

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة المسيلة

UNIVERSITE DE M'SILA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

MEMOIRE : MASTER ACADEMIQUE

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : BIOLOGIE

OPTION: ANALYSES BIOCHIMIQUES

Présenté par

Atittallah Nassira

Thème :

**Extraction et bioactivités des huiles essentielles de
deux plantes aromatiques algériennes**

DEVANT LE JURY :

Bensemmane Latifa

MAA

Président

Guesmia Khaoukha

MAA

Encadreur

Selloum Mounir

MAA

Examinateur

Khaniche Abdelhakim

MAA

Examinateur

Promotion : 2012-2013



Dédicace

A mon père et à ma mère, depuis mes premiers pas à l'école, vous ne vous êtes jamais lassés de me relater l'importance des études. Vous m'avez toujours incité à être assidue, excellente. Votre affection sans limite m'a accompagné tout au long de la réalisation de cet oeuvre. Je ne pourrai jamais vous en remercier assez. Puisse ce travail vous combler de joie et d'espoir. Qu'Allah vous garde longtemps parmi nous.





Remerciements



Avant toute chose, je remercie ALLAH, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

*J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mme. **Guessmia K**, Chargée de Cours au département de Biochimie et microbiologie, faculté des sciences, université M'sila pour avoir accepté de m'encadrer et diriger ce travail avec une grande rigueur scientifique, a disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.*

*Ma vive reconnaissance va au Mme **Bensemmane L**. Chargée de Cours au département de biochimie et microbiologie de M'sila d'avoir accepté de présider le jury de soutenance du mémoire Ainsi qu'aux Mr **Selloum M**. et Mr **Khaniche A**. d'avoir accepté de juger ce modeste travail.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participer de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. Je ne saurais remercier ici les personnes dont la collaboration a été essentielle pour la réalisation de certaines étapes de ce travail, en particulier Mr. **Benyahya Y**. chef de service de laboratoire d'analyses à l'hôpital alzhraoui, **Bakir R**, le responsable de laboratoire de bactériologie et parasitologie à l'hôpital alzhraoui.*

*A Mr **Sgueri K**, responsable des laboratoires de Biochimie et de Microbiologie au département de Biochimie et microbiologie, faculté des sciences, université M'sila.*

*un grand merci à mes frères surtout **Fawzi** et mes sœurs surtout **Souad**, vous avoir à mes côtés représente un bonheur pour moi. Soyez unis, endurants et patients, la réussite est au bout de l'effort.*



Merci...Merci..... Merci...





بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أُحْمَدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

Partie de synthèse bibliographique

1^{er} chapitre: Plantes médicinales

1. Plantes médicinales	03
1-1. Généralités sur les Plantes médicinales	03
1-1. Définition et importance.....	03
1-1-2. Méthodes d'utilisation.....	03
1-1-3. Principes actifs.....	04
1-1-3-1. Définition.....	04
1-1-3-2. Les principaux principes actifs de plantes (Métabolites Secondaires).....	04
1-2. La phytothérapie	06
1-3. La phytochimie	06
1-4. L'aromathérapie	06
1-5. Les plantes à tester	07
1-5-1. <i>Brachyapium pomelianum</i>	07
1-5-1-1. Description botanique.....	07
1-5-1-2. Taxonomie.....	08
1-5-2. <i>Sideritis incana</i>	09
1-5-2-1. Description botanique.....	09
1-5-2-2. Taxonomie.....	10
1-5-2-3. Utilisations thérapeutiques.....	10

2^{ème} chapitre : généralités sur les huiles essentielles

2. Généralités sur les huiles essentielles	11
2-1. Définition des huiles essentielles	11
2-2. Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles	11
2-3. La composition chimique des huiles essentielles	11
2-3-1. Les composés terpéniques.....	12
2-3-2. Les composés aromatiques.....	13
2-4. Répartition botanique	14
2-5. Les méthodes d'étude	14

2-5-1. Les méthodes d'extraction.....	14
2-5-1-1. L'enfleurage et la macération.....	14
2-5-1-2. L'expression.....	15
2-5-1-3. La distillation.....	15
2-5-1-4. L'extraction par les solvants organiques.....	16
2-5-1-5. L'extraction assistée par micro-ondes.....	16
2-5-1-6. L'extraction par fluides supercritique.....	17
2-5-2. Les méthodes d'analyses.....	17
2-5-2-1. Chromatographie en phase gaz couplé à spectrophotométrie de masse.....	17
2-5-2-2. Chromatographie en phase gaz bidimensionnelle.....	17
2-6. Les utilisations des huiles essentielles.....	18
2-7. La toxicité des huiles essentielles.....	18
2-8 . Les activités biologiques des huiles essentielles.....	19
2-8-1. L'activité antioxydante.....	19
2-8-1-1. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?.....	19
2-8-1-2. L'activité antioxydante des huiles essentielles.....	20
2-8-2. L'activité antibactérienne.....	20
2-8-2-1. La toxicité des antibiotiques.....	20
2-8-2-2. L'activité antibactérienne des huiles essentielles.....	21

