisant un faible volume de produit (quelques microlitres) dans l'éluant sous pression. Après leur séparation, les différents constituants de l'échantillon sont détectés en sortie de colonne. Un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données (Audigie *et al.*, 1995 in Bencheikh, 2005). Cette technique est peu intéressante pour les fractions volatiles, toutefois elle est efficace pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour opérer des préfractionnements, on peut la coupler également à un analyseur de masse (Bruneton, 1999).

- **La Résonance Magnétique Nucléaire RMN**

La résonance magnétique nucléaire à haute résolution est un outil exceptionnel pour déterminer la structure d'une molécule naturelle ou synthétique. Grâce à la diversité des paramètres mesurables, elle permet d'aborder l'ensemble des problèmes posés par l'examen d'une molécule en solution. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de fournir la possibilité d'identifier les connexions entre atomes des diverses entités, squelette, groupes fonctionnels et finalement de permettre de les situer dans l'espace les uns par rapport aux autres. La stratégie présentée pour la détermination de structure par RMN est très efficace pour les molécules de dimension moyenne. Les méthodes de base de la RMN monodimensionnelle et bidimensionnelle sont le plus souvent suffisantes pour atteindre l'objectif fixé (Platzer, 2002).

### **II-11- Activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles**

De nombreuses études ont été réalisées en vue de l'estimation du pouvoir antiseptique des huiles essentielles depuis très longtemps, par exemple en 1881 Koch testa l'action bactéricide de l'essence de térébenthine sur les spores du charbon. Ensuite, Chamberland (1887) étudia l'activité des essences d'origan, de cannelle et de girofle sur *Bacillus anthracis*. En 1919, Bonnaure étudia le pouvoir antiseptique des lavandes et en 1935, Bose mit en évidence les relations entre la formule chimique et le pouvoir antiseptique (Belaiche, 1979).

Beaucoup d'articles scientifiques sont publiés chaque année par des médecins, des pharmaciens, des biologistes et des chercheurs qui travaillent sur les multiples propriétés des huiles essentielles et l'intérêt s'est porté tout particulièrement sur leur activité antimicrobienne. Parmi ces travaux citons ce de Deans et Ritchie (1987) qui ont étudié l'activité antibactérienne de 50 huiles essentielles sur 25 genres de bactéries en utilisant la technique de contact direct en milieu solide avec 4 concentrations différentes en huiles. Sous leur forme non diluée, toutes les huiles essentielles inhibent au moins un genre bactérien. Dix huiles essentielles ont manifestées des propriétés inhibitrices très remarquables. Ces huiles sont celles de l'angélique, du laurier, de la cannelle, du clou de girofle, du thym, de l'amande amer, de marjolaine, du piment, livèche et de la noix de muscade. Elles inhibent au moins 20 genres de bactéries testées. Janssen et *al.* (1988) ont testé le pouvoir inhibiteur de 53 huiles essentielles vis-à-vis de trois champignons dermatophytes : *Epidermaphyton floccosum*, *Trichophyton metagrophytus* et *T. rubrum*. Les résultats montrent que toutes les huiles essentielles riches en thymol, carvacrol, eugénol et cinnamaldehyde sont très actives sur les 3 microorganismes testés. De nombreux travaux comme ceux de Baser et *al.* (2001)



et Unlu et *al.* (2003) confirment l'efficacité des huiles essentielles riches en phénols sur les différentes espèces bactériennes et fongiques. Pattnaik et *al.* (1997) ont testé l'activité antimicrobienne de cinq constituants des huiles essentielles; le cinéole, le citral, le géraniol, le linalol et le menthol sur 18 bactéries (cocci Gram-positif et Gram-négatif) et 12 champignons (3 levures et 9 mycètes). Le linalol était le plus efficace et a inhibé 17 bactéries, suivi du cinéole et du géraniol (chacun a inhibé 16 bactéries). Le menthol et le citral ont inhibé 15 et 14 bactéries, respectivement. Contre les champignons, le citral et le géraniol sont les plus actifs (inhibition des 12 champignons), suivis par le linalol (qui a inhibé 10 champignons). Le cinéole et le menthol ont inhibé tous les deux 7 champignons.

Hammer et *al.* (1999) ont conduit une étude qui portait sur l'activité antimicrobienne de 47 huiles essentielles contre 10 microorganismes dont une levure (*Candida albicans*), tous les microorganismes sont inhibés par les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* et de *Pimenta racemosa* à des concentrations inférieures ou égales à 2% par contre ces microorganismes ne sont pas inhibés par l'huile essentielle de *Salvia officinalis* à la concentration de 2%.

En 2000, Dorman et Deans ont étudié l'activité de l'HE du poivre (*Piper nigrum*), du géranium (*Pelargonium graveolens*), d'origan (*Origanum vulgare*) et du thym (*Thymus vulgaris*) sur 25 genres différents de bactéries. Les huiles volatiles ont montré des effets inhibiteurs considérables contre tous les micro-organismes testés, alors que leurs constituants majeurs ont montré des degrés différents au niveau de la culture bactérienne. L'activité antimicrobienne des huiles volatiles est comparée à celle des antibiotiques sur des bactéries en culture. Les constituants à structure phénolique tels que le carvacrol, l'eugénol et le thymol, sont hautement actifs contre les microorganismes. Les phénols sont connus pour être des agents bactéricides ou bactériostatiques selon la concentration utilisée.

En utilisant la technique des disques, Miladinovic et *al.* (2001) ont mis en évidence le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Salvia officinalis*. Les résultats ont montré que les dilutions d'huile essentielle aux 1/50 et 1/100 sont très actives sur *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis* et *Aspergillus niger*. Cette activité a été attribuée à l' $\alpha$ -thujone et au camphre.

Daferea et *al.* (2002) ont évalué l'activité antimicrobienne de 8 essences aromatiques sur des souches phytopathogènes. Le développement de *Botrytis cinerea*, de *Fusarium solani* et *Clavibacter michiganensis* a été complètement inhibé par des concentrations d'huiles essentielles d'*Origanum vulgare*, de *Thymus capitatus*, d'*Origanum dictamnus* et d'*Origanum majorana*

comprises entre 85-300 µg/ml. Les huiles essentielles de *Lavandula augustifolia*, de *Rosmarinus officinalis*, de *Salvia fruticosa* et de *Mentha pulegium* présentent une faible activité. Il est à signaler que le pathogène bactérien de la tomate *Clavibacter michiganensis* est le plus sensible à l'action biologique des huiles essentielles par rapport aux autres microorganismes testés.

Ohno et al. (2003), ont trouvé que les huiles essentielles de la citronnelle et du citronnier, empêchent la croissance de *Helicobacter pylori* (même les souches résistantes) et réagissent même dans des conditions d'acidité. *In vivo*, les souris ont montré que les colonies sont réduites par l'administration orale de l'HE de la citronnelle.

L'huile essentielle de *Ferula gummosa* était active contre *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* et *E. faecalis* et moins active contre *P. aeruginosa* (Eftekhar et al., 2004). A des quantités de 5 g/disque, Hanbali et al. (2004), ont constaté que l'huile essentielle de *Pulicaria odora* a montré une zone d'inhibition chez toutes les bactéries, une forte activité est observée sur *Streptococcus sp*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas vulgaris*. Chaque fois, l'activité de l'huile essentielle de *Pulicaria odora* était plus grande que celle des antibiotiques standards.

Laouer (2004) a montré que l'huile essentielle d'*Ammoides pusilla* présente à l'inverse de l'huile de *Magydaris pastinacea* une activité antimicrobienne élevée autant par contact direct que par micro-atmosphère et elle est plus efficace sur les champignons que sur les bactéries, Parmi les bactéries testées, les bactéries à Gram + apparaissent plus sensibles que les bactéries à Gram -.

88.80% des bactéries à Gram positif et 93.30 % des levures testées par De Carvalho et Da Fonseca (2005), se sont montrées sensibles à l'huile essentielle de *Cordia verbenacea* mais 80% des bactéries à Gram négatif ont résisté, seulement trois souches de *Proteus mirabilis* et une souche de *Proteus vulgaris* ont été inhibées.

Bencheikh (2005) a montré que l'huile essentielle de *Foeniculum vulgare* est complètement inactive sur *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et sur douze souches de prélèvements divers. Tandis que celle de *Thymus fontanesii* possède un large spectre d'action sur les bactéries à Gram + et à Gram - ainsi que sur les champignons. En revanche, l'huile est inefficace sur *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après Mohammadi (2006) l'essence des feuilles de *Lavandula. stoechas* est un agent antibactérien efficace contre *Klebsiella pneumoneae*, *Proteus mirabilis* et *E. coli* ATCC25922. Tandis que, l'huile de *Cistus ladaniferus* s'est avérée efficace contre *Listeria monocytogenes*.

Il a été montré également que certaines huiles essentielles ne manifestent aucun pouvoir antimicrobien, citons celle de *Cupressus dupreziana*, testée par Ramdani et al. (2007) qui s'est

montrée complètement inactive contre trois souches bactériennes de référence; *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *P. aeruginosa* ATCC 27853. De même l'huile de *Marrubium deserti* étudiée par Benalia (2008) a été inactive vis-à-vis plusieurs bactéries et deux champignons.

El Kolli (2008) a testé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux *Anthemis* (*Anthemis punctata* et *Anthemis pedunculata*) par la méthode des disques sur trois souches bactériennes de références (ATCC). Ces huiles sont montrées actives sur *E. coli* ATCC 25922 et sur *S. aureus* ATCC 25923 avec une dilution de 1/2 (v/v). Cette activité est due selon le même auteur à la forte teneur de ces huiles en terpènes : les pinènes, le myrcène, le tricyclène, le farnesène, le cadinène, le limonène ...etc.

## **II-12-Techniques d'étude antimicrobienne des huiles essentielles**

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles peut être estimé par deux méthodes principales: technique de contact direct (en milieu solide ou en milieu liquide) et technique de micro-atmosphère.

### **II-12-1-Technique par contact direct**

Les techniques par contact direct consistent à mettre en contact l'huile essentielle et les micro-organismes, puis à observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé (milieu solide) ou dans un bouillon (milieu liquide).

#### **a- Méthode de diffusion sur gélose**

C'est une méthode ancienne mais toujours d'actualité. Elle permet l'estimation qualitative de l'effet de l'huile. Ce test est réalisé par dépôt de l'huile essentielle, à l'aide de disques de cellulose imprégnés d'une quantité connue de l'huile essentielle (aromatogramme) ou de puits creusés dans la gélose et remplis par l'huile essentielle. Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition obtenues sur géloseensemencée. Cette méthode sert en général à la présélection de l'activité antimicrobienne des HE car:

\* Le diamètre d'inhibition n'est pas une mesure directe de l'activité antimicrobienne des HE, les différents constituants ne diffusent pas tous de la même manière dans le milieu gélosé.

\* Le diamètre d'inhibition varie en fonction de la densité de l'inoculum et de l'épaisseur du milieu de culture. Il est donc nécessaire de standardiser ces conditions pour pouvoir comparer les résultats (Belaiche, 1979 ; Hulin et al, 1998).

## **b- Méthode de dilution**

Cette technique permet de donner au clinicien un chiffre correspondant à la dose minimale bactéricide de l'HE. Son principe consiste à faire agir en phase liquide des dilutions croissantes de l'huile, après adjonction d'un tensioactif sélectionné (Audhoui in Belaiche, 1979). A cause de la faible hydrosolubilité des huiles essentielles, les émulsifiants tels que, le Tween 80 (polysorbate 80), le Tween 20 (polyoxyéthylène 2-sorbitan monolaurate) et l'éthanol sont souvent utilisés pour augmenter la solubilité des composés hydrophobes dans les milieux solides ou liquides (Suppakul et *al.*, 2003). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est utilisé pour préparer des dilutions d'huiles essentielles (Sacchetti et *al.*, 2005). Il a été démontré qu'il ne possède pas d'activité antibactérienne, puis sélectionné comme un bon agent pour la dilution des huiles essentielles (Gachkar et *al.*, 2007). La bactéricidie est déterminée par l'absence de survivant par ensemencement calibré d'un milieu neuf après des temps de contact qui s'étalent de 10 minutes à 24 heures (Audhoui in Belaiche, 1979). La concentration minimale bactéricide correspond à la concentration en inhibiteur nécessaire pour que l'activité bactéricide soit totale sur un inoculum donné après un temps donné (Hulin et *al.*, 1998).

### **II-12-2-Technique des micro-atmosphères**

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné de l'huile essentielle au centre du couvercle d'une boîte de pétri, sans que l'huile essentielle entre en contact avec la gélose ensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée et placée couvercle en bas à l'étuve à 37°C (Bactéries).

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées, donc l'essence n'agit qu'à l'état des vapeurs qu'elle développe à 37°C. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum (Benjilali et *al.*, 1986).

Chaque essai est répété en double. Après l'incubation, la croissance est comparée à celle du témoin. La quantité minimale inhibitrice est définie comme la plus petite quantité pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit (De Billerbeck et *al.*, 2002).

Cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, elle montre seulement l'activité des constituants volatils à température d'incubation (Bouchikhi, 1994 in Hulin et *al.*, 1998).

## II-13-Mode d'action antibactérien des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large due principalement à leur grande affinité aux lipides membranaires grâce à leur nature hydrophobe (Dormans et Deans, 2000). Très peu d'études portant sur le mode d'action des huiles essentielles vis-à-vis des microorganismes ont été réalisées. En général les huiles essentielles empêchent la multiplication, la sporulation et la synthèse des toxines des bactéries. Sur les levures, elles agissent sur la biomasse et la production du pseudomycélium. Sur les moisissures, elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium et la toxicogénèse (Hulin et *al.*, 1998).

Kim et *al.* (1995) in Hulin et *al.* (1998) rapportent que les huiles essentielles semblent posséder plusieurs modes d'action sur les différents microorganismes. Ces modes d'action sont (Fig.9):

\*interférence avec la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, provoquant une augmentation de la perméabilité et la perte des constituants cellulaires.

\*altération des différents systèmes enzymatiques dont ceux impliqués dans la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.

\*destruction ou inactivation du matériel génétique.

Inouye et *al.* (1998) attribuent l'action des huiles essentielles à l'insertion sélective des constituants de ces derniers sur les lipides de la membrane cytoplasmique pour perturber sa fonction. Cette insertion conduit à la perte des électrolytes et la réduction du niveau des sucres et des acides aminés.

Rasooli et *al.* (2005) ont étudié l'effet de l'huile essentielle de *Thymus eriocalyx* sur *Aspergillus niger*. Les observations sous microscope électronique ont montré que le mycélium était détruit, la membrane plasmique était altérée, les mitochondries étaient détruites avec un manque de cytoplasme dans les cellules et un repliement de la membrane nucléaire, ces faits ont été expliqués, selon les auteurs, par l'interférence des composants de l'huile essentielle avec les enzymes responsables des réactions de synthèse de la membrane plasmique.

Chalchat et *al.* (1997) constatent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est hautement dépendante de leur composition chimique notamment de leurs constituants majeurs par l'étude du pouvoir antimicrobien de 13 huiles essentielles d'origine africaine. Les résultats de cette étude montrent qu'il y a une corrélation très étroite entre la composition chimique de ces huiles et leur activité vis-à-vis de 6 microorganismes testés (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,

*Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans*). Les huiles essentielles caractérisées par une faible activité contiennent une grande quantité de composés hydrocarbonés alors que les 3 huiles essentielles qui sont montrées actives sont riches en composés oxygénés.

L'effet des terpènes sur la membrane bactérienne est attribué à leurs propriétés lipophiles, à la force de leurs groupes fonctionnelles. Leur site d'action paraît sur la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique cellulaire. Cette altération de la membrane perturbe la régulation osmotique. L' $\alpha$ -pinène, le  $\beta$ -pinène et le limonène inhibent l'activité respiratoire chez le mitochondrie de la levure (Tepe et *al.*, 2005).

Sous l'action des monoterpènes testés par Pina-Vaz et *al.* (2004), les cellules ont montré une perte rapide de potassium, une lyse des sphéroblastes des levures avec une altération sévère de la membrane cellulaire et une solubilisation de la membrane observée par le microscope électronique. Un tel effet est en accord avec la nature biochimique des terpènes testés qui, probablement, agissent comme des solvants de la membrane cellulaire.

Les alcools sont réputés de posséder une activité bactéricide plus prononcée que celle bactériostatique sur les cellules végétatives. Les terpènes-alcools peuvent agir sur la dénaturation des protéines, comme un agent solvant ou comme des agents déshydratants. Lambert et *al.* (2001) in Burt et Reinders (2003), confirment que le carvacrol et le thymol, qui sont les constituants majeurs de l'huile essentielle d'origan, rendent la membrane cellulaire bactérienne perméable.

Les aldéhydes, notamment le formaldéhyde et le glutaraldéhyde, ont une activité forte sur les bactéries. Les aldéhydes conjugués à une double liaison carbonique forment un arrangement électronégatif très fort, ce qui peut expliquer leur activité. De tels composants électronégatifs interfèrent dans les processus biologiques impliquant le transfert des électrons et réagissent avec les composants nitrogenés tels que les protéines et les acides nucléiques donc l'inhibition de la croissance bactérienne (Dorman et Deans, 2000; Holley et Patel, 2005).

Hulin et *al.* (1998) ont établie une échelle pour l'efficacité des constituants des huiles essentielles: phénols>alcools>aldéhydes>cétones>éthers>hydrocarbones>esters.