Partie expérimentale

3^{ème} chapitre: Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes.....	22
3-1. Matériel	22
3- 1-1.Matériel biologique.....	22
3-1-1-1. Matériel végétal.....	22
3-1-1-2. Les souches bactériennes.....	22
3-1-1-3. Les milieux de cultures.....	22
3-1-2. Matériel chimiques.....	23
3-1-2-1. Les antibiotiques utilisés.....	23
3-1-2-2. Les solvants organiques.....	23
3-1-2-3. L' antioxydant témoin.....	23
3-2. Méthodes	24
3- 2-1. L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	24
3-2-1-1. Calcul de rendement.....	25
3-2-1-1. Mesure de la densité.....	25

3-2-2. L'évaluation de l'activité antibactérienne.....	25
3-2-2-1. L'aromatogramme.....	25
3-2-2-2.L'antibiogramme.....	27
3- 2-3. L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles.....	29
3-2-3-1. Test de DPPH.....	29

4^{ème} chapitre : Résultats et discussion

4. Résultats et discussion.....	31
4-1.Résultats.....	31
4-1-1.L'extraction.....	31
4-1-2. L'activité antibactérienne.....	31
4-1-3. L'activité antioxydante.....	35
4-2. Discussion	37
4-2-1. L'extraction.....	37
4-2-2. L'activité antibactérienne.....	38
4-2-3. L'activité antioxydante.....	40
<i>Conclusion</i>.....	41
<i>Références bibliographiques</i>.....	42
<i>Annexes</i>.....	48

Résumé

Liste des figures :

Figure 01 : La plante de <i>Brachyapium pomelianum</i>	08
Figure 02 : La plante de <i>Sideritis incana</i>	10
Figure 03: Exemples de structures de monoterpènes	11
Figure 04: Exemples de structures de sesquiterpènes	11
Figure 05 : La structure chimiques de certains monoterpènes	12
Figure 06: Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane	12
Figure 07 : Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle	14
Figure 08: Schéma du montage d'extraction assistée par micro-ondes	15
Figure 09: Montage d'hydrodistillation	24
Figure 10 : Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme	26
Figure 11: Les étapes de l'aromatogramme	28
Figure 12: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive	29
Figure 13 : l'aromatogramme de <i>B. pomelianum</i> et l'antibiogramme de <i>S. aureus</i>	33
Figure 14 : L'aromatogramme de <i>B. pomelianum</i> et l'antibiogramme de <i>E. coli</i>	33
Figure 15: L'aromatogramme de <i>B. pomelianum</i> et l'antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i>	33
Figure 16 : L'aromatogramme de <i>B. pomelianum</i> et l'antibiogramme de <i>B. subtilis</i>	34
Figure 17: L'aromatogramme de <i>B. pomelianum</i> et l'antibiogramme de <i>S. epidermidis</i>	34
Figure 18 : L'influence de l'HE de <i>S. incana</i> sur la croissance de <i>B. subtilis</i>	34
Figure 19 : L'influence de l'HE de <i>S. incana</i> sur la croissance de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	34
Figure 20 : l'influence de solvant de DMSO sur la croissance des microorganismes	34
Figure 21: Test de DPPH pour l'HE de l'espèce <i>B. pomelianum</i>	35
Figure 22 : Test de DPPH pour l'acide ascorbique	35
Figure 23: Le pourcentage de réduction du radical DPPH sous l'effet de l'HE de <i>B. pomelianum</i>	36
Figure 24 : Le poucentage de réduction du radical DPPH sous l'effet de l'acide ascorbique	36

Liste des tableaux:

Tableau 01: Familles botaniques productrices des HEs	13
Tableau 02: Matériel végétal, durée et région de récolte	21
Tableau 03: Les souches bactériennes à tester	22
Tableau 04: Liste des antibiotiques utilisées dans l'antibiogramme	23
Tableau 05: Protocole de l'activités antioxydante pour les HEs	30
Tableau 06 : Les caractéristiques organoleptiques et physicochimiques des HEs des deux plantes	31
Tableau 07: Effet des HEs sur la croissance des Bactéries (moyenne \pm SEM)	32
Tableau 08: Les diamètres des zones d'inhibitions en mm pour l'antibiogramme	33

Liste des abréviations :

- **ABTS**•: Acide 2,2'-azinobis-3ethylBenzoThiazoline-6-Sulfonique.
- **Abs**: Absorbance.
- **ATB** : Antibiotique.
- ATCC**: American Type Culture Collection.
- **BHIB**: Brain Heart Infusion Bouillon.
- ***B. pomelianum***: *Brachyapium pomelianum*.
- ***B. subtilus***: *Bacillus subtilus*.
- **CIP**: Centre Institut Pasteur.
- **CG/FID**: Chromatographie de Gaz/ Détecteur à Ionisation Flamme.
- **CG/SM**: Chromatographie Gaz/ Spectrophotométrie de Masse.
- **CMB**: Concentration Minimale Bactéricide.
- **CMI**: Concentration Minimale Inhibitrice.
- **CPG** : Chromatographie en Phase Gaz.
- **DMSO** : DiMéthylSulfOxyde.
- **DO**: Densité Optique.
- **DPPH** : 2,2- DiPhenyl -1-PicrylHydrozyl.
- **Et al.** : Et autres auteurs.
- **ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène.
- **FRAP**: Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter.
- **GN**: Gélose Nutritive.
- **HE** : Huile Essentielle.
- **H₂O₂** : Peroxyde d'hydrogène.
- **I%**: Pourcentage d'inhibition.
- ***L. inocula***: *Listéria inocula*.
- **M.H** : Mueller Hinton.
- **O₂⁻** : Radicale superoxyde.

- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé.
- **ORAC**: Oxygen Radical Absorbance Capacité.
- **PM**: Poids Moléculaire.
- **ppm** : Partie Par Million.
- ***P. aeruginosa***: *Pseudomonas aeruginosa*
- **R_{HE}** : Rendement d' huile essentielle.
- **SARM** : *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méricilline.
- ***S. aureus***: *Staphylococcus aureus*.
- ***S. epidermidis***: *Staphylococcus epidermidis*
- ***S. incana***: *Sideritis incana*.
- **SEM**: Moyenne d'Erreur Standard.
- **TRAP**: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.
- **V/P** : Volume par Poids.
- **V/V**: Volume par Volume.

Introduction

Introduction :

L'utilisation des plantes pour se soigner date de la préhistoire et tous les peuples sur tous les continents ont cette vieille tradition. Malgré les efforts des chimistes de synthèser des nouvelles molécules, plus de 25% des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes (Karou et *al.*, 2005). On estime environ 20000 espèces de plantes utilisées dans le monde à des fins alimentaires, cosmétiques, chimiques, pharmaceutiques, thérapeutiques et agro-alimentaires (Hmamouchi et *al.*, 1999). De plus, dans les pays en développement, les médicaments ne sont pas toujours disponibles, ou, lorsqu'ils le sont, ils coutent trop cher pour les populations, ainsi plus de 80% de ces populations ont recours exclusif aux plantes pour se soigner dans ces pays (Karou et *al.*, 2005).

Les plantes de façon générale et aromatiques en particulier, se caractérisent par deux types de métabolismes. Le métabolisme primaire fournit les constituants de base en quantité élevée. Les plus importants sont les sucres et leurs dérivés, les lipides et les protéines. Le métabolisme secondaire produit des métabolites en faible quantité parmi lesquels, les huiles essentielles (HEs), très utilisées par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Haddouchi et Benmansour, 2008).

Les HEs commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives (Barkat et Laib, 2011). Les activités biologiques de ces huiles et leur arôme et parfum sont connue depuis long temps. Actuellement, environ 3000 HE sont connues, parmi lesquelles 300 sont largement commercialisés. Les HEs possèdent des activités biologiques diverses telle que l'activité antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, antifongique, anticancéreuse, et antioxydante. Par conséquence, l'étude de ces activités devient de plus en plus importante dans ces dernières années dans le but de rechercher une médecine alternative naturelle et sans danger (Shaaban et *al.*, 2012).

Notre travail a été dirigé selon l'axe suivant. Il est réparti en quatre chapitres, initié par une partie de recherche bibliographique où nous apportons dans le 1^{er} chapitre un abrégé sur les plantes médicinales, inclue les plantes qui nous avons sélectionnées (*Brachyapium pomelianum* et *Sideritis incana*). Le 2^{ème} chapitre élucide la composition, les méthodes d'étude et les activités biologiques d'un groupe important des métabolites secondaires produits par ces plantes et qui sont les HEs.