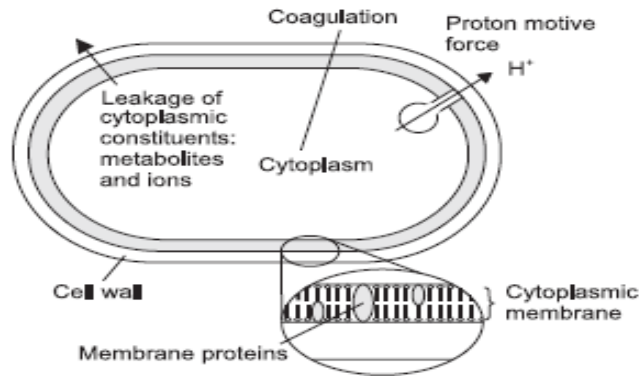


Fig. 9 : Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles (Burt, 2004)

## II-14-Activité antioxydante des huiles essentielles

### II-14-1- Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, donc très réactifs et, par conséquent, leur durée de vie est généralement très courte, de l'ordre de  $10^{-4}$  secondes, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron (André, 1998, Beckman ; Ames, 1998.).

L'oxygène ( $O_2$ ) est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ), puis en peroxyde d'hydrogène ( $H_2 O_2$ ). Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS) (Sies, 1993 ; De Leiris, 2003).

Cette appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive, elle inclut les espèces réactives de l'oxygène (ERO), proprement dit, mais aussi certains dérivés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le ( $H_2 O_2$ ), et les espèces réactives de l'azote (ERN) à savoir le peroxydinitrite ( $ONOO^{\circ-}$ ) (Pasquier, 1995 ; Fontaine et *al.*, 2002).

- **Source des radicaux libres**

La chaîne respiratoire est une source permanente de production des ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des anions superoxyde, de l'eau oxygénée et éventuellement des radicaux hydroxyles (Pincemail et *al.*, 2002 ; Favier, 2003 ; De Moffarts et *al.*, 2005).

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules phagocytaires. L'activation de ces cellules immunitaires par des stimuli exogène ou endogène s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène avec activation d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase qui catalyse la réduction de cet oxygène en anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ). Ce dernier donne le ( $H_2O_2$ ) par dismutation. Le  $O_2^{\circ-}$  et  $H_2O_2$  participent à la libération d'hypochlorite sous l'influence d'une enzyme leucocytaire, la myéloperoxydase (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2002 ; De Moffarts *et al.*, 2005).

A coté de ces sources majeurs des ROS, il existe des sources cytosoliques, essentiellement le peroxydosome qui constitue une source importante de la production cellulaire de  $H_2O_2$  (Sevanian *et al.*, 1990; Valko *et al.*, 2007), la xanthine oxydase qui produit de l' $O_2^{\circ-}$  et  $H_2O_2$  (Groussard, 2006), les enzymes de réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques) (Massion *et al.*, 2002).

A cela, s'ajoute d'autres facteurs qui peuvent contribuer dans la formation des radicaux libres dont les rayonnements UV capables de générer des anions superoxyde ou de l'oxygène singulet, les rayons X ou  $\gamma$  sont aussi capables de couper la molécule d'eau en deux radicaux par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants (Tamer, 2003) les poussières d'amiante et de silice sont des sources des ROS (Favier, 2003 ; Wang *et al.*, 2008). Les fumées de combustion (de cigarettes, de bois, etc.), la consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter (Pincemail *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2006 ; Pincemail et Defraigne, 2004). Des infections bactériennes ou virales provoquent, elles aussi selon Arousseau (2002), des phénomènes radicalaires à caractère exponentiel après augmentation de la population des macrophages impliqués dans leur élimination.

## **II-14-2- Stress oxydant et atteintes pathologiques**

Les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries (Pincemail et Defraigne, 2004). Cependant la notion de « radicaux libres » et de « stress oxydant » est de plus en plus utilisée pour expliquer les différentes atteintes pathologiques, soit comme un facteur déclenchant, soit comme des causes de complication dans leur évolution (Halliwell et Whiteman, 2004 ; Huang *et al.*, 2004).

Le stress oxydatif, principale cause initiale de plusieurs maladies: cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré,



le diabète, et les rhumatismes (Favier, 2003), maladie de Parkinson, les inflammations gastro-intestinales et l'ulcère les œdèmes et vieillissement prématuré de la peau (Georgetti et *al.*, 2003 ; Atawodi, 2005).

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiées de l'attaque par le radical  $\text{OH}^\circ$  (Fig.10), réaction appelée la peroxydation lipidique (Lee et *al.*, 2006 ; Ré et *al.*, 2005). Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de LDL oxydées qui, captés par des macrophages, forment le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires ; l'attaque des phospholipides membranaires modifient la fluidité la perméabilité de la membrane, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, et altérant de ce fait le dysfonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les ROS peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes (Fig.10). Certains affectent les bases, d'autres induisant des cassures dans les brins (Ré et *al.*, 2005). Ils conduisent à la dénaturation oxydante des acides aminés et par conséquent modifient les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines (Pincemail et *al.*, 1999).

Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques (Fig.10), en libérant des cétoaldehydes,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OH}^\circ$ , qui entraînent la coupure de protéines et leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

Le stress oxydant serait également impliqué dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres. Enfin, les radicaux libres semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer (Desport et Couratier, 2002 ).

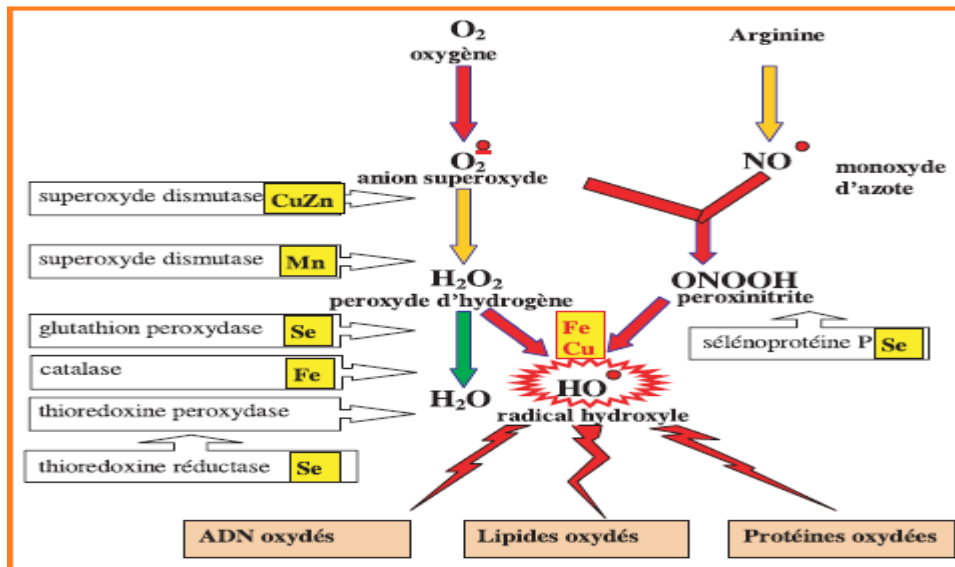


Fig. 10: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défense qualifié d'antioxydants. De plus, de nombreuses molécules d'origine naturelle (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles,...) ou issues de synthèses organiques (Trolox, BHA, BHT,...) sont étudiées pour leur propriétés antioxydantes et leur contribution dans la lutte contre les espèces oxydantes de l'organisme (Benalia, 2008).

### II-14-3- Les moyens de protection (les antioxydants)

Un antioxydant est toute substance capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation des substrats biologiques (Al-Mamary et al., 2002 ; Boyd et al., 2003 ; Karou et al., 2005). Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant, 2004). Ces antioxydants ont deux origines, l'une apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, tandis que l'autre est endogène représentée par des enzymes, tels que les superoxydases dismutases (SOD) et la catalase (rôle de protection), les glutathion peroxydases (GSH- $P_x$ ) (rôle de détoxication) ou des protéines (ferritine, transferrine, albumine) (Curtay et Robin, 2000). Pincemail et Defraigne (2004) ajoutent aussi quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs importants pour l'activité de certains enzymes antioxydants.

D'après Halliwell (1994), les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre : (i) le piégeage direct des ROS ; (ii) l'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS ; (iii) la protection des systèmes de défense antioxydants.

Dans le système alimentaire, Marc et *al* (2004) signale que la maîtrise de l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité, en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire. Pour un certain nombre d'aliments, notamment pour les aliments déshydratés et ceux à teneur moyenne en eau, il est nécessaire de recourir à des substances ou à des méthodes permettant de retarder l'oxydation des lipides au delà du délai normal de consommation de vente. D'après Cheftel et Cheftel (1984) et Rolland (2004) ces substances et ces méthodes peuvent être classés en 3 catégories:

- les antioxydants qui agissent en diminuant le nombre de radicaux libres, ils sont capables d'interrompre la chaîne radicalaire en cédant un radical hydrogène (H) à un radical libre lipidique. C'est le cas par exemple du BHA (butylhydroxyanisole), BHT (butylhydroxytoluène), PG (gallate de propyle). Ces antioxydants sont appelés primaires, radicalaires ou vrais.
- Les antioxydants qui agissent en empêchant ou en diminuant la formation des radicaux libres. Ce sont des agents complexant les métaux promoteurs d'oxydation comme l'EDTA (l'éthylène diamine tétraacétate), l'acide citrique, des substances décomposant les hydroperoxydes en composés non radicalaires comme les amines tertiaires et les acides forts ; des protecteurs vis-à-vis des UV comme les carotènes ou enfin des séquestrants d'oxygène comme l'acide ascorbique. Ces antioxydants sont dits secondaires ou préventifs.
- Cette catégorie regroupe tous les procédés et les méthodes de protection contre l'oxydation comme : emballage imperméable, conditionnement sous vide, etc.

*PARTIE EXPERIMENTALE*

*CHAPITRE III*

*MATERIELS ET METHODES*

### **III-1-Matériel**

#### **III-1-1-Matériel végétal**

*Athamanta sicula* est récoltée au niveau des rochers calcaires de la montagne Gouraya, Béjaïa en mai 2008 à une altitude de 609m (36°46'14.02''N; 5°04'57.16'' E) pendant la période de floraison puis elle est débarrassée des impuretés, ensuite séchée à l'ombre à une température ambiante. Enfin, elle est coupée en parties très fines (2-5 mm).

La partie aérienne de *Filipendula hexapetala* est recueillie dans une prairie à Djebel Megress, Sétif en mai 2008, à une altitude de 1547 m (36° 20' 06.95'' N ; 5° 20' 26.04'' E) ; puis elle est traitée de la même manière que la précédente plante.

#### **III-1-2- Matériels du test de l'activité antimicrobienne**

##### **III-1-2-1- Souches microbiennes**

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Athamanta sicula* a été évaluée sur plusieurs souches bactériennes qui proviennent de l'American Type Culture Collection ATCC: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ainsi que sur d'autres souches microbiennes isolées des prélèvements humains et identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie du centre hospitalo-universitaire de Sétif. Ces souches sont : *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* et *Streptococcus agalactiae*. Alors que l'huile de *Filipendula hexapetala* a été testée sur les trois souches de références ainsi que sur deux souches isolées de prélèvements humains identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie du centre hospitalo-universitaire de Sétif: *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus avium*. Enfin, deux champignons *Aspergillus niger* IP (institut Pasteur) 1431.83 et *Candida albicans* ont fait également l'objet de la présente étude.

##### **III-1-2-2- Les milieux de culture**

La culture des bactéries a nécessité l'utilisation des milieux suivants : la gélose Mueller Hinton (MH), les bouillons nutritifs et la gélose au sang. Pour la culture d'*A. niger*, le milieu utilisé est l'extrait de malt gélosé. Le milieu Sabouraud a été utilisé pour la culture de *C. albicans*. La composition chimique de ces différents milieux de culture se trouve en annexe II.

##### **III-1-2-3- Les antibiotiques**

Les antibiotiques utilisés dans ce test sont : Ampicilline (AM), Imipeneme (IPM), Cefazoline (CZ), Amikacine (AN), Gentamicine (GM), Chloramphenicol (C), Colistine (Cs), Ciprofloxacine (CIP), Fosfomycine (Fos), Benzylpenicilline (P), Oxacilline (OX), Cefoxitine FOX, Kanamycine

(K), Tetracycline (TE), Erythromycine (E), Clindamycine (Clin), Rifampicine (RA), Vancomycine (VA), Ticarcilline (TIC), Ceftazidime (CAZ), Tobramycine (TOB), Amoxicilline (AMX), Amoxicilline + Ac. Clavulanique (AMC), Cefotaxime (CTX), Trimetropime + sulfamides (SXT), Levofloxacin (Lev), Streptomycine (S), Furanes (FT), Teicoplanine (TEC), Céfalocone CF, Pristinamycine (PT), Aztréonam (ATM), Ceftriaxone (CRO), piperacilline (PIP).

Il est à signaler que tous ces antibiotiques proviennent de deux fabricants Bio Rad et Oxoid. La charge de chaque disque est mentionnée dans l'annexe III

Le disque d'antifongique utilisé comme témoin positif est l'itraconazole (Itra) provenant de Sanofi Diagnostics Pasteur.

### **III-2- Méthodes expérimentales**

#### **III-2-1- Extraction des huiles essentielles**

Le matériel végétal séché est soumis à une hydrodistillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger (Fig. 11). Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire 100 g de masse végétale séchée dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile et enfin conservée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5 C°). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition.

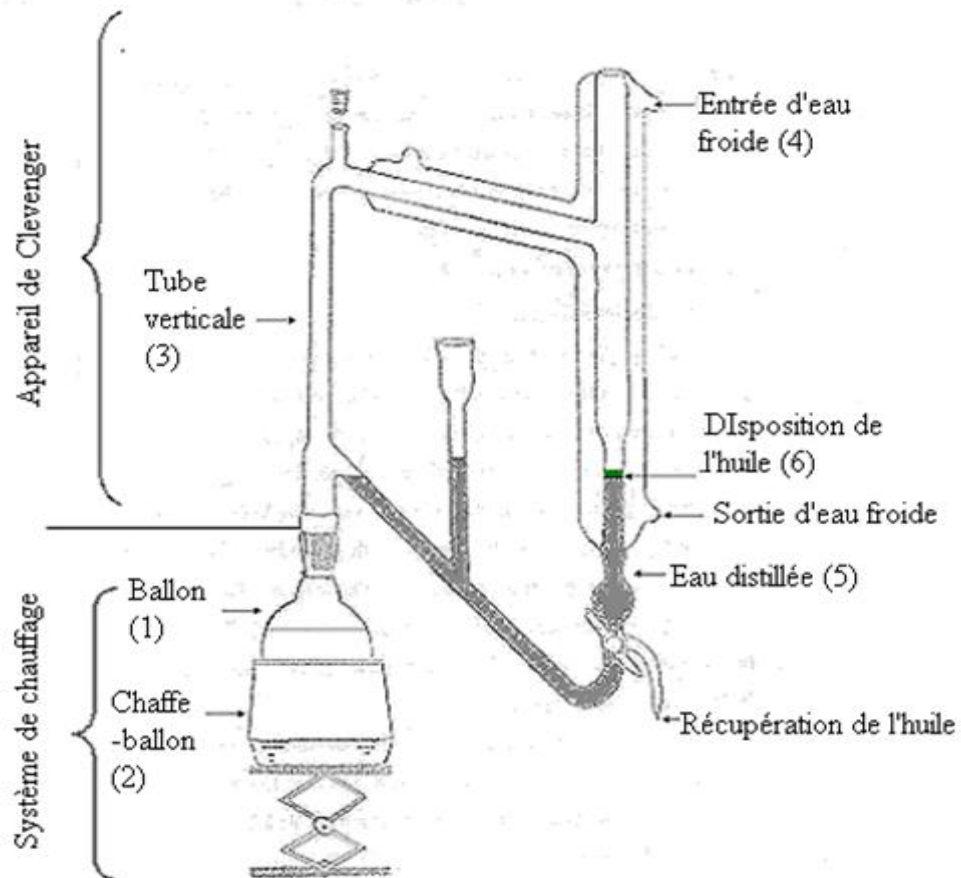


Fig. 11 : Dispositif d'extraction Clevenger

### **III-2-2- Analyse des huiles essentielles**

La séparation et l'identification des constituants des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) à colonne apolaire. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un gaz chromatographe Agilent (modèle 6890N) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) couplé à un détecteur sélectif de masse quadripolaire Agilent (modèle 5973 Network) qui fonctionne en mode impact d'électron (EI) à 70 eV.

Le gaz chromatographe est équipé de deux colonnes capillaires de silice fondue HP-1(PDMS, de 50 mètres de longueur par 0.2 mm de diamètre et d'une épaisseur de 0.33µm). Les paramètres d'analyse (identiques pour GC et GC/MS) sont les suivants : le gaz vecteur est l'hélium avec un flux de 1ml/min (la pression pour les deux colonnes est de 25 psi) ; la température du four a été programmée de 60 à 250C° à 2C°/min et maintenue fixe pendant 40 minutes. La température de l'injecteur (mode split, ratio 1/100) est de 250C°. La température du détecteur à ionisation de flamme (FID) a été fixée à 250C° et, dans l'analyseur GC/MS, les températures de la source d'ion et de ligne de transfert sont de 170C° et 280C° respectivement.

Les constituants de l'huile essentielle sont identifiés par comparaison de leurs spectres de masse et leurs indices de rétention (RI) avec ceux de substances pures enregistrées dans la littérature ou avec ceux de la base de données élaborée à partir de substances authentiques par le laboratoire de chimie de l'université de Nice où les analyses ont été réalisées.

### **III-2-3- Etude de l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*A. sicula* et *F. hexapetala* est réalisée par la technique du contact direct.

#### **III-2-3-1- Technique par contact direct**

La méthode de diffusion en milieu gélosé ainsi appelée permet de prévoir avec certitude l'efficacité *in vitro* de l'huile essentielle, il s'agit en fait d'une appréciation qualitative de l'activité. L'aspect quantitatif sera ensuite estimé par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette étape n'a pas été réalisée car les huiles étaient inactives vis-à-vis des souches testées.

##### **III-2-3-1-a- Méthode de diffusion**

L'étude est réalisée par la méthode de diffusion, qui est initialement conçue pour les antibiotiques (antibiogramme), mais en substituant les disques d'antibiotiques par d'autres imprégnés par de l'huile essentielle (aromatogramme). Inspiré d'une vieille méthode de Shroeder et



Messing datant de 1949, l'aromatogramme consiste à déposer des disques de papiers filtres imprégnés d'huiles essentielles sur la surface des géloses ensemencées par le germe à tester et de mesurer les diamètres d'inhibition en millimètre (mm) après incubation.