Introduction

La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, 3^{ème} chapitre présente les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir :

- ❖ Extraction des HEs par hydrodistillation;
- ❖ L'aromatogramme de six souches bactériennes de type ATCC et CIP;
- ❖ Estimation au moyen du DPPH de la capacité des HEs à piéger les radicaux libres.

En fin, le 4^{ème} chapitre présente et discute les résultats obtenus dans cette étude.

1. Plantes médicinales

1-1. Généralités sur les plantes médicinales

1-1-1. Définition et importance:

Selon la Pharmacopée française X^{ème} édition (1986) les plantes sont dites médicinales lorsque l'un de leurs organes possède des activités pharmacologiques pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires (Bouzouita *et al.*, 2008).

Bruneton (1999) précise qu'une plante médicinale est tout ce qui est d'origine végétal et utilisable en médecine. Actuellement il y'a environ 500.000 plantes sur terre; 10.000 d'entre elles, possèdent des propriétés médicinales.

Selon les chiffres de l'OMS : en Afrique, jusqu'à 80% de la population utilise la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de soins et de santé (OMS, 2002). Précisément, dans certains pays d'Afrique, les plantes médicinales représentent la seule source de médicaments pour près de 90% de la population. De même, dans de nombreux pays asiatiques la médecine traditionnelle continue d'être largement utilisée, même si l'allopathie est facilement disponible. En Chine, l'utilisation des remèdes traditionnels représente 40% de tous les soins de santé. En même temps, pour certains pays de l'Amérique Latine, il a été rapporté que 71% de la population de Chili et 40% et celle de Colombie ont utilisé la médecine traditionnelle (Anne-Laure, 2002).

1-1-2. Méthodes d'utilisations:

On choisit tout d'abord la partie de la plante que l'on veut utiliser : racines, écorce, bois, feuilles, fleurs, tiges, fruits, semences, bourgeons...etc. Les végétaux peuvent ensuite être transformés en divers produits (Ulvoas, 2002):

- **Alcoolat:** liquide obtenu par distillation de l'alcool sur une plante ou un mélange de plantes;
- **Décoction:** solution obtenue après ébullition prolongée d'une plante;
- **Extrait végétal:** substance obtenue par évaporation partielle d'une plante en solution aqueuse, alcoolique ou étherée;
- **Infusion:** solution obtenue en plongeant quelques minutes la plante dans de l'eau bouillante;
- **Fumigation humide:** vapeur aromatique obtenue après ébullition de plantes mises dans l'eau.
- **Macération:** solution obtenue en traitant pendant un temps plus ou moins long une plante par de l'eau froide, du vin, de l'alcool ou de l'huile.

1-1-3. Principes actifs**1-1-3-1. Définition:**

Le principe actif dans le contexte particulier des « médicaments à base de plantes » désigne des « drogues végétales ou des préparations à base de drogue (s) végétale (s), que les constituants à effet thérapeutique soient connus ou non. » En fait, dans le langage courant, le terme se substitue à celui de constituant à effet thérapeutique (CEDAP, 1996).

1-1-3-2. Les principaux principes actifs de plantes (Métabolites Secondaires):

Chez les plantes, il existe un métabolisme secondaire, c'est une exclusivité du monde végétal. Il donne des produits, à structure chimique souvent complexe, très dispersés et très différents selon les espèces.

Le métabolisme secondaire, désignant un métabolisme dont la distribution taxonomique serait restreinte et dont la contribution au fonctionnement cellulaire ou au développement des plantes serait insignifiante (Bruneton, 1999).

Il pourrait jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement: plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation (Paris et Hurabielle, 1981).

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques. On distingue trois classes principales (Bruneton, 1999) :

- Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante.

L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés à un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthyle, ester, sucre...) (Bruneton, 1999).

Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles présentes dans tous les végétaux. Ils ont divers effets sur la physiologie végétale de part leurs actions antibactériennes et anti-fongiques (Herbert, 1989).

Parmi les composés phénoliques les plus importants on peut citer:

a- Les coumarines:

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus. Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Duraffourd et *al.*, 1990).

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'infections cutanées (Bruneton, 1999).

b- Les tanins:

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (Duraffourd et *al.*, 1990; Bruneton, 1999).

c- Les flavonoïdes:

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes (Bruneton, 1999). De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, antioxydantes et anti-cancéreuses (Bruneton, 1999).

- Les alcaloïdes:

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux. Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes font de ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central ils agissent comme dépresseurs (morphine) ou comme stimulants (caféine), certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux (cocaïne) (Belaiche, 1979).

- Terpénoïdes:

Les terpénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à cinq carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpénoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à dix carbones formées à partir de deux unités isoprènes. Elles regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'HEs, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc (Bruneton, 1999).

1-2. La phytothérapie:

Étymologiquement, phytothérapie vient de deux mots grecs : phyton (plante) et therapeuein (soigner). La phytothérapie consiste donc à soigner avec les plantes (de l'ensemble des éléments de la plante). Ces plantes peuvent être utilisées fraîches ou volontairement séchées (Rwangabo, 1994).

Une citation de Galien dit : « la meilleure médecine, c'est la nature car elle guérit les trois quart de toutes les maladies ». Aujourd'hui, 60 % des spécialités médicamenteuses employées en médecine courante sont issues, directement ou par hémi-synthèse, du règne végétal (Grosmond, 2001).

Il existe de très nombreux sens au mot « phytothérapie », et on retiendra celui d' « une thérapeutique populaire, disponible à tous et qui exploite exclusivement et sous diverses formes (à l'exception des formes sophistiquées élaborées par des firmes pharmaceutiques) des plantes reconnues comme faiblement ou pas toxiques, grâce à une sélection rigoureuse et attentive opérée à travers l'histoire, dans le traitement des maladies » (Rwangabo, 1994).

1-3. La phytochimie:

La phytochimie est l'étude de la structure et des propriétés des constituants des plantes. Elle est fondamentale pour comprendre les propriétés thérapeutiques attribuées aux plantes médicinales, ainsi que pour prévoir les activités pharmaceutiques, pharmacocinétiques et de biodisponibilité de celles-ci (Jaussaud, 1992; Bruneton, 1999; Gibellin, 2003).

1-4. L'aromathérapie:

L'aromathérapie (étymologie : du grec « arôma » arôme et « therapeia » soin, cure) est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes (essences et huiles essentielles).

L'aromathérapie, l'art de soigner par les HEs, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries. Il y a une vingtaine d'années, les docteurs Maurice Girault et Paul Belaïche ont mis au point l'aromatogramme, méthode comparable à l'antibiogramme, qui permet de déceler quelles sont les HEs les plus efficaces sur un germe donné (Larousse encyclopédie des plantes médicinales, 2001).

1-5. Les plantes à tester**1-5-1. *Brachyapium pomelianum*****1-5-1-1. Description botanique:****- Les *Apiaceae* (*Ombellifères*):**

Vaste famille se compose de plus de 3000 espèces, plantes complexes herbacées annuelles, bisannuelles et vivaces, parfois arbustes, à feuilles alternes, souvent grandes et pennatifides, parfois simples, à base engainante élargie. Fleurs en ombelles caractéristiques, généralement composées, l'ombelle primaire avec ou sans bractées, chaque branche ou rayon portant une ombelle secondaire (ombellule) avec ou sans bractées secondaires (bractéoles). Elles sont souvent petites, à cinq parties, généralement hermaphrodites; calice à cinq dents, ordinairement insignifiant, parfois absent; pétales libres, souvent échancrés, à extrémité incurvée, tout de même taille ou nettement irréguliers de telle sorte que les fleurs externes d'une ombelle peuvent avoir des pétales externes nettement plus grandes. deux carpelles soudés le long d'un axe central, terminé chacun par un style, de section aplatie ou arrondie, souvent ailés ou côtelés et à canaux résinifères entre les deux parties. Les caractéristiques du fruit sont souvent déterminantes pour identifier les genres, ainsi que les espèces proches; fleurs et fruits fréquemment présents simultanément sur la plante (Blamey et Grey-Wilson, 1993).

Les principaux métabolites secondaires qui caractérisent cette famille sont les HEs et les coumarines. Cette famille trouve leurs applications dans la médecine populaire ou dans la médecine moderne. Certaines espèces ont été utilisées comme toniques, diurétiques et stimulants cardiovasculaires, etc. (Djarri, 2011).

- *Brachyapium*:

Plante annuelle dichotome rameuse dès la base. Feuilles deux-trois pennatiséquées à segments lancéolés-linéaires. Involucre et involucelle nuls. Fruits globuleux pas plus longs que larges de un mm environ, hispides et couverts de poils capités très courts (loupe), globuleux, très petits à un mm (Quezel et Santa, 1963). Ce genre comprend deux espèces : *B. dichotomum* et *B. pomelianum*, ce dernier représente l'espèce que nous avons choisie.