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (Duraffourd et *al.*, 1990).

- préparation de l'inoculum

En premier lieu (Fig. 12), une suspension bactérienne d'une opacité de 0.5 Mc Farland est préparée à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Cette opacité, équivalente à une densité optique de 0.08 – 0.1 à 625 nm, peut être diminuée (ou augmentée) en ajoutant plus de culture afin d'ajuster la densité optique (DO).

Il est à signaler d'une part que la suspension ajustée devra contenir  $10^8$  UFC /ml (units forming colony /ml) et d'autre part que l'inoculum ainsi préparé ne doit pas être utilisé au delà de 15 minutes faute de quoi la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne.

- Cet inoculum sert à ensemencer des géloses de Mueller Hinton coulées dans des boites de Pétri sur une épaisseur de 4 mm (qui correspond à 20 ml pour les boites de 90 mm de diamètre) puis séchées à l'étuve à 37°C avant emploi.

L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de l'inoculum fraîchement préparé. Il consiste à tremper un écouvillon de coton stérile dans la suspension puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, à trois reprises sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées, en tournant la boite à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Pour chaque souche testée, 8 boites de Pétri, (2 boites pour chaque dilution plus 2 boites pour les témoins positif et négatif), sont écouvillonnées par le même écouvillon à la condition d'être recharger pour chacun d'elles.

Des disques de papiers chromatographiques de 6 mm de diamètre , préalablement stérilisés sont déposés à la surface de gélose ensemencée après avoir été chargé de 5 µl d'huile essentielle diluée dans du DMSO (dimethylsulfoxide) à 1/2, 1/5 et 1/10 (v/v). D'autres disques, chargés de 5 µl de DMSO sont utilisés comme témoins. Des antibiogrammes sont effectués en parallèle avec les aromatogrammes. Le choix des antibiotiques pour chaque souche microbienne est basé sur les directives du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Afin de garantir des

conditions expérimentales comparables, chaque trois dépôt d'huile essentielle de concentration similaire ont été placés dans la même boîte, le test est répété deux fois pour avoir des résultats fiables. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré (Fig. 12).

Pour savoir si l'effet des huiles est bactéricide ou bactériostatique, un prélèvement à partir de la zone d'inhibition est transféré dans un tube contenant du bouillon nutritif. Ce dernier est incubé dans une étuve à 37°C pendant 24 h puis examiné à l'œil nu. Un milieu trouble indique un effet bactériostatique, tandis qu'un milieu clair indique un effet bactéricide de l'huile testée (Fig. 12).

En ce qui concerne les champignons, des suspensions de cellules fongiques (*C. albicans*) et de spores (*A. niger*) sont préparées à partir de cultures pures et jeunes, dans de l'eau physiologique stérile. Ces suspensions servent à ensemercer la gélose Sabouraud (levure) et l'extrait de malt agarisé (moisissure). Des disques de papiers chromatographiques de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés sont déposés à la surface de géloseensemencée après avoir été chargé de 5 µl d'huile essentielle diluée dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à 1/2, 1/5 et 1/10 (v/v). D'autres disques, chargés de 5 µl de DMSO sont utilisés comme témoins. Des disques d'antifongiques ont été également utilisés dans ce test comme témoins positifs. L'incubation des champignons se fait à une température de 30°C pendant 72 heures alors que celle des levures se fait à 37°C pendant 48 heures.

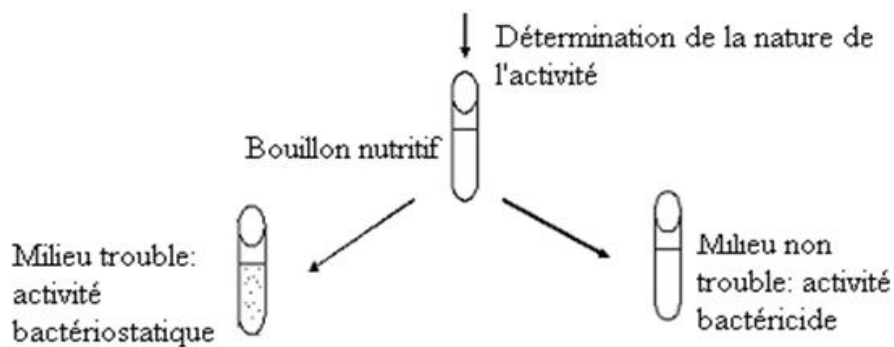
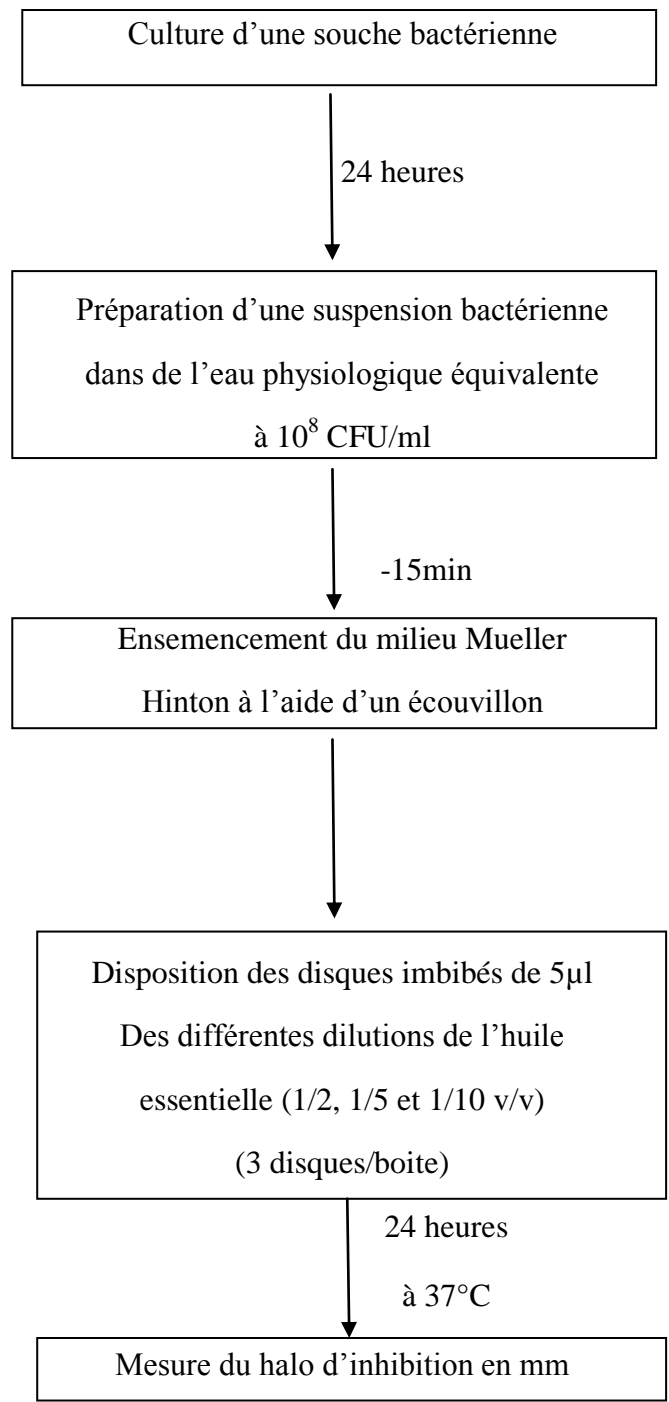


Fig. 12 : Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne

### III-3- Test de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer les activités antioxydantes des extraits volatils des plantes aromatique. L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle d'*Athamanta sicula* a été évaluée par la capacité de balayage du radical libre DPPH.

Cette méthode décrite pour la première fois par Blois (1958) et modifiée par la suite par Brand Williams et *al.* (1995), Masuda et *al.* (1999) et Molyneux (2004) consiste à suivre la réduction du radical libre DPPH (2,2- diphenyl -1- picrylhydrazyl) par un antioxydant à l'aide de spectrophotométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par la présence de l'huile essentielle.

Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Fig.13) Cette décoloration est représentative de la capacité des composés de l'huile essentielle à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique. Ce test nous permet donc d'obtenir des informations sur le pouvoir antiradicalaire direct de notre HE.

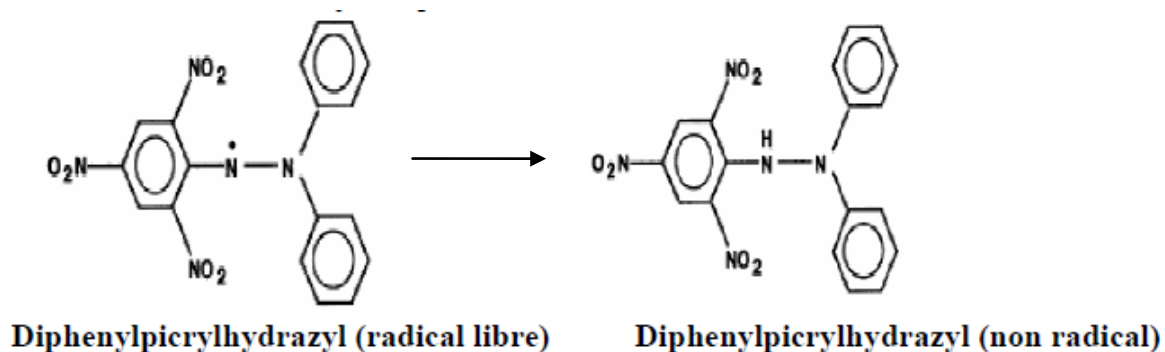


Fig. 13 : Forme libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet scavenger de l'huile essentielle d'*Athamanta sicula* contre le radical DPPH est celle de Masuda et *al.* (1999). 2.45ml de l'huile essentielle (différentes dilutions) est additionné à 50µl d'une solution de DPPH (5mM) préparé dans le méthanol. Le mélange réactionnel a été secoué immédiatement, puis maintenu à l'obscurité pendant 30min à une température de 37°C pour que la réaction s'accomplisse. L'absorbance du milieu réactionnel a été mesuré à 517 nm contre un blanc. Le contrôle est constitué d'un mélange réactionnel contenant 50µl de DPPH et 2.45ml de méthanol.

Egalement, le même test a été réalisé mais cette fois ci avec un antioxydant de référence le thymol. Tous les tests sont réalisés en triplet.

Les mesures de l'absorbance du DPPH des différentes substances antioxydantes (HE et thymol) permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition PI en appliquant la formule suivante :

$$\text{PI (\%)} = [A_0 - (A_i - A_b) / A_0] \times 100$$

Où :  $A_0$ : absorbance du radical seul (contrôle).

$A_i$  : absorbance du radical après 30 minutes de contact à l'obscurité avec l'antioxydant.

$A_b$  : absorbance de l'huile essentielle seul (blanc).

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés, nous permettent de calculer la valeur du paramètre  $IC_{50}$  (concentration d'inhibiteur) qui représente la concentration de la substance nécessaire pour diminuer 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel.

*CHAPITRE IV*  
*RESULTATS*  
*ET DISCUSSION*

#### IV-1- Extraction des huiles essentielles

La première quantification à faire est celle du rendement en huile essentielle obtenue par la technique d'hydrodistillation. Ce rendement est calculé à partir du poids de l'huile essentielle par rapport au poids sec de la masse végétale utilisée dans l'hydrodistillation, soit :

$$\text{Rdt} = \text{Mhe}/\text{Mvg} \times 100$$

Où : Rdt : rendement en HE (en%)

Mhe : masse de l'huile essentielle

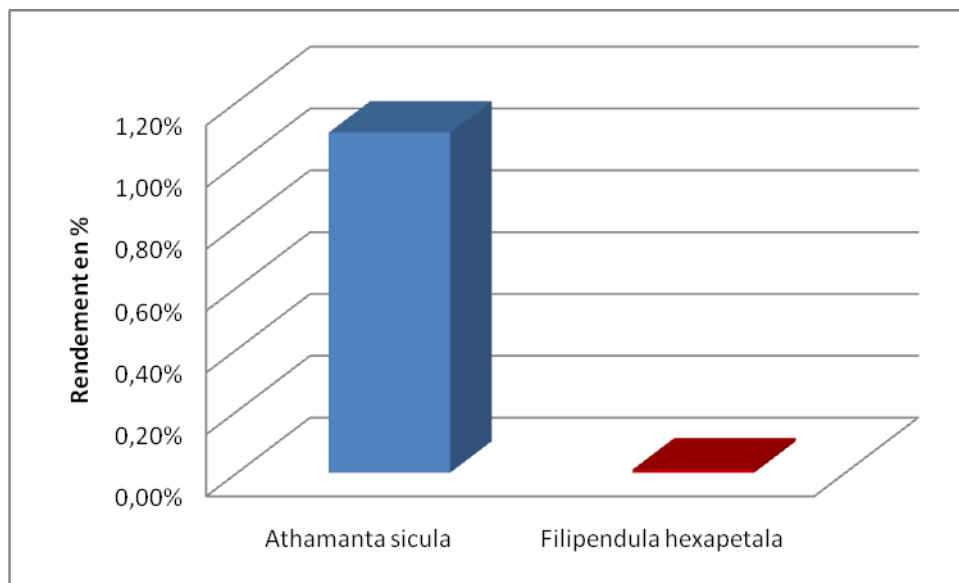
Mvg : masse végétale sec

Le rendement en huile essentielle de la partie aérienne d'*Athamanta sicula* est de l'ordre de 1.1% (w/w) (Fig. 14), de couleur jaune clair et d'une odeur aromatique. Ce rendement peut être considéré comme le plus faible comparativement à ceux obtenus par hydrodistillation à partir des fruits d'*A. turbith* ssp. *Hungarica* et d'*A. turbith* ssp. *Haynaldii* qui est de 7.1% et 7.7% (v/w) respectivement (Tomic et al, 2008). Il est cependant supérieur au rendement des fruits et des feuilles d'*A. sicula* obtenu par Camarda et al (2003) qui est de 0.37% (w/w) et 0.28% (w/w) respectivement. De même Petrovic et al. (2009) ont évalué les valeurs du rendement des rhizomes d'*A. turbith* ssp. *Hungarica* et d'*A. turbith* ssp. *Haynaldii* à 0.59% et 0.28% respectivement.

Par rapport aux autres espèces de la même famille étudiées dans notre laboratoire, notre rendement est considéré comme faible comparé à celui obtenu par Bencheikh (2004) qui est de l'ordre de 2.28% pour *Foeniculum vulgare*, mais très proche de celui obtenu par Dahia (2009) qui a été estimé à 1.21%, 1.1% et 1.08% pour *Pituranthos scoparius*, *P. chloranthus* et *P. reboudii* respectivement. Il est par contre supérieur au rendement de *Daucus crinitus* qui est selon Elkolli (2008) de 0.3%. Il est à signaler que l'ensemble de ces huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation dans un Clevenger pendant 3 heures.

La partie aérienne de *Filipendula hexapetala* a donné un rendement en huile essentielle de 0.01% (w/w) (Fig.14), cette valeur est inférieure comparée à celle obtenue par Radulović et al. (2007) à partir des feuilles de *Filipendula vulgaris* qui a été évaluée à 0.05%. Elle est aussi inférieure au rendement obtenu par Pavlovic et al. (2007) à partir de la partie aérienne de la même espèce originaire de la Serbie qui est de 0.1%. De même Papp et al. (2008) ont évalué les valeurs du rendement des racines, des feuilles et des fleurs de *F. ulmaria* à 1.33%, 0.92% et 1.2% (w/w) respectivement. Tandis que l'huile de *F. herba* a donné un rendement de 1.13%. Mais selon les mêmes auteurs, la plus grande valeur est celle obtenue à partir des fleurs de *F. flos* qui est de 2.51%.

En ce qui concerne la couleur, l'huile de *F. hexapetala* est d'une couleur jaune et d'une odeur caractéristique piquante, des caractères similaires ont été rapportés pour l'huile de la même espèce par Pavlovic et al. (2007) et Radulović et al. (2007).



**Fig.14 : Rendement en huile essentielle obtenu par hydrodistillation**

Ces différences sont dues à plusieurs facteurs : l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques (la température et l'humidité), l'espèce végétal elle-même, l'organe végétal, le stade de la croissance, la période de cueillette, la conservation du matériel végétal et la méthode d'extraction. (Granger et al, 1973 ; Rosua et Granados, 1987 ; Fournier et al., 1989 ; Haeckel et Omar, 1993 ; khajeh et al., 2004 et 2005 ; Viljoen et al.,2006 ; Sefidkon et al.,2007)

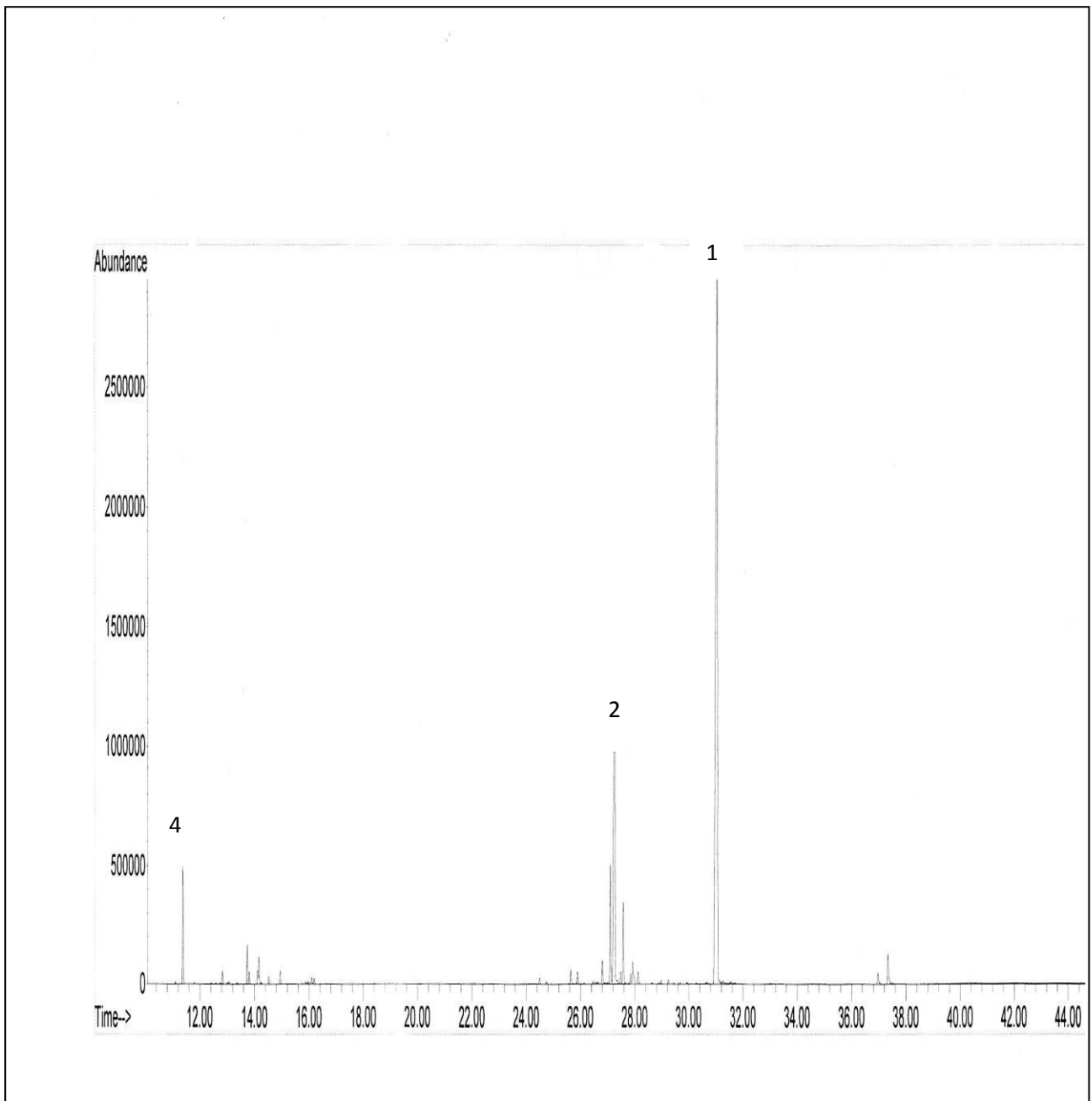
La lumière stimule aussi la production des huiles essentielles. Des études sur *Mentha piperita* L. ont montré que l'obscurité à diminuer le rendement en huiles volatiles de 1.43 % à 1.09 %. De même, le pourcentage du menthol dans l'huile essentielle est diminué de 61.8 % à 57.5 %. L'irrigation a un effet positif sur la croissance végétative. Il est démontré que l'insuffisance ou l'excès d'eau a un effet négatif sur le rendement en huiles essentielles. Le pourcentage de l'huile volatile est passé de 1.4 % (pendant la période des jours longs) à 0.7 % (pendant la période des jours courts) (El-Zakhem, 2003).

La teneur en huiles essentielles dépend aussi du moment de la récolte. Les sommités fleuries et les feuilles doivent être récoltées avant la floraison, car selon Salle et Pelletier (1991), après la floraison, 70% des huiles essentielles s'évaporent dans l'air. Par contre, la plante entière est généralement récoltée pendant la floraison (Flück, 1942).



#### **IV-2- Analyse chimique des huiles essentielles**

L'huile d'*Athamanta sicula* analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) (Fig. 15) nous a permis d'isoler et d'identifier 25 composés (Tableau 1) représentant 95.8% de l'huile essentielle (Fig. 16) avec comme constituant majoritaire un dérivé du phenylpropane, l'apiole (56.8%). L'huile essentielle est caractérisée par une importante fraction des dérivés du phenylpropane (61.4%) représentée par l'apiole (56.8%), le myristicine (3.8%) et l'élémicine (0.8%). La fraction hydrocarbonée constitue (30.5%) dont 10.7% sont des hydrocarbures monoterpéniques (11 monoterpènes) et 19.8% sont des hydrocarbures sesquiterpéniques (8 sesquiterpènes). Il est à signaler également l'absence totale de fraction oxygénée (pour les mono et les sesquiterpènes).



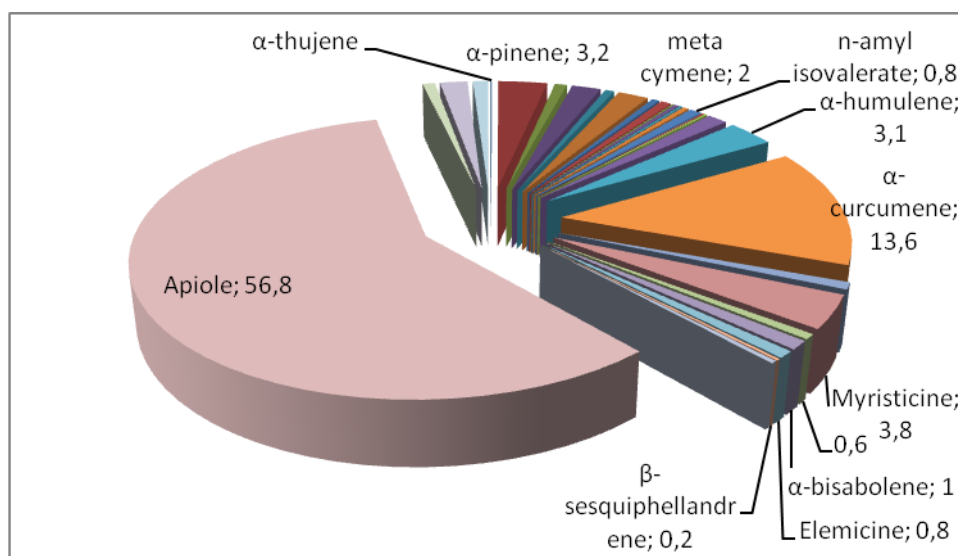
**Fig. 15 : Profil chromatographique de l'huile essentielle d'*Athamanta sicula***

**Tableau 1. Composition chimique de l'huile essentielle d'*A. sicula***

Pic	Composés	RT	%
1	$\alpha$ -thujene	11.11	0,1
2	<b><math>\alpha</math>-pinene</b>	<b>11.37</b>	<b>3,2</b>
3	Camphene	11.80	0,8
4	sabinene	12.42	1,9
5	$\alpha$ -terpinene	13.73	0,6
6	meta cymene	13.80	2,0
7	Limonene	14.11	0,5
8	cis $\beta$ -ocimene	14.16	0,7
9	isovalerate de butyle	14.25	0,1
10	trans $\beta$ -ocimene	14.52	0,3
11	$\delta$ - terpinene	14.95	0,2
12	Terpinolene	15.88	0,4
13	n-amyl isovalerate	16.19	0,8
14	Copaene	24.40	0,1
15	cis caryophyllene	25.64	0,2
16	$\alpha$ -bergamotene	25.89	1,3
17	$\alpha$ -humulene	26.48	3,1
18	<b><math>\alpha</math>-curcumene</b>	<b>26.80</b>	<b>13,6</b>
19	NI	27.10	0,8
20	<b>Myristicine</b>	<b>27.25</b>	<b>3,8</b>
21	NI	27.47	0,6
22	$\alpha$ -bisabolene	27.58	1,0
23	Elemicine	27.84	0,8
24	$\beta$ -sesquiphellandrene	27.93	0,2
25	trans $\delta$ -bisabolene	28.13	0,3
26	<b>Apiole</b>	<b>31.04</b>	<b>56,8</b>
27	NI	36.98	0,8
28	1 phenyl 3 (2 cyclohexan-1-one)	37.34	1,8
29	NI	39.41	1,0

NI: constituant non identifiés

RT : temps de rétention

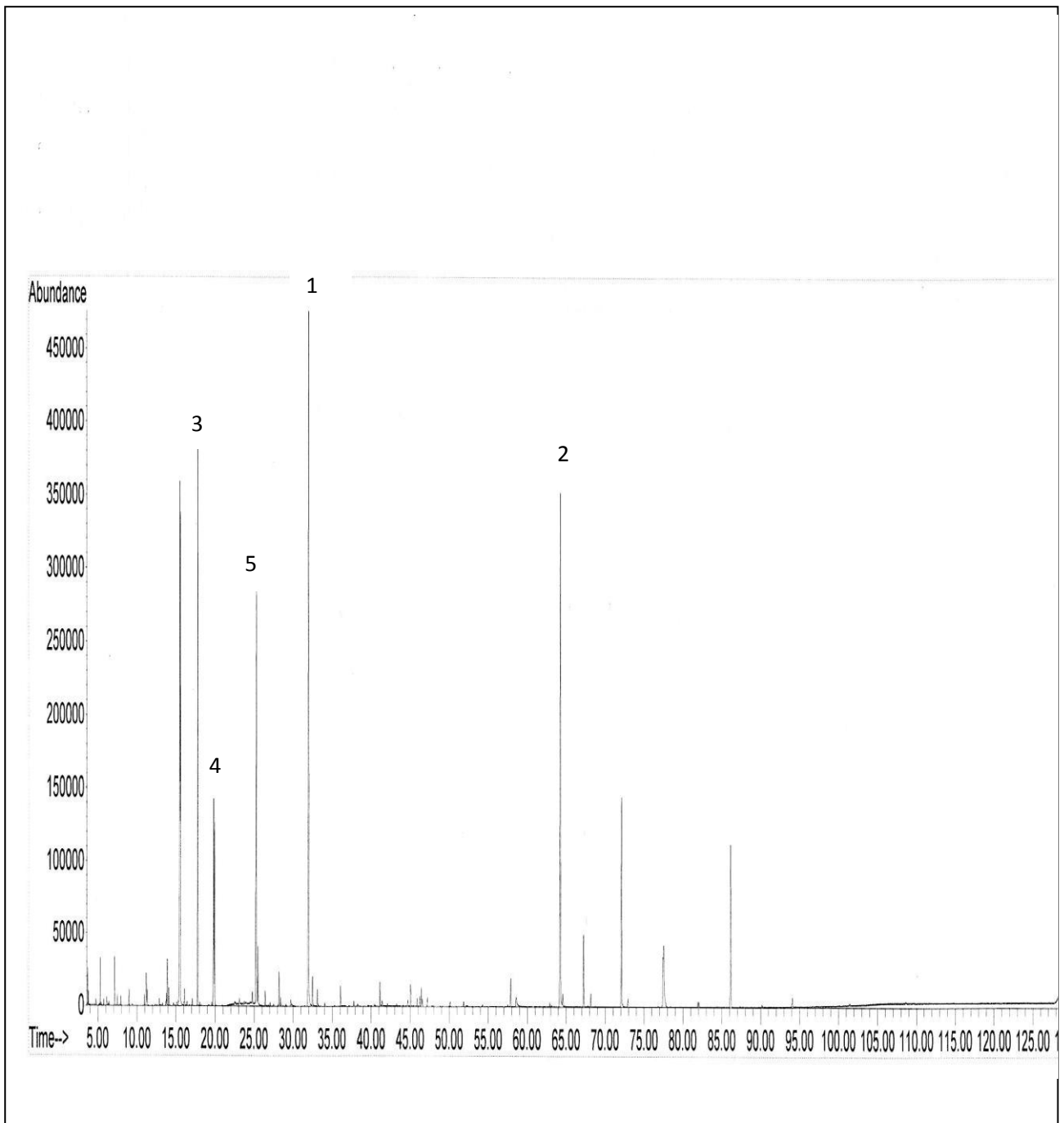


**Fig. 16: Pourcentage de différents composants de l'huile essentielle d'*A. sicula*.**

Les résultats de l'analyse chimique montrent que l'huile essentielle d'*A. sicula* contient de l'apiole (56.8%) comme constituant majoritaire, ce résultat est en accord avec celui trouvé par Camarda et al (2008) pour les fleurs, les racines et les feuilles de la même espèce originaire de Palerme qui contiennent de l'apiole à 87.8, 85.2 et 80.41% respectivement, par contre, en 2003 ces mêmes auteurs ont constaté que le composant majoritaire de l'huile essentielle des feuilles et des fruits d'*A. sicula* originaire du centre de la Sicile est le myristicine à 97.6 et 41.3 % respectivement. Tomic et al. (2008) ont prouvé la présence du myristicine comme composant principal à des pourcentages de 58.6 et 75.9% dans l'huile essentielle des fruits d'*A. turbith* ssp. *hungarica* et d'*A. turbith* ssp. *Haynaldii*. De même, l'analyse de l'huile des rhizomes d'*A. turbith* ssp. *hungarica* et d'*A. turbith* ssp. *Haynaldii* a révélée la présence du myristicine à 54.2% et 22.3% respectivement (Petrovic et al., 2009) alors que ce constituant se trouve en faible quantité (3.8%) dans l'huile de *Tinguarra sicula* étudiée. Zivanovic et al. (1994) ont montré que l'huile des fruits et des fleurs d'*A. haynaldii* contiennent une quantité appréciable de myristicine (39%) mais ses fruits mûrs contiennent du  $\beta$ -pinène comme constituant majeur, le  $\beta$ -pinène est complètement absent dans l'huile de *Tinguarra sicula*. Cependant l'étude de Verykokidou et al. (1995) de la composition chimique de l'huile d'*A. macedonica* ssp. *macedonica* a prouvé la présence du constituant majoritaire : le sabinène à 50.47%, ce composant se trouve dans l'huile de *T. sicula* à un pourcentage de 1.9%. Mais selon Baser et al. (1997) les constituants les plus abondants obtenus à partir de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*A. macrophylla* sont : le *p*-cymene, le thymol, et le carvacrol, l'huile de *T. sicula* est dépourvue de ces derniers constituants à l'exception du *p*-cymene qui se trouve en faible quantité 2%.

Outre les espèces du genre *Athamanta*, l'apiole est signalé comme étant le constituant majoritaire dans d'autres genres de la même famille. Ainsi ce constituant est présent dans l'HE des fruits de *Petroselinum crispum* avec un taux de 60-80% (Bruneton, 1999) et à un degrés moindre dans l'huile essentielle des feuilles de *Carum roxburghianum* avec un pourcentage de l'ordre de 20.8% (Chowadhury et al., 2009). De même Javidnia et al. (2005) ont indiqué la présence de 57.3% de dill apiole dans l'huile essentielle de *Ferula persica*.

Un total de 33 constituants (Tableau 2) représentant 87.7% (Fig. 18) ont été identifiés dans l'huile essentielle de *Filipendula hexapetala* par GC/SM (Fig. 17). Les constituants majoritaires sont: thymol (17.5%), benzyle salicylate (13.9%), aldéhyde salicylique (10.3%),  $\delta$ - terpinène (10.0%) et méthyle salicylate (8.9%).



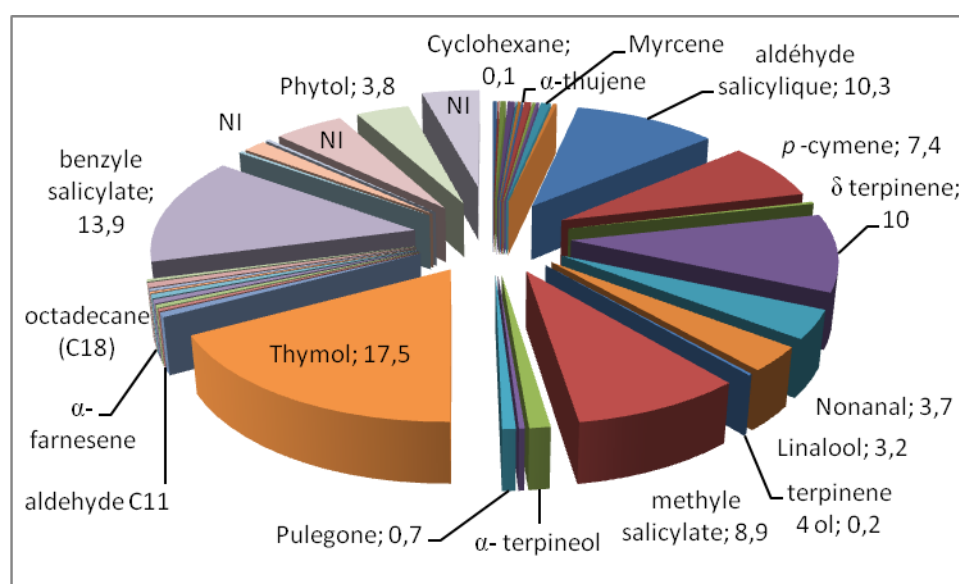
**Fig. 17 :** Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Filipendula hexapetala*

**Tableau 2 : Composition chimique de l'huile essentielle de *F. hexapetala***

pic	Composés	RT	%
1	Benzene	3.70	0.3
2	Cyclohexane	3.81	0.1
3	Toluene	5.31	0.4
4	2-hexenal	7.12	0.5
5	cis-3-hexenol	7.49	0.1
6	Heptanal	8.98	0.2
7	$\alpha$ -thujene	10.96	0.1
8	Benzaldehyde	11.19	0.5
9	$\alpha$ -pinene	11.31	0.2
10	aldehyde C8	13.79	0.2
11	Myrcene	13.92	0.7
12	benzyl chloride	14.10	0.3
<b>13</b>	<b>aldéhyde salicylique</b>	<b>15.49</b>	<b>10.3</b>
14	<i>p</i> -cymène	15.56	7.4
15	Limonene	16.09	0.3
<b>16</b>	<b><math>\delta</math> – terpinène</b>	<b>17.77</b>	<b>10.0</b>
17	Nonanal	19.81	3.7
18	Linalol	19.93	3.2
19	Terpinene-4-ol	24.79	0.2
<b>20</b>	<b>méthyle salicylate</b>	<b>25.28</b>	<b>8.9</b>
21	$\alpha$ -terpineol	25.49	1.1
22	Aldehyde C10	26.41	0.3
23	Pulegone	28.19	0.7
<b>24</b>	<b>Thymol</b>	<b>31.98</b>	<b>17.5</b>
25	Carvacrol	32.48	0.6
26	aldehyde C11	33.11	0.3
27	NI	36.08	0.4
28	$\beta$ - caryophyllene	41.13	0.5
29	NI	45.03	0.5
30	$\alpha$ -farnesene	46.23	0.2
31	$\alpha$ - bisabolene	46.41	0.3