- *B. pomelianum*:

C'est une plante odorante. Fruits à pédicelles lisses, feuilles scabres seulement sur leur portion terminale, fleurs blanches pelouses (Figure 01). Elle se développe principalement dans les forêts et surtout sur les confins marocains. *Endémique en Maroc et Oran*. Cette espèce connue sous plusieurs noms tel que *Trachyspermum dichotoma* Pomel non L. et *Trachyspermum Pomelianum* Maire (Quezel et Santa, 1963).



Figure 01: La plante de *Brachyapium pomelianum*

1-5-1-2. Taxonomie:

Règne: Plante

Division: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Apiales

Famille: Apiaceae

Genre: *Brachyapium*

Espèce: *Brachyapium pomelianum*

Synonyme: *Stoibrax pomelianum* (Bull.1932.)

Nom botanique: Baillon (Maire)

1-5-2. *Sideritis incana***1-5-2-1. Description botanique:****- Les *Lamiaceae* (*Labiacée*):**

Les *Labiacée* sont des plantes herbacées ou arbrisseaux à nombreuses glandes aromatiques; tiges quadrangulaires, feuilles opposées, en général simples. Fleurs irrégulières (zygomorphes), en bouquets axillaires étagés, formant souvent des verticilles autour de la tige; calice à cinq dents, parfois bilabié, corolle bilabiée, sauf chez l'*Ajuga* et *Teucrium*, la lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. Etamines, quatre (deux chez *Salvia*). Fruit, quatre akènes insérés à la base du calice persistant (Blamey et Grey-Wilson, 1993).

-*Sideritis*:

Plante annuelle ou bisannuel à racine très grêle, florifère en général dès la base. Arbustes ou sous-arbrisseaux, inflorescences terminales. Feuilles à marge entière et distinctement dentée, au moins sur les inférieures, à tiges ligneuses, épaisses, hauts de 20-40 cm. Plantes glabres ou glabrescentes, sauf dans l'inflorescence. Et de bractées florales nulles dans les verticillastres. Calice à cinq dents droites épineuses presque aussi longues que le tube (Quezel et Santa, 1963). Le nom de ce genre est dérivé du mot grec 'sideros' (iron), connue sous le nom de " thé de montagne". Se développe dans les hautes altitudes (d'habitude plus de 1000 m), et souvent se développe sur la surface des roches (Lindqvist et Victor, 2002).

Sideritis considérée parmi les plantes les plus connues et les plus diverses dans le monde. Elle existe dans toutes les altitudes et les habitats, dans le pôle Nord de Himalaya, le Nord est de Asie à Hawaï, l'Australie, l'Afrique et l'Amérique. Mais, le principale habitat est le bassin méditerranée de plus de 150 espèces (Esra et *al.*, 2009). Les études phytochimiques ont montré que les principaux constituants chimiques de cette espèce sont les terpènes, stérols, coumarines, flavonoïdes, aglycones et glycosides (Hisil et Pazir).

- *Sideritis incana*:

Sideritis incana est une plante à tiges et feuilles au moins en partie canescentes tomenteuses. Epis denses à verticillastres en général rapprochés. Calice tomenteux ou simplement hispide atteignant 8-10 mm. Fleurs jaunes à gorge rose (Figure 02). Pelouses arides, rocailles: se développe partout sauf dans le Tell algéro-constantinois. C'est une plante extrêmement polymorphe et porté plusieurs nom à savoir: incl. *Sideritis guyoniana* Boiss. et Reut., *Sideritis atlantica* Pomel, *Sideritis pycnostachys* Pomel. (Quezel et Santa, 1963).



Figure 02: La plante de *Sideritis incana*

1-5-2-2. Taxonomie:

Règne: Plante

Division: Angiosperme

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Genre : *Sideritis*

Espèce: *Sideritis incana*

1-5-2-3. Utilisations thérapeutiques:

les espèces de *Sideritis* ont été utilisées traditionnellement comme tisane (thé), agent d'arôme et dans la médecine comme des anti-inflammatoires, antiulcéreux, antimicrobiens, antioxydantes, antispasmodiques, analgésiques et agents carminatives (González-Burgos *et al.*, 2011). La partie aérienne sèche des espèces de *Sideritis* a été utilisée par l'infusion et/ou la décoction pour le traitement de dyspepsie, l'anémie, l'influenza et la fièvre. Elle est utilisée aussi comme diurétique (Koutsaviti, 2013).

2. Généralités sur les huiles essentielles

2-1. Définition des huiles essentielles:

Les HEs sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans des poches au niveau de certains organes (Duquenois, 1968).

Selon la X^{ème} édition de la pharmacopée française (1986), les HEs (essences ou huiles volatiles) sont: des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenu dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (Bruneton, 1999). Les HEs ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie: l'aromathérapie (Bruneton, 1999).

2-2. Les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles:

On trouve généralement les HEs incolores ou jaune pâle à l'état liquide à température ordinaire. Toutes les HEs sont volatiles, odorantes et inflammables (Duraffourd et *al.*, 1990). Leur densité est le plus souvent inférieure à 1. Seules trois HEs officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau, ce sont les HEs de cannelle "*Cinnamomum zeylanicum*" (1,052-1,070), de girofle "*Syzygium aromaticum*" (1,044-1,057) et de saffran "*Sassafras albidum*" (Bruneton, 1999).

Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont altérables et très sensibles à l'oxydation (Sallé, 2004).

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice d'ester, de réfraction...) est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les HEs. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques CG/SM et CG/FID, ces deux derniers, souvent utilisées comme moyens analytiques complémentaires pour l'analyse structurale des substances volatiles (Fellah et *al.*, 2006).

2-3. La composition chimique des huiles essentielles:

Les HEs sont des métabolites secondaires des plantes. elles sont d'une composition assez complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents (Bruneton, 1999; Sell, 2006). On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

2-3-1. Les composés terpéniques:

Les composés chimiques des HEs sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit les monoterpènes (myrcène, β -pinène, γ -terpinène, etc.) et soit les sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, β -bisabolène, etc.) et sont responsables des saveurs caractéristiques et de l'arôme que possède la plante (Belaiche, 1979; Loza-Tavera, 1999).

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités isopréniques C_5H_8 , soit deux unités pour les monoterpènes $C_{10}H_{16}$ (Figure 03) et trois pour les sesquiterpènes $C_{15}H_{24}$ (Figure 04). Exceptionnellement, quelques diterpènes $C_{20}H_{32}$ peuvent se retrouver dans les HEs (Sallé, 2004).

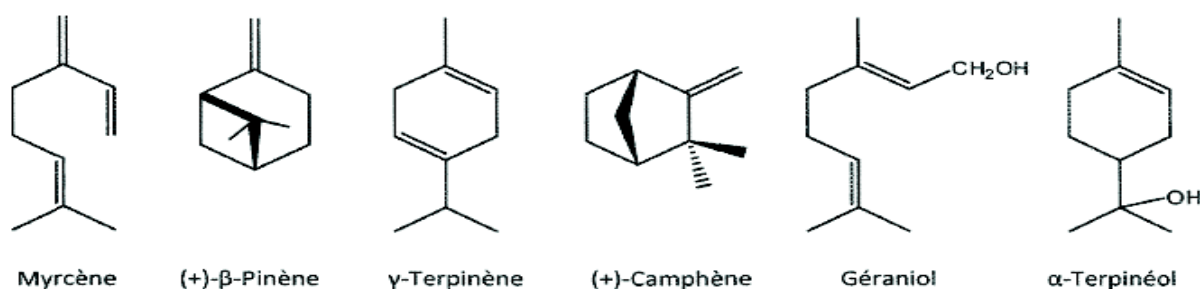


Figure 03: Exemples de structures de monoterpènes (Modzelewska *et al.*, 2005)

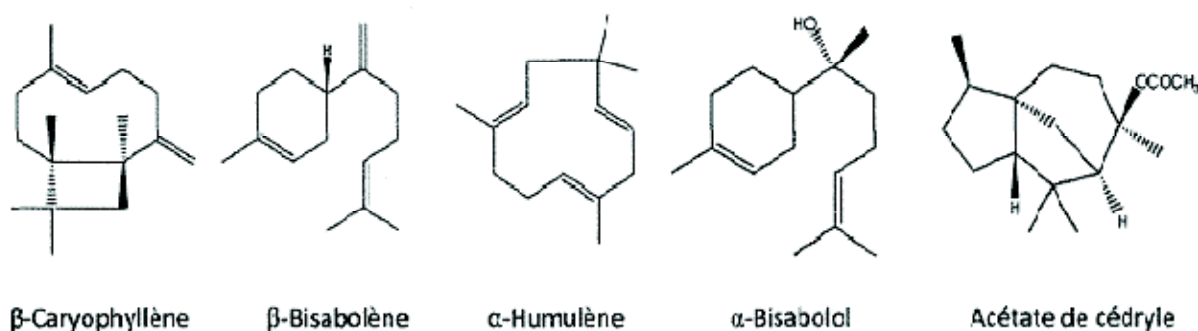


Figure 04: Exemples de structures de sesquiterpènes (Modzelewska *et al.*, 2005)

La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α -bisabolol), des cétones (menthone, β -vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate d' α -terpinyle, acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc. (Modzelewska *et al.*, 2005). Il peut exister une grande variété dans la structure des monoterpènes constituant les HEs, ils peuvent être cyclique ou acyclique (Figure 05).