32	octadecane	57.89	0.6
33	NI	58.59	0.3
<b>34</b>	<b>benzyle salicylate</b>	<b>64.25</b>	<b>13.9</b>
35	NI	64.56	0.3
36	NI	67.24	1.6
37	eicosane (C20)	68.17	0.3
38	NI	72.10	5.0
39	Phytol	77.54	3.8
40	NI	86.16	4.2

NI: constituant non identifié  
RT : temps de rétention



**Fig. 18: Pourcentage de différents composants de l'huile essentielle de *Filipendula hexapetala*.**

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Filipendula hexapetala* a révélé la présence de thymol (17.5%), de benzyle salicylate (13.9%), d'aldéhyde salicylique (10.3%), de  $\delta$ - terpinène (10.0%) et de méthyle salicylate (8.9%). L'huile de *F. hexapetala* se distingue des huiles des autres espèces du même genre par son richesse en thymol (17.5%) et en  $\delta$ - terpinène (10.0%). Pavlovic et al. (2007) ont signalé que l'huile essentielle de *F. hexapetala* originaire de la Serbie est riche en *n*-tricosane (17.9%), aldéhyde salicylique (13.7%), benzyle salicylate (6.8%), et méthyle salicylate (6.7%), l'huile de *F. hexapetala* étudiée est complètement dépourvue du *n*-tricosane. Toutefois, l'huile de la partie aérienne du *F. ulmaria* contient 36% d'aldéhyde salicylique et 19% de méthyle salicylate (Grazia Valle et al., 1988). De même, Lindeman et al. (1982) ont signalé que l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation à partir des fleurs de *F. ulmaria* est essentiellement riche en aldéhyde salicylique (74.8%). Cependant Papp et al. (2008) ont montré que l'huile essentielle des



racines, des feuilles et des fleurs de *F. ulmaria* contiennent 16.9%, 6.3%, 7.3% d'aldéhyde salicylique, respectivement et 81.9%, 39.1%, 23.9% de méthyle salicylate respectivement par contre l'huile de *F. herba* contient 67.5% d'aldéhyde salicylique et 4.6% de méthyle salicylate selon les mêmes auteurs Enfin, Yin et al. (2005) indiquent que les huiles des boutons floraux, des feuilles et des tiges de *F. palmata* sont riches en méthyle salicylate. Ce dernier dépasse 70.1% dans l'huile des boutons floraux. Dans une autre étude sur l'huile de *F. palmata*, Yunxiu et al. (1992) évoquent la présence de phénylméthanol, 2,6-diméthylphénol, n-nonaldéhyde, hexaldéhyde-2-ène et trans-3-hexène-1-ol comme majeurs constituants, ces derniers constituants sont complètement absents dans l'huile de *F. hexapetala* étudiée.

La composition des huiles essentielles sont sujettes à plusieurs facteurs de variabilité, facteurs externes et internes à la plante. Pour une espèce donnée la proportion des différents constituants d'une HE peut varier suivant les conditions de stockage, La température, l'humidité relative, la durée totale de l'insolation et le régime des vents exercent aussi une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologique de stockage superficielle (ex. : poils sécréteurs des Lamiaceae). Lorsque la localisation est plus profonde la qualité est beaucoup plus constante (Bruneton, 1999; Gyorgyi et al., 2006). Danute et al, (2004) ont constaté que la composition chimique de l'HE de *D. carota* récoltée dans des régions propres est différente de celle obtenue dans des régions polluées.

La qualité des huiles essentielles est également influencée par la météorologie au moment de la récolte et l'heure de la récolte. Par exemple, une huile essentielle de *Mentha* ne présente pas la même composition selon quelle soit extraite à partir des plantes récoltées le matin, au milieu ou enfin de journée. Ainsi le taux de thuyone de *Salvia officinalis* variété *dalmate* est de 26% pour une récolte de printemps et de 51% pour une récolte d'automne. (Laouer, 2004). De Vasconcelos Silva M. G. et al. (2001) qui étudiaient la variation diurne de la composition de l'huile essentielle d'*Origanum gratissimum* ont montré que cette composition variait selon le temps et l'ensoleillement. En effet, le taux d'eustragol augmentait progressivement au début de la journée pour atteindre son maximum à 12 heures (98%), et décroissait jusqu'à 11,4% à 17 heures au couché du soleil. Celui du 1,8-cinéol très élevé le matin à 7 heures (52,1%) diminuait avec l'ensoleillement pour atteindre son minimum à 12 heures (moins de 0,5%) puis augmentait au fur et à mesure que le soleil disparaissait pour atteindre son maximum à 17 heures (75%). De plus, le procédé et la durée de distillation, les procédés physiques ou chimiques utilisés lors de l'extraction et de l'analyse peuvent donner lieu à des transformations des constituants (Belaiche, 1979; Bruneton, 1999; Kofidis et al., 2004).

La proportion des différents constituants d'une HE peut varier tout au long de la croissance d'une espèce donnée. La formation des principes actifs se fait spécialement pendant la période de pleine croissance et durant les temps des métabolismes intensifs comme les périodes de floraison et de fructification, Ceci, en particulier pour quelques Apiacées (le fenouil, la carotte et la coriandre). La teneur en linalol est 50 % plus élevée chez le fruit mûr que chez le fruit vert (Bruneton, 1999 ; Gonny et *al.*, 2004; El-Zakhem, 2003). La composition chimique des huiles essentielles de certaines plantes aromatiques varie qualitativement et quantitativement selon les chimiotypes, par exemple chez *Thymus vulgaris* de la Méditerranée occidentale on trouve sept chimiotypes différents (à thymol, à carvacrol, à géraniol, à linalol, à terpinéol, à *trans*-4-thuyanol, à *cis*-8-myrcénol et à cinéol) (Bruneton, 1999).

### IV-3- Activité antimicrobienne

L'examen des différentes boîtes de Pétri n'a révélé la présence d'aucun halo d'inhibition autour des disques imbibés par les différentes dilutions de l'huile essentielle d'*A. sicula* pour les diverses souches testées tandis que les antibiotiques se sont révélés très actifs vis-à-vis des souches bactériennes de référence avec des diamètres d'inhibition variant de 18 à 44mm, cependant, les autres souches bactériennes étudiées ont développées une résistance à l'encontre de divers antibiotiques : l'ampicilline, la gentamicine, l'amikacine et l'amoxicilline pour *Klebsiella pneumoniae*, la tetracycline, l'érythromycine et la levofloxacine pour *Enterococcus faecalis* (tableau 3). Contrairement à *Aspergillus niger* et *Candida albicans* qui se sont révélés plus sensibles à cette huile avec des zones d'inhibitions de 20 mm et de 17 mm respectivement à la concentration de 1/2 (v/v). Ces diamètres sont quand même inférieurs à ceux obtenus par l'antifongique (itraconazole) qui sont de 25 mm et 26 mm.



La sensibilité ainsi que la résistance des bactéries testées aux différents antibiotiques sont représentées dans la figure 19



a) *E. coli* ATCC 25922



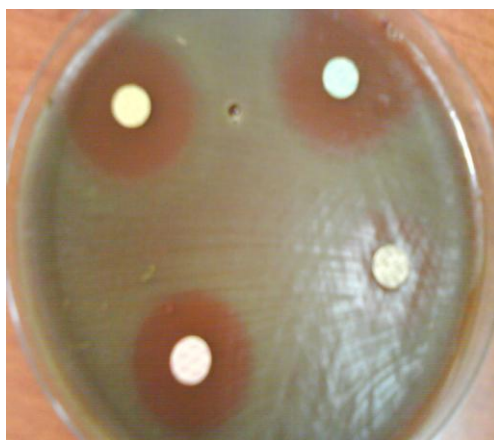
b) *S. aureus* ATCC 25923



c) *P. aeruginosa* ATCC 27853



d) *K. pneumoniae*



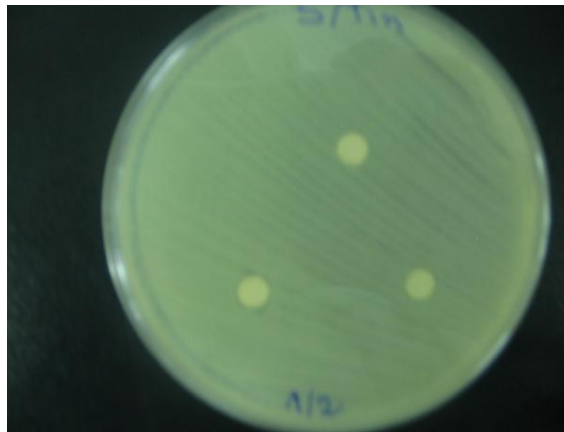
E) *Enterococcus avium*

**Fig.19 : Sensibilité des bactéries aux différents antibiotiques testés**

La résistance des bactéries testées à l'encontre d'*A. sicula* est représentée dans la figure 20



a) *P. aeruginosa* ATCC 27853



b) *S. aureus* ATCC 25923



c) *E. coli* ATCC 25922

**Fig.20: Expression de l'activité de l'HE d'*A. sicula* sur quelques souches bactériennes testées  
(absence de l'halo d'inhibition)**

Selon la bibliographie disponible, il n'existe pas de travaux déjà réalisés sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*A. sicula*, pour cela, les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus pour les autres espèces d'*Athamanta*.

L'huile essentielle d'*Athamanta sicula* étudiée ne possède pas d'activité antibactérienne du moins pour les germes testés et aux dilutions employées. Cependant les huiles d'*A. turbith ssp. haynaldii* et *A. turbith ssp. hungarica* ont montré une activité modérée vis-à-vis les bactéries à Gram- (*E. coli* et *K. pneumoniae*), à Gram+ (*S. aureus* et *E. faecalis*). Par contre *P. aeruginosa* a développée une résistance (Tomic et al., 2008). De même Petrovic et al. (2009) ont étudié l'effet des huiles des rhizomes des mêmes plantes sur quelques bactéries, ces huiles ont révélées une activité significative contre *Micrococcus luteus* et *K. pneumoniae* contrairement aux souches *E. coli* et *P. aeruginosa* qui se sont montrées résistantes.

En effet, les différences des résultats pourraient être attribuées à la nature même de la composition chimique de l'huile. Selon Oussalah et al. (2006), l'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi les composés chimiques les plus efficaces et qui possèdent un large spectre d'action antimicrobienne sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools ( $\alpha$ -terpinéol, terpinen-4-ol, menthol, géraniol, linalol), les aldéhydes (géraniol, citral et néral), les cétones (carvone, pulégone et camphre) (Moleyar et narassimham, 1992 ; Dorman et Deans, 2000; Oussalah et al., 2006).

Or l'huile essentielle d'*A. sicula* ne possède pas de tels constituants dans sa composition chimique, d'autant plus que son constituant majeur, l'apiole ne figure pas sur la liste des principaux constituants à activité antibactérienne établi par Duke (2009) ce qui nous laisse penser que ce constituant n'est pas antibactérien.

Autre fait, l'absence d'activité antimicrobienne pourrait s'expliquer par la résistance développée par un nombre important de souches et qui réagissent différemment aux divers types d'huiles essentielles. Parmi les souches étudiées, *P. aeruginosa* qui s'est montrée résistante. En faite, cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, en relation avec la nature de sa membrane externe. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. En présence d'agents perméabilisant de la membrane externe, des substances inactives contre *P. aeruginosa* deviennent actives (Mann et al., 2000). Il semble que cette souche se révèle résistante à un très grand nombre d'huiles essentielles (Hammer et al., 1999 ; Deans et Ritchie, 1987).

*E. coli* ATCC 25922 (bactérie Gram -) développe aussi une résistance vis-à-vis d'un certain nombre d'huiles essentielles (Sartoratto et *al.*, 2004; Delamare et *al.*, 2007; Wannissorn et *al.*, 2005). D'autre part, cette bactérie est très sensible vis-à-vis d'autres huiles essentielles (Burt et Reiders, 2003 ; Bouhdid, 2005).

Par contre, *S. aureus* ATCC 25923 résistante à l'action de l'huile essentielle d'*A. sicula*, semble être la plus sensible (Duarte et *al.*, 2005; Kabouche et *al.*, 2005) et n'a développé de résistance qu'envers quelques huiles essentielles (Hammer et *al.*, 1999).

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *F. hexapetala*, évaluée par la méthode de diffusion, a permis de révéler une activité moyenne sur la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 (diamètre d'inhibition 13 mm, dilution 1/2), alors que son activité vis-à-vis des souches de: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* et *Enterococcus. avium* a été limitée à des diamètres d'inhibition de 10 mm pour *E. coli* et 9 mm pour les deux autres à la dilution 1/2. Toutes les bactéries ont été seulement inhibées à l'exception de *S. aureus* qui a été détruite. Toutefois *P. aeruginosa* ATCC 27853 s'est montré résistante à l'encontre de toutes les dilutions testées. Cette huile a présenté une forte activité sur *C. albicans* avec un diamètre d'inhibition de 30 mm qui est supérieur à celui obtenu par l'antifongique : itraconazol 26 mm. Les diamètres des halos d'inhibition montrent que le pouvoir antimicrobien est inversement proportionnel à la dilution, c'est-à-dire l'effet diminue avec l'augmentation de la dilution de l'huile essentielle. La différence dans la sensibilité des espèces microbiennes enregistrée suggère la susceptibilité des différents microorganismes aux divers composants de l'huile essentielle.



La sensibilité des micro-organismes testés à l'encontre de *F. hexapetala* est représentée dans le tableau 4 et la figure 21

**Tableau 4 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Filipendula hexapetala***

Microorganismes testés	Zone d'inhibition (mm)		
	1/2	1/5	1/10
Témoin négatif DMSO	6	6	6
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	8	7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13	8	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	6	6
<i>Enterococcus avium</i>	9	8	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	8	7
<i>Aspergillus niger</i>	12	10	6
<i>Candida albicans</i>	30	22	20



a) *P. aeruginosa* ATCC 27853



b) *E. coli* ATCC 25922



c) *S. aureus* ATCC 25923

**Fig.21: Expression de l'activité de l'HE de *F. hexapetala* sur quelques souches bactériennes testées**

*S. aureus* ATCC 25923 semble être la plus sensible à l'activité de l'huile de *F. hexapetala* avec un diamètre de 13mm. En effet, ce diamètre est inférieur à celui obtenu par Radulović et al. (2007) en utilisant l'huile de *F. hexapetala* (37mm) mais à une concentration 1.7µg/disque. De même, des diamètres de zones d'inhibition de 23 à 30mm ont été enregistrés avec l'huile de *Prunus africanus* utilisée vis-à-vis de trois souches de staphylocoques (Gangoue-Pieboji et al., 2009). Xianfei et al. (2007) ont rapporté la sensibilité de *S. aureus* à l'encontre de l'essence de *Chaenomeles speciosa* (Rosacées). Dans une étude, Jantová et al. (2000), ont montré que le développement de *S. aureus* a été complètement inhibé par les extraits d'*Amelanchier ovalis*, d'*Exochorda racemosa* et de *Kerria japonica* (appartenant à la famille des Rosacées) à une concentration de 250µg/ml.

La sensibilité d'*E. coli* ATCC 25922 à l'huile de *F. hexapetala* a été aussi constatée par Radulović et al. (2007) vis-à-vis de l'huile de la même plante qui s'est montrée très active. De même Gangoue-Pieboji et al. (2009) ont signalé l'efficacité de l'essence de *Prunus africanus* contre *E. coli*. Ainsi, un diamètre d'une zone d'inhibition de 21mm a été enregistré avec l'huile de *Chaenomeles speciosa* (Xianfei et al., 2007). Cependant, les extraits d'*Amelanchier ovalis*, d'*Exochorda racemosa* et de *Kerria japonica* appartenant à la famille des Rosacées se sont révélés inactifs à l'encontre d'*E. coli* (Jantová et al., 2000). Alors que son inhibition a été signalée par Rasooli et Mirmostafa (2002) vis-à-vis de l'huile de *Thymus pubescens* et de *Thymus serpyllum*. Koba et al. (2004) ont également montré l'efficacité des huiles essentielles de la famille des Labiées. Schelz et al. (2006), ont rapporté son inhibition par sept huiles essentielles de plantes médicinales dont celles appartenant à la famille des Astéracées et des lamiacées.

L'effet antibactérien de l'huile essentielle de *F. hexapetala* vis-à-vis de *K. pneumoniae* est limité et le diamètre formé à la dilution 1/2 (v/v) est de 9 mm. Cependant plusieurs études ont montré la grande sensibilité de cette bactérie. En étudiant l'activité de *F. hexapetala*, Radulović et al. (2007), ont obtenu un diamètre d'inhibition de 37 mm. Le diamètre observé par Xianfei et al. (2007) en utilisant l'huile de *Chaenomeles speciosa* a été beaucoup plus petit (16 mm). En effet, l'essence de *Prunus africanus* a été aussi active vis-à-vis de *K. pneumoniae* (Gangoue-Pieboji et al., 2009). Unlu et al. (2003) ont obtenu un diamètre de 22 mm à la concentration de 15µl/disque avec l'huile de *Thymus pectinatus*. De même sa sensibilité à l'égard des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Eucalyptus globulus* a été mise en évidence par Mounchid et al. (2005). Son inhibition par les huiles essentielles de clou de girofle et de la sauge a été observée par Nascimento et al. (2000). Aussi, Pereira et al. (2004) ont rapporté l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* sur *K. pneumoniae*.

L'activité biologique des huiles essentielles a une relation avec les groupes fonctionnels des composants, leurs proportions et l'interaction entre eux (Dorman et Deans, 2000; Marino et al., 2001; Delaquis et al., 2002). En effet, l'activité de l'huile essentielle de *F. hexapetala* pourrait être attribuée à la présence du thymol à (17.5%) appartenant au groupe des phénols connu par son activité antimicrobienne très significative (Moleyar et Narassimham, 1992; Dorman et Deans, 2000, Oussalah et al., 2006). Selon Radulović et al. (2007), l'activité antibactérienne de l'huile de *F. hexapetala* est attribuée à sa teneur en composants dérivés du phénylpropanes tels que le benzyle salicylate, l'aldéhyde salicylique et le méthyle salicylate. Ces derniers sont parmi les constituants majeurs de l'huile de la présente étude à des pourcentages de 13.9%, 10.3% et 8.9% respectivement. Ces mêmes auteurs ont signalé que l'activité de l'huile de *F. hexapetala* n'est pas due seulement à l'activité d'un seul composant mais à la synergie entre les autres constituants. Il a été prouvé qu'il y a un effet synergique entre l'aldéhyde salicylique et le linalool à une proportion de 80:20 qui s'est traduit par une inhibition totale des germes. Cependant, le mélange du méthyle salicylate et de l'aldéhyde salicylique à 40 :60 a montré une action antagoniste et par conséquent une perte de l'activité antimicrobienne. Nakatsu et al. (2000) ont également démontré dans l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus zygis* qu'un mélange constitué de 6 principaux composants en proportions égales possédait une activité plus faible que celle de l'huile entière indiquant ainsi, le rôle significatif joué par les composants minoritaires (Cosentino et al., 1999).

*Pseudomonas aeruginosa* a montré une grande résistance à l'encontre de l'huile essentielle de *F. hexapetala* même aux plus faibles dilutions. Cependant, l'huile de *F. hexapetala* étudiée par Radulović et al. (2007) a montré une forte activité vis-à-vis de *P. aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 33 mm. L'huile de *Prunus africanus* a été également active à l'encontre de *P. aeruginosa* mais le diamètre de la zone d'inhibition a été plus petit (19 mm) (Gangoue-Pieboji et al., 2009). De même, les extraits d'*Amelanchier ovalis* et d'*Exochorda racemosa* se sont révélés actifs vis-à-vis cette souche contrairement à l'extrait de *Kerria japonica* qui a été inactif (Jantova' et al., 2000). Aussi, Dahia et al. (2007) ont signalé la sensibilité de *P. aeruginosa* à l'égard de l'huile de *Pituranthos chloranthus*.

D'autre part la résistance de *P. aeruginosa* est en accord avec la littérature qui montre que cette espèce est généralement peu sensible aux huiles essentielles (Carson et Riley, 1995 ; Arora et al., 1999, Hammer et al., 1999). Cette résistance a été rapportée par Chalchat et al. (1997) où l'espèce s'est montrée insensible aux 13 huiles essentielles testées. Cette bactérie est également résistante aux huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* (Nakamura et al., 1999), de *Salvia tomentosa* (Haznedaroglu et al., 2001), d'*Achillea Millefolium* (Candan et al., 2003), d'*Ammoïdes pusilla* (Laouer, 2004) et à bien d'autres huiles essentielles.

Belaiche (1979) rapporte qu'un germe dont le pouvoir pathogène est élevé, offre des résistances quasi constantes. Plus le germe est virulent, plus ses chances de résistances aux essences sont grandes.

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis de l'huile testée, nous constatons que l'efficacité de cette huile diffère d'une bactérie à une autre. *P. aeruginosa* est la plus résistante, cependant, *S. aureus* est la plus sensible à l'huile testée. Ces résultats sont en accord avec la littérature selon lesquelles les bactéries à Gram+ montrent la plus grande sensibilité par rapport aux bactéries à Gram - (Russel, 1999 ; Burt, 2004 ; Holley et Patel, 2005, De Souza et *al.*, 2005 ; Bakkali et *al.*, 2008). Comme il a été rapporté auparavant, le mode d'action principal des huiles essentielles consiste en la lyse de la paroi bactérienne du fait de leurs propriétés lipophiles (Fig. 22). Chez les bactéries à Gram -, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion des molécules hydrophobes (Nikaido, 2003) alors que les bactéries à Gram+ sont moins protégées parce que la paroi est formée d'une couche de peptidoglycane seulement qui n'entrave que la diffusion des poids moléculaires à 50 KD. Les antibiotiques sont, également, plus actifs sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram - (Hogan et Kolter, 2003 ; Perry et *al.*, 2004).

L'activité antifongique de l'huile essentielle d'*A. sicula* évaluée par la méthode de diffusion montre clairement la sensibilité de *A. niger* qui s'est traduit par un diamètre de 20 mm à la concentration 1/2 (v/v) par rapport à *C. albicans* dont le diamètre a été de 17mm. Ce diamètre est proche de celui obtenu par l'huile d'*A. turbith* ssp. *haynaldii* à l'encontre de *C. albicans* tandis que l'huile d'*A. turbith* ssp. *hungarica* s'est révélée inactive (Tomic et *al.*, 2008). D'autre part, *C. albicans* a montré une forte sensibilité à l'huile du rhizome d'*A. turbith* ssp. *hungarica* et d'*A. turbith* ssp. *haynaldii* à la concentration de 100 mg/ml avec des diamètres de 30mm et 25mm respectivement (Petrovic et *al.*, 2009).

Le pouvoir antifongique de l'huile d'*A. sicula* pourrait être attribué à la présence de composants antifongique classé dans la liste des constituants à activité antifongique de Duke (2009) tels que: le myristicine, le curcumène, le caryophyllène, l'élémicine, le pinène, le terpinène et le terpinolène à différentes proportions. De même Chu et Kemper (2001) signalent que le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* est lié aux :  $\beta$ -pinène, *p*-cimène, 1,8 cinéole et  $\alpha$ -pinène. Ce dernier composant se trouve dans l'huile de la présente étude à une proportion de 3.2%. D'après Deba et *al.* (2008), les composés majoritaires ou mineurs peuvent augmenter l'activité antifongique. L'effet synergique ou antagoniste de ces composants joue un rôle important dans l'inhibition des champignons.

L'activité de *F. hexapetala* a été également testée sur *A. niger* et *C. albicans*. Cette huile a présenté une forte activité sur *C. albicans* avec un diamètre d'inhibition de 30 mm contrairement à *A. niger* qui s'est montré moins sensible avec un diamètre de 12mm à la concentration de 1/2 (v/v). De même, l'activité de l'huile essentielle de *F. hexapetala* étudiée par Radulović et al. (2007) a montré une forte activité à l'encontre de *C. albicans* et *A. niger* avec des diamètres de 40 et 39 mm respectivement à la concentration de 1.7µg/disque.

L'activité antifongique des HE, peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés de l'HE. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antimicrobienne de cette huile essentielle (Giordani et al., 2008 ; Regnier et al., 2008).

En tant que constituant majoritaire, le thymol pourrait être considéré comme le responsable du fort pouvoir antifongique de l'huile de *F. hexapetala*. Ce pouvoir a été confirmé par l'étude de Couladis et al. (2004), ce composé a inhibé le développement des champignons pathogènes et phytopathogènes à des CMI très faibles (0.125 – 0.5µl/ml). Parmi les sept constituants testés par Cosentino et al. (1999) sur des espèces bactériennes et fongiques, le thymol et le carvacrol se sont révélés les plus efficaces suivis par l' $\alpha$ -terpineol.

Le thymol, le carvacrol, le *p*-cymène et le 1.8 cinéole ont été testés par Pina-vaz et al. (2004) sur 10 espèces de *Candida*. Les espèces ont manifesté une grande sensibilité à tous les composés à l'exception du 1.8 cinéole.

Selon Radulović et al. (2007), le pouvoir antifongique de l'essence de *F. hexapetala* est dû à la présence des composants dérivés du phenylpropane tels que: le benzyle salicylate, l'aldéhyde salicylique et le méthyle salicylate qui représentent 33.1% de la composition de notre huile.

Suppakul et al. (2003) ont suggéré que l'activité antifongique des HE, peut se faire selon deux mécanismes différents : certaines constituants provoquent la fuite des électrolytes et l'épuisement des acides aminés et des sucres, d'autres peuvent être insérés dans les lipides membranaires, par conséquent il y a perte des fonctions membranaires.

L'action antifongique des huiles essentielles vis-à-vis *C. albicans* est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox et al., 2000).

#### **VI-4- Activité antioxydante**

Les mesures de l'inhibition d'absorbance du DPPH provoquée par la présence de l'huile essentielle d'*Athamanta sicula* après 30 minutes ont permis de déterminer le pourcentage d'inhibition (PI) de chaque dilution de l'huile. Il est calculé en appliquant la formule citée auparavant (matériels et méthodes).

Après avoir calculé le PI des différentes dilutions de l'huile d'*A. sicula*, nous avons constaté qu'à la plus grande concentration utilisée qui est de 10 mg/ml nous avons obtenu un PI= 32.9%. Suite à la faible quantité de cette huile, nous n'avons pas pu aller au delà de la concentration 10 mg/ml et par conséquent, il était impossible d'obtenir son IC50.

## Conclusion

Cette étude se voulait une contribution à la connaissance phytochimique et à évaluer les potentialités bioactives des huiles essentielles de deux plantes l'une appartenant à la famille des Apiacées (*Tinguarra sicula*) et l'autre appartenant à la famille des Rosacées (*Filipendula hexapetala*).

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation en utilisant un dispositif d'extraction type Clevenger est réalisée. La composition chimique de ces huiles par analyse CPG/SM est réalisé au laboratoire des substances naturelles et des arômes à l'université de Nice. Nous avons ensuite testé l'activité antimicrobienne des huiles à l'aide de la technique de diffusion par disques.

La valeur du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Tinguarra sicula* était de 1.1% (w/w). Le rendement en huile de la partie aérienne de *Filipendula hexapetala* était de 0.01 % (w/w). Cette valeur est inférieure aux rendements obtenus chez d'autres espèces du même genre.

L'analyse de l'huile de *Tinguarra sicula* a permis d'isoler et d'identifier 25 composés représentant 95.8% de l'huile essentielle avec comme constituant majoritaire un dérivé du phenylpropane (l'apiole, 56.8%). L'huile essentielle est caractérisée par une importante fraction des dérivés du phenylpropane (61.4%) représentée par l'apiole (56.8%), le myristicine (3.8%) et l'élémicine (0.8%). La fraction hydrocarbonée constitue 30.5% dont 10.7% sont des hydrocarbures monoterpéniques (11 monoterpènes) et 19.8% sont des hydrocarbures sesquiterpéniques (8 sesquiterpènes). Il est à signaler également l'absence totale de fraction oxygénée (pour les mono et les sesquiterpènes). L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Filipendula hexapetala* a permis d'identifier 33 constituants représentant 87.7% de l'huile essentielle dont les constituants majoritaires sont le thymol (17.5%), le benzyle salicylate (13.9%) l'aldéhyde salicylique (10.3%), le  $\delta$ - terpinène (10.0%) et le méthyle salicylate (8.9%).

En comparant les résultats de l'analyse chimique des deux huiles essentielles avec les résultats obtenus de plusieurs espèces appartenant aux genres étudiés, on a constaté beaucoup de ressemblances et quelques différences qui peuvent être attribuées aussi bien aux facteurs extrinsèques qu'aux facteurs intrinsèques

En matière d'activité antimicrobienne, l'huile essentielle de *T. sicula* s'est montrée inactive vis-à-vis des souches bactériennes testées ceci est dû à la nature de la composition chimique de l'huile. Cependant, la même huile a manifesté une activité antifongique sur *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.



L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *F. hexapetala*, évaluée par la méthode de diffusion, a permis de révéler une activité moyenne sur la croissance de *S. aureus* ATCC 25923 avec un diamètre d'inhibition de 13 mm, alors que son activité vis-à-vis des souches de: *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* et *Enterococcus avium* a été limitée. Toutefois *P. aeruginosa* ATCC 27853 s'est montré résistante à l'encontre de toutes les dilutions testées. Cette huile a présenté une forte activité sur *C. albicans* avec un diamètre d'inhibition de 30mm qui est supérieur à celui obtenu par l'antifongique (l'itraconazol) 26 mm.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *F. hexapetala* pourrait être attribuée à la présence du thymol et à sa teneur en composants dérivés du phénylpropanes tels que le benzyle salicylate, l'aldéhyde salicylique et le méthyle salicylate.

L'activité antioxydante de l'huile de *T. sicula* a été également étudiée par le test du radical libre DPPH où le thymol a été pris comme référence. D'après les résultats du test effectué, nous avons constaté qu'à la plus grande concentration utilisée qui est de 10 mg/ml nous avons obtenu un pourcentage d'inhibition de 32.9% et suite à la faible quantité de cette huile, nous n'avons pas pu aller au delà de la concentration 10 mg/ml, par conséquent, il était impossible de déterminer la concentration correspondante à 50% d'inhibition de l'huile essentielle.

En conclusion, l'huile essentielle de *F. hexapetala* à des activités assez intéressantes sur les bactéries pathogènes ainsi que sur les champignons testés. Tandis que l'huile de *T. sicula* est pourvue uniquement d'un pouvoir antifongique assez remarquable. Il a été constaté que ces activités varient en fonction de la souche microbienne testée et de la dilution de l'huile appliquée. Ces caractéristiques importantes font de ces deux plantes un patrimoine à préserver et à valoriser.

Parmi les perspectives immédiates de cette étude est de déterminer les concentrations minimales inhibitrices de ces huiles et d'évaluer leur cytotoxicité sur des modèles animaux ainsi que l'étude du pouvoir antibactérien et antifongique des vapeurs de ces huiles sur plusieurs souches microbiennes en vue d'une éventuelle désinfection de l'air contaminée des hôpitaux ou des canaux d'aération des bâtiments. L'exploitation de ces huiles dans l'industrie agro-alimentaire en substituant les additifs chimiques de conservation par ces additifs naturels En plus de l'étude d'autres propriétés biologiques de ces plantes, à savoir les propriétés : anti-inflammatoire, antivirale, anti-lithiasique et autres.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Mamary M., Al-Meerri A. and Al-Haboui M. (2002) - antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. 22: 1041-1047.
- Amiot J. (2005) - *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. Thèse-doctorat-Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier. France.
- André R. (1998) – La maladie de parkinson. Ed. Masson. 16-19.
- Angelopoulou D., Denetzos C. and Perdetzoglou D. (2002) - Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical Systematic and Ecology*, 30:189-203.
- Arora D. and Kaur J. (1999) – Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial agents*. 12 : 257-262.
- Atawodi S.E. (2005) – Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 4 (2): 128-133.
- Audigie C.L., Dupon G. et Zonsgain F. (1995) – Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2<sup>ème</sup> ED. Doin, Paris, p. 44.
- Aurousseau B. (2002) – Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. *INRA. Prod. Anim.* 15: 67-82.
- Azevedo N.R., Campos I.F.P., Ferreira H.D., Portes T.A., Santos S.C., Seraphin J.C. Paula J.R. and Ferri P.H. (2001) - Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*, 57:733-736.
- Bahorun T. (1997) - Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne, Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit.Mauritius
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008) – Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Baser K. H. C., Ozek T., Nuriddinov Kh. R., Nigmatullaev A. M., Khadzimatov K. Kh. and Aripov Kh. N. (1997) - *J. Essent. Oil Res.*, 9, 249.
- Baser K. H., Tümen G., Tabanca N. and Demirci F. (2001) – Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Satureja wiedemanniana* (Lallem.). *Velen. Z. Naturforsch*, 56c : 731-738.
- Baudoux D. (1997) - Un procédé, une analyse, une définition. *Aroma News*. Lettre d'information de N.A.R.D: Natural Aromatherapy Research and Development.
- Beckman K. B. and Ames B. N. (1998) – The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* (78): 574-581.
- Bego Ph. (2001) - Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, pp.2-3.
- Belaiche P. (1979) - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.

- Belhattab R. (2007) - Composition chimique et propriétés antioxydantes, antifongiques et anti aflatoxinogènes d'extraits d'*origanum glandulosum* Desf. et *marrubium vulgare* L. (famille des lamiaceae). Thèse de doctorat, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Benalia Y. (2008) – Valorisation des ressources végétales steppiques par l'étude des huiles essentielles. Cas : *Marrubium deserti* DeNoé. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Bencheikh H. (2005) - Contribution à l'étude de la composition, de l'activité antimicrobienne et de la cytotoxicité des huiles essentielles de *Thymus fontanesii* et de *Foeniculum vulgare*. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Benjlali B., Tantaoui-Elaraki A., Ismaïli-Alaoui M. et Ayadi A. (1986) – Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 20 (2): 155-167.
- Benjlali B. (2004) – Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation*. 17-59.
- Binet P. et Brunel J.P. (1968) - *Physiologie végétale*. Ed. Doin, Paris, pp.774-782.
- Boelens Aroma Chemical information Service (BACIS) (1999) - ESO 2000, the complete Database of Essential Oils. Leffingwell and Associates publisher, Georgia, USA.
- Boira H. et Blanquer A. (1998) - Environmental factors affecting chemical variability of essential oils in *Thymus piperella* L. *Biochemical Systematic and Ecology*, 26:811-822.
- Bonnefond-Rousselot D., Peynet J., Beaudeau J.L., Terond P., Legrand A. et Delattre J. (2002) – Stress oxydant, fonction vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 260-267.
- Bonnier G. (1990) - *La grande flore en couleur*. Ed. Belin. Paris.
- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Senhajskli N. et Abrini J. (2005) – L'effet antibactérien in vitro de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* vis-à-vis de souches d'origines cliniques. *Nouvelles Tendances dans l'Ingénierie Biomédicale*. 11: 142-149.
- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. (2003) – Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glyco. Science & Nutrition*. 4(6):7p.
- Bruneton J. (1999) - *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3<sup>ème</sup> édition, Ed. TEC et DOC, Paris.
- Burnie G., Forrester S., Greig D. et Guest S. (2006) - *Encyclopédie de botanique et d'horticulture*. Ed. Place des victoires, Paris p. 376
- Burt S. (2004) – Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Burt SA. and Reinders R. (2003) - Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36: 162–167,
- Camarda L. and Di Stefano V. (2003) - Essential oil of leaves and fruits of *Athamanta sicula* L. (Apiaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 15:133
- Camarda L., Di Stefano V. and Pitonzo R. (2008) - Chemical composition of essential oils from *Athamantha sicula*. *Chemistry of Natural compounds*, 44 (4):532-533

- Candan F., Unlu M., Tepe B., Daferea D., Polissiou M., Sökmen A. and Akpulat H.A. (2003) – Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J. Ethno.*, 87 : 215-220.
- Caratini R. (1971) – Bordas encyclopédie : La vie des plantes. Tome 10, Ed. Bordas, Belgique.
- Carson C.F. and Riley T.V.(1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78 :264-269.
- Caude M. et Jardy A. (1996) - Méthodes chromatographiques. Dossier P1445. Base documentaire : Techniques d'analyse. vol ; papier TA2.
- Cavaleiro C., Salgueiro L.R., Dacunha A.P., Figueiredo A.C., Barroso J.G.and Casanova J. (2003) - Composition and variability of the essential oils of the leaves and berries from *Juniperus navicularis*. *Biochemical Systematic and Ecology*, 31:193-201.
- Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. (1997) – Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9: 67-75.
- Cheftel J.C. et Cheftel H. (1984) – Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Technique et Documentation-Lavoisier.
- Chowadhury J. U., Bhuiyan M. N. I. and Begum J. (2009) - Constituents of Leaf and Fruits Essential Oil of *Carum Roxburghianum* Benth. *J. Sci. Res.*, 1(1) : 160-163.
- Chu C. J. et Kemper K. J. (2001) *Lavender (Lavandula spp.)*. Longwood Herbal Task
- Collin G. (2000) - Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences*. 13 :4-5.
- Cosentino S., Tuberoso C. L., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F. (1999) – In vitro antimicrobial activity and chemical composition Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29(2) : 130-135.
- Couladis M., Tzakou O., Kujundzic S., Sokovic M. and Mimica-Dukic N. (2004) – Chemicals analysis and fungal activity of Thymus striatus. *Phytother. Res.*, 18 : 40-42.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C. Gustafson J.E., Warmington J.R and Wyllie S.G. (2000) - The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88, 170–175.
- Curtay J.P. et Robin J.M. (2000) – intérêt des complexes antioxydants. *Nutrithérapie Info*. Centre d'étude et de développement de la nutrithérapie.
- Daferea J.D., Ziogas B. N. and Polissiou M. G. (2002) – The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* And *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. *Crop protection*, 22 : 39-44.
- Dahia M., Laouer H., Chaker A.N., Prado S., Meierhenrich U.J. and Baldovini N. (2007) – Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Pituranthos chloranthus* Volatile Oil. *Natural Product Communication*, 2 (11) : 1159-1162.
- Danute M.and Ona N. (2004) - Sabinene Chemotype of Essential Oil of Seeds of *Daucus carota L. ssp. carota* Growing Wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research*.
- De Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P. et Marquier P. (2002) - Activité antibactérienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles. *Hygiène*. 10 (3).
- De Carvalho C. and Da Fonseca M.M.R. Carvone (2005) - Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*. 95 (3): 413-422.

- De Leiris J. (2003). Biochemistry of free radicals. *Heart Metabolism*. 19: 40-44.
- 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.
- De Moffarts B., Kirschvink N., Pincemail J. et Lekeux P. (2005) - Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Animale. Médecine. Vétérinaire*. 149: 1-9.
- De Souza E.L., Stamford T.L.M., Lima E.O., Trajano V.N. and Filho J.M.B. (2005) – Antimicrobial effectiveness of spices : an approach for use in food conservation systems. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48(4): 559-566.
- Deans S.G. and Ritchie G. (1987) - Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5:165-180.
- Deans G.C., Noble C.R., Mac Pherson A., Penzes L., Imre G.S. and Hofecker G. (1994) - *Skalicky Ageing Series*, vol 4, Facultas Press, Vienna, , p. 173.
- Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. and Tawata S. (2008) – Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* L. var. *Radiata*. *Food Control*, 19 : 346-352.
- Delamare A. P. L., Ivete A., Luciana A.S. and Sergio E. (2007) – Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. *Food Chemistry* 100 : 603-608.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. and Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74 :101-109.
- Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et 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.
- Desport J.C. and Couratier P. (2002) – Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16 : 253-259.
- Djibo A.K., Samaté A.D. et Nacro M. (2004) - Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum americanum* Linn., syn. *O.canum* sins du Burkina Faso. *Comptes Rendus Chimie*, 7 : 1033-1037.
- Donadieu Y. (2006) - Les plantes mellifères en phytothérapie, la reine des prés. *Abeilles et fleurs*, n°678 : 31-32.
- Dorman H.J.D, and Deans H.J.D. (2000) - Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88 (2) 308–316,
- Duarte M.C.T., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L.G and Delarmelina C. (2005) – Anticandida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* , 97 : 305-311.
- Duke J. (2009) – Phytochemical and ethnobotanical database. USDA- ARS- NGRI, Beltsville Agricultural research center (<http://www.Ars-grin.gov/duke/>)
- Duraffourd C., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C. (1990) - Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. *Eléments thérapeutiques synergiques*. 2<sup>ème</sup> éd. Masson, Paris.
- Eftekhari F., Yousefzadi M and Borhani K. (2004) - Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* seed. *Fitoterapia*. 75: 758–759,

- Eisenhut M. (2007) - The toxicity of essential oils, article in presse, International Journal of Infectious Diseases. 11(4): 365.
- El Kolli M. (2008) – Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Athemis pedunculata* Desp., d'*Athemis punctata* Vahl. et de *Daucus crinitus* Desf. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- El Zakhem M. (2003) - Effets antifongiques des huiles essentielles extraites de l'*Origanum syriacum* L. et de *Salvia libanotica* Boiss et Gaill contre les *Candida : albicans, holmii, et famata*. Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies (DEA) en Agroalimentaire et Assurance-Qualité. Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA-PG).
- Fathy A.F.A., Abdelbaki M.M., El Warraki A.G. and Abbas S. (1965) - Studies on the essential oil of Rosemary, 1- isolation of Rosemary oil. Annals of Agri. Sciences, Faculty of Agri., University of Cairo, 137-153.
- Favier A. (2003) – Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.
- Flück H. (1942) – Nos plantes médicinales. Traduit par Weitzel R., librairie Payot, Lausanne, pp. 8-14.
- Fontaine E., Barnoud D., Schwebel C. et Leverve X. (2002) – Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS. 11 : 411- 420.
- Fournier G., Habib J., Reguigui A., Safta F., Guetari S., et Chemli R. (1989) – étude de divers échantillons d'huile essentielle de *Rosmarinus* de Tunisie. Plantes médicinales et phytothérapies, XXIII (3): 180-185.
- Fournier P. (1947) – Le livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Tome I, Ed. Lechevalier. Paris.
- France-Ida J. (1996) - Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles. Info-essence. 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., Bagher Rezaei M., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry, 102: 898-904.
- Gangoué-Piéboji J., Eze N., Djintchui A.N., Ngameni B., Tsabang N., Pegnyemb D.E., Biyiti L., Ngassam P., Koulla-Shiro S. and Galleni M., (2009) - The *in-vitro* antimicrobial activity of some traditionally used medicinal plants against beta-lactam-resistant bacteria. J. Infect. Dev. Ctries., 3(9):671-680.
- Garneau F.X. (2004) - Le matériel végétal et les huiles essentielles. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 1-16.
- Garnero J. (1996) - Huiles essentielles. Dossier : K345. Base documentaire: Constantes physico-chimiques. vol. papier n°: K2.
- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini Ana ECS. and Fonseca Maria J.V. (2003) – Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. AAPS Pharma.Sci.5 (2), 5p.
- Ghestem A., Seguin E., Paris M. et Orecchioni A.M. (2001) - Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, - Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
- Giordani R., Hadeif Y. and Kaloustian J. (2008) – Composition and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. Fitoterapia, 79 : 199-203.

- Gonny M., Bradesi P. and Casanova J. (2004) - Identification of the components of the essential oil from wild Corsican *Daucus carota* L. using <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. *Flavour Fragr. J.* 19, 424–433.
- Granger M. M. R., Passet J. et Arbousset G. (1973) – L'essence de *Rosmarinus officinalis*, influence du mode de traitement du matériel végétal. *Parf. Cosm. Sav. France* 3(3) : 133-137.
- Grazia Valle M., Nano G. M. and Tira S. (1988) - The essential oil of *Filipendula ulmaria*. *Planta Medica*, 54 (2): 181-182
- Groussard C. (2006) – Stress oxydatif et exercice anaérobie. Oxidative stress and anaerobic exercise. *Science & Sports*. 21 : 201-209.
- Grysole J. (2004) - La commercialisation des huiles essentielles. Manuel pratique des huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 139-141.
- Guignard J.L., Cosson L. et Henry M. (1985) - Abrégé de phytochimie. Ed. Masson Paris, pp.155-174.
- Guignard J.L. (2000) – Biochimie végétale. 2<sup>ème</sup> Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177-185.
- Guignard J., Dupont F. (2004) - Botanique- systématique moléculaire- Ed. Masson. 13<sup>e</sup> édition.
- Gyorgyi H., Laszlo Gy S. and Éva H. (2006) - Essential oil composition of three cultivated *Thymus* chemotypes from Hungary. *J. of Essent. Oil Res.* 18(3), 315-317.
- Halliwell B. (1994) – Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*. 344: 721- 724.
- Halliwell B., Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol.* 142: 231-255.
- Hammer K.A., Carson C.F. and Riley T.V. (1999) - Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology.* 86: 985–990,
- Hanbali F., Akssira M., Ezoubeiri A., Gadhi C.A., Mellouki F., Benherraf A., Blazquez A.M. and Boira A. (2005) - Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Pulicarian odora* L. *Journal of Ethnopharmacology.* 99: 399–401,
- Haznedaroglu M.Z., Karabay N.U. and Zeybek U. (2001) – Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. *Fitoterapia*, 72(7) : 829-831.
- Hernandez Ochoa L-R. (2005) – Substitution de solvants et matières actives de synthèse par une combine « solvant/actif » d'origine végétale. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse.
- Hogan D. and Kolter L., (2003) – why are bacteria refractory to antimicrobials ? *Current Opinion in Microbiology*, 5 : 472-477.
- Holley R.A. and Patel D. (2005) - Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology.* 22 (4): 273–292.
- Huang D.J., Lin C.D., Chen H.J. and Lin Y.H. (2004) – Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipouroea batatas*) Lam «Tamong 57» constituents. *Botanical Bulletin of Academi. Sinica.* 45: 175-186.
- Hulin V., Mathot A.G., Mafart P. et Dufossé L. (1998) - Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'aromes. *Sciences des aliments*, 18: 563-582.

- Inouye S., Tsuruoka., Watanabe M., Takeo K., Akao M., Nishiyama Y. and Yamaguchi H. (1998) - Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact. *Mycoses*. 43 (1): 17–23.
- Janssen A.M., Scheffer J.J.C., Parhan-Van and Svendsen A.B. (1988) - Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes. *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.*, 10 : 277-280.
- Jantova´ S., Nagy M., Ruzˇekova´ L. and Grancˇai D. (2000) - Antibacterial Activity of Plant Extracts from the Families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytother. Res.* 14, 601–603.
- Javidnia K., Miri R., Kamalinejad M. and Edraki N. (2005) - Chemical composition of *Ferula persica* Wild. essential oil from Iran. *Flavour and fragrance journal*, 20 (6): 605-606
- Jordan M.J., Martinez R.M., Goodner K.L., Baldwin E.A. and Sotomayor J.A. (2006) - Seasonal variation of *Thymus hyemalis* lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*.
- Juteau F., Masotte V., Bessiere J.M. and Viano J. (2002) - Compositional characteristics of essential oil of *Artemisia campestris var. glutinosa*. *Biochemical Systematic and Ecology*, 30:1065-1070.
- Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z. and Benlabed K. (2005) – Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, 15 : 129-133.
- Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. and Traore A.S. (2005) – Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106: 119-133.
- Khajeh M., Yamini Y., Sefidkon F. and Bahramifar N. (2004) - Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 86:587-591.
- Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkon F. and Pirmoradei M.R. (2005) - Comparison of essential oil composition of *Ferula assa.foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrosistillation methods. *Food Chemistry*, 91:639-644.
- Khalil E.A., Afifi F.U. and Al-Hussaini M. (2007) – Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). *Journal of Ethnopharmacology*. 109: 104-112.
- Koba K., Sanda K., Raynaud C., Nenonene Y. A., Millet J. et Chaumont J.P. (2004) – Activités antimicrobiennes d’huiles essentielles de trois *Cymbopogon sp.* Africains vis-à-vis de germes pathogènes d’animaux de compagnie. *Ann. Méd. Vét.* 148 : 202-206.
- Koechlin-Ramonatxo C. (2006) – Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoire. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 : 165-177.
- Kofidis., George., Bosabalidis, Artemios, Kokkini, Stella. (2004) - Seasonal variation of essential oils in a Linalool-Rich chemotype of *Mentha spicata* grown wild in Greece. *J. of essent. oil res.* 16, 469- 472.
- Lagunez-Rivera L. (2006) - Etude de l’extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Lamarti A., Badoc A., Deffileux G., et Carde J.P. (1994) - Biogénèse des monoterpènes I-localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133 :69-78



- Laouer H. (2004) -Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*. Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif.
- Lee J., Koo N. and Min D.B. (2006) – Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3 (1): 21-33.
- Lima C.F., Carvalho F., Fernandes E., Bastos M.L., Santos-Gomes P.C., Fernandes-Ferreira M. and Pereira-Wilson C. (2004) - Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 18(4), 457-465.
- Lindeman A., Jounela-Eriksson P. and Lounasmaa M. (1982) - The aroma composition of the flower of meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 15 (5): 286-289.
- Madeira S.V.F., Rabelo M., Soares P.M.G., Souza E.P., Meineles A.V.P., Montenegro C., Lima R.F., Assreuy A.M.S and Criddle D.N. (2005) - Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L.(labiatae) on Guinea-pigileum. *Phytomedicine*, 12:506-509.
- Maire R. (1980) – Encyclopédie biologique, flore de l'Afrique du nord. Tome 15. Ed. Lechevalier. Paris.
- Maksimovic Z., Petrovic S., Pavlovic M., Kovacevic N. and Kukic J. (2007) - Antioxydant activity of *Filipendula hexapetala* flowers. *Fitoterapia*, 78: 265-267.
- Mann C. M., Cox S. D. and Markham J. L. (2000) – The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributrs to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.*, 30: 294-297.
- Marc F., Brisbarre F., Davin A., Baccaunaud M. and Ferrand C. (2004) – Evaluation du pouvoir antioxydant (TEAC) d'extraits de végétaux en vue d'utilisations alimentaires. *International journal of food science and technology*. 24(5): 399-414.
- Marino M., Bersani C. and Comi G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of food microbiology*. 67 : 187-195.
- Massion P., Preise R.J.C. et Balligand J.L. (2002) – Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères. *Reactive nitrogen species : deleterious or not. Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 248-252.
- Masuda T., Yonemori S., Oyama Y., Takeda Y., Tanaka T. and Andoh, T. (1999) - Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1749–1754.
- McClintock R., Fitter R.S.R. Fauarger Cl. et Fauarger S. (1997) – Guide des plantes à fleurs de l'Europe occidentale. Ed. De la chaux et Niestlé, Suisse.
- Miguel M.G., Figueiredo C., Costa M.M., Martins D., Duarte J., Barroso J. G. and Pedro L.G. (2003) – Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *T. mastichina*, *T. carnosus* and *T. capiata* in sunflower oil. *Nahrung Food*, 47 (6): 397-402.
- Miladinovic D. and Miladinovic I. J. (2001) – Antimicrobial activity of essential oil of Sage from Serbia. *Physics, Chemistry and Technology*, 2(2): 97-100
- Mockute D. and Judzentiene A. (2003) - Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium ssp.millefolium* growing wild in Lithuania. *Biochemical systematic and Ecology*, 31:1033-1045.

- Mohammedi Z. (2006) – Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magistère, Département de biologie, Faculté des sciences, UABB de Tlemcen.
- Moleyar V. and Narassimham P. (1992) – Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*, 16: 337-342.
- Molyneux P (2004) – The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J.Sci.Technol.* Vol.26 N°2: 211-219.
- Mouchid K., Bourjilat F., Dersi N., Abouaouira T., Rachidai A., Tantaoui-Elaraki A. and Alaoui-Ismaili M. (2005) – The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus globulis*. *African Journal of Biotechnology*, 4(10): 1175-1176.
- Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T., Bando T., Melo A.F.N., Cortez D.A.G. and Filho B.P.D. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. *Essential Oil. Mem.* vol. 94 (5), 675- 678, 1999.
- Nakatsu T, Lupo A, Chinn J, Kang R. (2000) - Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in natural products chemistry*, 21 :571.
- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C. and Silva G.L. (2000) – Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. 31 :247-256.
- Nicole M. (1996) - Aperçu de l'aromathérapie. *Info.essence*.2 :4-5.
- Nikaido H. (2003) – Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4) : 593-656.
- Ohno T., Kita M., Yamaoka Y., Imamura S., Yamamoto T., Mitsufuji S., Kodama T., Kashima K. and Imanishi J. (2003) - Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 8 (3): 207-215.
- Oliveira M.J., Iani F.P.C., Oliveira C.B.A., Santos M.R., Souza P.S., Santos S.C., Seraphin J.C. and Ferri P.H. (2005) – Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 275-285.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. and Lacroix M. (2006) – Antimicrobial activity of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* 73: 236-244.
- Palà-paul J., Perez-Alonso M.J., Velasco-Negueruel A., Pala-paul R., Sanz J., and Conejero F. (2001) - Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L.ssp *rosmarinifolia*. *Biochemical Systematic and Ecology*, 29: 663-672.
- Papp I., Simándi B., Blazics B., Alberti A., Héthelyi E., Szöke E. and Kéry A. (2008) - Monitoring Volatile and Non-Volatile Salicylates in *Filipendula ulmaria* by Different Chromatographic Techniques. *Chromatographia*, 68 : 146.
- Paré J. (1997) - Procédé assisté par micro-ondes. *Info-essences*, Bulletin sur les huiles essentielles, 4 :p.4.
- Paris M.et Hurabielle M. (1981) – Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome. Ed. Masson p.339
- Pasquier C. (1995) – Stress oxydatif et inflammation. *Revue Française des laboratoires*. 1995 (276) : 87-92.
- Pattnaik S., Subramanyam V.R., Bapaji M. and Kole C.R. (1997) - Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*. 89 (358) 39-46
- Pavlovic M., Petrovic S., Ristic M., Maksimovic Z. and Kovacevic N. (2007) - Essential oil of *Filipendula hexapetala*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43 (2): 228-229.

- Peng H.Y., and Yang X.E. (2005) - Volatile constituents in the flowers of *Elsholtzia argyi* and their variation: a possible utilization of plant resources after phytoremediation. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B (2): 91-95.
- Pereira R.S., Sumita T.C., Furlan M.R., Jorge A.O.C. and Ueno M. (2004) – Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. *Rev. Saude. Publica.* 38(2) : 123-165.
- Perry J.J., Staley J.T., et Lory S. (2004) - Microbiologie. Cours et questions de révision. Ed. Dunod.
- Petrovic S., Tomic A., Pavlovic M., Tzakou O., Couladis M., Milenkovic M., Vucicevic D. and Lakusic B. (2009) - Composition and Antimicrobial Activity of the Rhizome Essential Oils of Two *Athamanta turbith* Subspecies. *Journal of Essential Oil Research.* 21: 276-279.
- Pibiri M. C. (2006) - Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, p.161.
- Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Pinto E., Costa-de-Oliveira S., Tavares C., Salgueiro L, Cavaleiro C., Gonçalves M.J. and Martinez-de-Oliveira J. (2004) - Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *J. Acad. Dermatol. Venereol.* 18: 73–78.
- Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O. (1999) – L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Cœur, Poumon.* (4) :5.
- Pincemail J., Defraigne J.O. and Limet R. (2001) – Vitamines, acides gras et prévention des maladies cardiovasculaires. *Medi Sphère.* 130.
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K. et Defraigne J. O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante, *Nutrition clinique et métabolisme.* 16 : 233-239.
- Pincemail J. et Defraigne J.O. (2004) – Les antioxydants: un vaste réseau de défenses pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène, Symposium « antioxydant et alimentation » institut Danone. 23/10/2004.
- Platzer N. (2002) - Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Dossier : P1092, vol. TA1.
- Porter N. (2001) - Essential oils and their production. *Crop & Food Research.* Number 39.
- Pradeau D. et Dauphin C. (2007) - Chromatographie planaire: applications. Dossier P1476, Base documentaire: Techniques d'analyse, vol. papier n° TA2.
- Quezel P. et Santa S. (1962) - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 1, Edition CNRS, Paris.
- Radulovic N., M. Misic M., Aleksic J., Dokovic D., Palic R. and Stojanovic G. (2007) - Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil. *Fitoterapia*, 78: 565-570.
- Rahal S. (2004) - Chimie des produits naturels et des êtres vivants. O.P.U. Edition. p.162
- Rai M.K., Acharya D. and Wadegaonkar P. (2003) - plant derived-antimycotics: potential of Asteraceous plants, In : plant-derived antimycotics : Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, Londen, Oxford. 165-185.
- Ramdani M., Rached O., Laouer H., El Kolli M. and Lograda T. (2007) - Chemical composition and antimicrobial activity of *Cupressus dupreziana* A. Camus. *Natural Product Communication.* 2 (9): 945-949,

- Randrianalijaona J.A., Ramanoelina P.A.R., Rasoarzhona J.R.E. and Gaydou E.M. (2005) – Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. essential oils from Madagascar. *Analytica Chimica Acta*, 545:46-52.
- Rasooli I. and Mirmostafa S. A. (2002) – Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*, 73: 244-250.
- Rasooli I., Rezaei B. and Allameh A. (2005) - Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*. 16 (10), 859-866.
- Ré D.B., Nafia I., Nieoullon A., Goff L.K.L et Had-aissouni L. (2005). Stress oxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate. Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 24 : 502-509.
- Regnier T., Plooy W.D., Combrinck S. and Botha B. (2008) – Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 48 : 254-258.
- Reynaud J. (2002) - La flore du pharmacien. Ed. TEC et DOC, Paris.
- Rolland Y. (2004) – Antioxydants naturels végétaux. *OCL*. 11(6) : 419-424.
- Rosua J. L. et Granados A.G. (1987) – Analyse des huiles essentielles d'espèces du genre *Rosmarinus* L. et leur intérêt en tant que caractère taxonomique. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, XXI(2) : 138-143.
- Rouessac F. et Rouessac A. (2004) - Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, méthodes séparatives. 6<sup>ème</sup> Ed. Dunod, Paris, p.102.
- Rudolf E. (1968) - Gas-liquid chromatography of terpenes XVI, the volatile oil of the leaves of *Juniperus Aster*. *Ashee. Can. J. Chem.*, 46 (5): 83-679.
- Russel A. D., (1991) – Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics : food additives and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(3): 191-201.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S. et Radice M. (2005) – Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
- Salle J.L. et Pelletier J. (1991) - Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, pp.19-45.
- Sartoratto A. Machado A.L.M., Delarmelina C., Figueira G.M., Cristina M., Duarte T. and Rehder V.L.G. (2004) – Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35 : 275-280.
- Scheffer J.J.C. (1996) - Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*, 10:S6-S7.
- Schelz Z., Molnar J. and Hohmann J. (2006) – Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*. 77 :279-285.
- Schwedt G. (1993) - Méthodes d'analyse. Ed. Flammarion.
- Schwob I., Bessiere J.M., Masotti V. and Viano J. (2004) - Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 735-745.

- Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z. and Ahmadi S. (2007) – The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* jamzad. Food chemistry, 100: 1054-1058.
- Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z. and Ahmadi S. (2007) - The effect of distillation methods and stage of plant growth n the essential oil content and composition of *Satureja Rechingeri* jamzad. Food chemistry, 100: 1054-1058.
- Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernester L., Hochstein P. (1990) Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P<sub>450</sub> reductase and cytochrome P<sub>450</sub>. *Free Radic Biol Med.* 8: 145-152.
- Sies H. (1993) – Strategies of antioxidant defense. Europe. Journal. Biochemistry. 215 : 213-219.
- Silvestre A.J.D., Cavaleiro J.A.S., Delmond B., Filliatre C. and Bourgeois G. (1997) - Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulis* Labill. From Portugal using multivariate statistical analysis. Industrial Crops and Products, 6:27-33.
- Skoula M., Abidi C. and Kokkalou E. (1996) - Essential oil variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* growing wild in Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 24 (3):255-260.
- Smallfield B. (2001) – Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research. Number 45, p4.
- Spichiger R. E. (2004) – Botanique systématique des plantes à fleurs. Ed. Presses polytechniques et universitaires. Romandes.
- Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K. et Bigger S. W. (2003) – Antimicrobial properties of Basil and its possible application in food packaging. *J.Agric. Food Chem.*, 51: 3197-3207.
- Svoboda K. P. and Hampson J. B. (1999) – Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars/>
- Tabanca N., Demirci B., Ozek T., Kirimer N., Baser K.H.C., Bedir E., Khan I.A. and Wedge D.E. (2006) - Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography. A*, 1117: 194–205.
- Tamer F.M.D. (2003) – Free Radicals, Types, Sources and Damaging Reactions. Internal Medicine Articles.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., and Polissiou M. (2005) - Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. 90: 333–340.
- Teuscher E., Anton R. et Lobstein A. (2005) – plantes aromatiques: épices, aromates, condiments er huiles essentielles. Tec et Doc éditions, Paris
- Tomic A., Petrovic S., Pavlovic M., Couladis M., Tzakou O., Milenkovic M. and Vucicevic D. (2008) - composition and antimicrobial activity of the fruit essential oils of two *athamanta turbith* subspecies. *Chemistry of Natural Compounds*. 44 (6) : 789-791.
- Unlu G.V., Candan F., Sokmen A., Daferea D., Polissio M., Sökmen M., Donnez E. and Tepe B. (2003) Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* fisch. Et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.*, 51 : 63-67.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D and Mazur M. (2007) – Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39: 44-48.

- Valnet J. (1984) - Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris p 544
- Vansant G. (2004) – Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Symposium « Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- Vasconcelos Silva De M. G., Craveiro A. A., Abreu Matos F. J., Machado M. I. L. and Alencar J. W. (1999) Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* 70 : 32-34.
- Vernon F. et Richard H. (1976) - Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. *APRIA*, 2 (10) : 151-166.
- Verykokidou E., Tzakou O., Loukis A. and Roussis V. (1995) - *J. Essent. Oil Res.*, 7: 335.
- Viaud H. (1993) - Les huiles essentielles, qualité distillation. GNOMA, Revue électronique. [www.nature-helps.com/France/viaud2.htm](http://www.nature-helps.com/France/viaud2.htm)
- Viljoen A.M., Denirci B., Baser K.H.C., Potgieter C.J. and Edwards T.J. (2006) - Micro distillation and essential oil chemistry- a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 72:99-104.
- Wang B.S., Li B.S. and Zeng Q.X. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food chemistry*. 107 : 1198-1204.
- Wannissorn B., Jarikassam S., Siviwangchai T. and Thubthimthed S. (2005) – Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, 76: 233- 236.
- Wichtel M. et Anton R. (1999) - Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.
- Xianfei X., Xiaoqiang C., Shunying Z., Guolin Z. (2007) - Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. *Food Chemistry*, 100: 1312–1315.
- Yayi E., Gbenou J.D., Ahoussi L.A., Moudachirou M. et Chalchat J.C. (2004) - *Ocimum gratissimum* L., Siège de variation chimiques complexes au cours du développement. *Comptes Rendus Chimie*, 7 :1013-1018.
- Yin W, Xiang-Ying M., Xiao-hua L., Yong-li B., Shu-ping W. and Yu-xin L. (2005) - Analysis of essential oils from flower-buds, leaves and stems of *Filipendula palmate* (Pall.) Maxim. *Chemical Research in Chinese Universities*, 21 (6):658-662.
- Yunxiu S, Kunyuan M., Wenpu J. and Huixiang Z. (1992) - Structure identification and quantitative analysis of volatile oil of *Filipendula palmata* Maxim. *Jilin Daxue Ziran Kexue Xuebao* (1): 119-121.
- Zheljzakov V.D., Craker L.E. and Xing B. (2005) - Effects of Cd, Pb and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint and basil. *Environmental and experimental botany*.
- Zivanovic P., Dokovic D., Vajs V., Slavkovska V., Todorovic B. and Milosavljevic S. (1994) - Essential oils of flowers and fruits of *Athamanta haynaldii* Borb. et Üchtr. (Apiaceae). *Pharmazie*, 49: 463.

أبو زيد ن.ح. (1988) - النباتات العطرية ومنتجاتها الزراعية و الدوائية.الدار العربية للنشر و التوزيع القاهرة 472 صفحة

أبو زيد ن. ح (2000) - الزيوت الطيارة الدار العربية للنشر و التوزيع القاهرة 256 صفحة

هيكلم. او عمر ع.ع(1993). النباتات الطبية و العطرية. كيمياؤها, إنتاجها و فوائدها. منشأة المعارف بالإسكندرية.

## Annexe I :

### Préparation de l' inoculum

L'étalon 0.5Mc Farland se prépare en versant 0.5ml d'une solution de BaCl<sub>2</sub> dihydraté à 1% (10g/l) dans une éprouvette de 100ml. Compléter à 100ml avec du H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> à 1% (10ml/l). ainsi préparé, l'étalon doit présenter une densité optique de 0.08 à 0.1 lue à 625nm (~10<sup>8</sup> UFC /ml).

## Annexe II :

### Les milieux de culture

#### **Muller Hinton agar :**

-Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300 g
-Hydrolysate de caséine.....	17.5 g
-Amidon de maïs.....	5 g
-Agar Agar.....	13 g
-Eau distillée .....	1000 ml

#### **MH agar additionné de sang (gélose au sang)**

-Infusion de viande de bœuf déshydraté.....	300 g
-Hydrolysate de caséine.....	17.5 g
-Amidon de maïs.....	1.5 g
-Sang de cheval lysé.....	2 à 5%
-Agar Agar.....	13 g
-Eau distillée .....	1000 ml

#### **Bouillon nutritif**

-Peptone.....	5 g
---------------	-----

-Extrait de viande.....	1 g
-Extrait de levure.....	2 g
-Chlorure de Sodium.....	5 g
-Eau distillée.....	1000 ml

**Sabouraud simple**

-Peptone .....	10 g
-Gélose.....	20 g
-Glucose.....	20 g
-Eau distillée.....	1000 ml

**Extrait de malt agar**

-extrait de malt.....	30 g
-agar.....	15 g



## Annexe III :

### Les antibiotiques

<b>Antibiotique</b>	<b>Sigle</b>	<b>Charge du disque (µg)</b>
Ampicilline	AM	10
Cefazoline	CZ	30
Benzylpenicilline	P	6
Gentamicine	GM	10
Amikacine	AN	30
Fosfomycine	FOS	50
Ciprofloxacine	CIP	5
Chloramphénicol	C	30
Colistine	CS	50
Pristinamycine	PT	15
Pipéracilline	PIP	75
Imipénème	IPM	10
Amoxilline+acide clavulinique	AMC	20+10
Amoxilline	AMX	25
Oxacilline	OX	5
Cefoxitine	FOX	30
Kanamycine	K	30
Tetracycline	TE	30
Erythromycine	E	15
Clindamycine	CLI	15
Rifampicine	RA	30
Vancomycine	VA	30
Ticarcelline	TIC	75

Ceftazidime	CAZ	30
Tobramycine	TOB	10
Céfotaxime	CTX	30
Triméthoprim + Sulfamides	SXT	1.25 + 23.75
Levofloxacin	Lev	5
Streptomycine	S	10
Furanes	FT	300
Teicoplanine	TEC	30
Cefalotine	CF	30
Aztréonam	ATM	30
Ceftriaxone	CRO	30
Itraconazole	Itra	25

## Résumé :

Les huiles essentielles possèdent d'importantes activités antimicrobiennes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants, ce qui nous a conduits à effectuer l'analyse chimique et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* et de *Filipendula hexapetala*. L'extraction est effectuée par hydrodistillation. L'analyse des huiles essentielles est réalisée par CPG/SM. L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. L'analyse chimique de *T. sicula* a révélée la présence de 25 constituants dominés par l'apiole (56.8%). L'huile essentielle de *F. hexapetala* est constituée principalement de 33 constituants dont les constituants majoritaires : le thymol (17.5%) et l'aldéhyde salicylique (10.3%). L'huile de *T. sicula* est inactive vis à vis des bactéries testées mais active à l'égard des champignons. L'huile de *F. hexapetala* présente une activité antimicrobienne sur *S. aureus*, *A. niger* et *C. albicans* alors que *P. aeruginosa* est résistant.

Mots clefs : *Tinguarra sicula*, *Filipandula hexapetala*, huiles essentielles, activité antimicrobienne.

## Abstract:

Essential oils have important antimicrobial activities and can replace with success antibiotics which show their inefficiency against resistant microorganisms. In this study we have tested the antimicrobial activities of the essential oils of *Tinguarra. sicula*, and *Filipendula. hexapetala*. The extraction is done by hydrodistillation method. The analyses were obtained by CPG/MS. Antimicrobial activity was tested by using the agar diffusion test. The chemical analysis of *T. sicula* has revealed the existence of 25 constituents dominated by the apiol (56.8%). The essential oil of *F. hexapetala* consists mainly of 33 constituents of which the majority compounds: the thymol (17.5%) and the salicylaldehyde (10.3%). Essential oil of *T. sicula* was inactive against the bacteria tested but active against fungi. Essential oil of *F. hexapetala* exhibited an antimicrobial effect on *S. aureus*, *A. niger* and *C. albicans* but *P. aeruginosa* was resistant.

Key words: *Tinguarra sicula*, *Filipendula hexapetala*, essential oils, antimicrobial activity.

## الملخص:

تملك الزيوت الأساسية نشاطية ضد ميكروبية مهمة و تستطيع ان تعوض بنجاح المضادات الحيوية التي أثبتت عدم فعاليتها ضد البكتيريا المقاومة الشيء الذي حثنا على إجراء التحليل الكيميائي و الدراسة ضد الميكروبية ل *F. hexapetala* و *T. sicula* : تم الاستخلاص بواسطة التقطير المائي. بينما تحليل الزيوت الأساسية فتم بواسطة كروماتوغرافيا طور الغازي المزوج بمطيافية الكتلة. كما تمت دراسة الأثر ضد الميكروبي بواسطة طريقة الانتشار على الوسط الصلب التحليل الكيميائي ل *T. sicula* قد حدد 25 مكونا يهيمن عليه Apiole (56.8%) كما يتكون زيت *F. hexapetala*. أساسا من 33 مكون يهيمن عليه : thymol (17.5%) و salicylaldehyde (10.3%). أبدأ زيت نبات *T. sicula* مقاومة للبكتيريا المدروسة بينما أبدأ نشاطية ضد الاعفان. كما أبدأ زيت *Filipendula hexapetala* نشاطية ضد ميكروبية ضد *S. aureus* و *A. niger* و *C. albicans* بينما أبدأت *P. aeruginosa* مقاومة.

الكلمات المفتاحية: *Tinguarra sicula* ، *Filipendula hexapetala* ، الزيوت الأساسية، النشاطية ضد الميكروبية