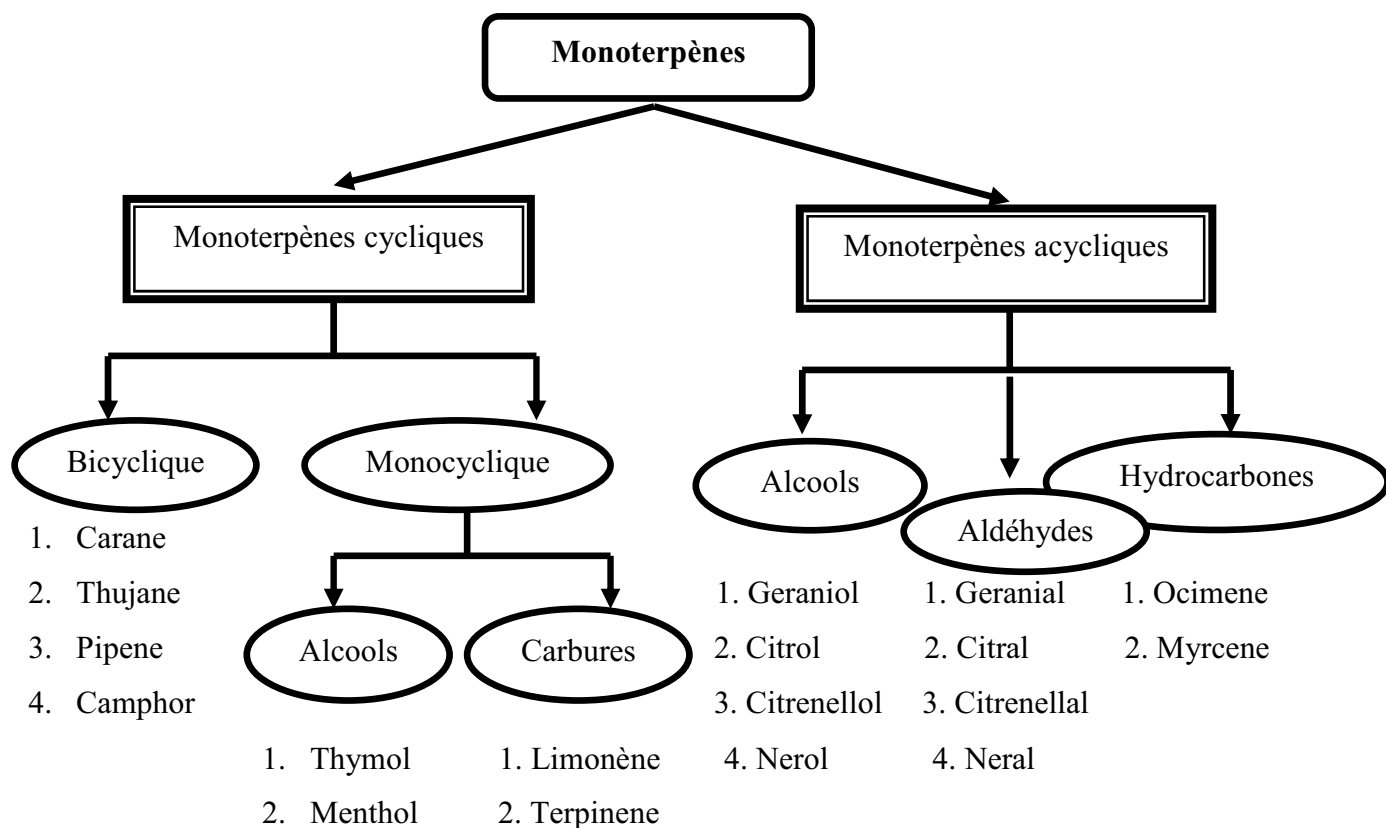


Figure 05: La structure chimique de certains monoterpènes

2-3-2. Les composés aromatiques:

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés dans les HEs est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Duraffourd et *al.*, 1990; Bruneton, 1999). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres (Figure 06). Ils sont davantage fréquents dans les HEs d'Apiaceae (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc. (Bruneton, 1999).

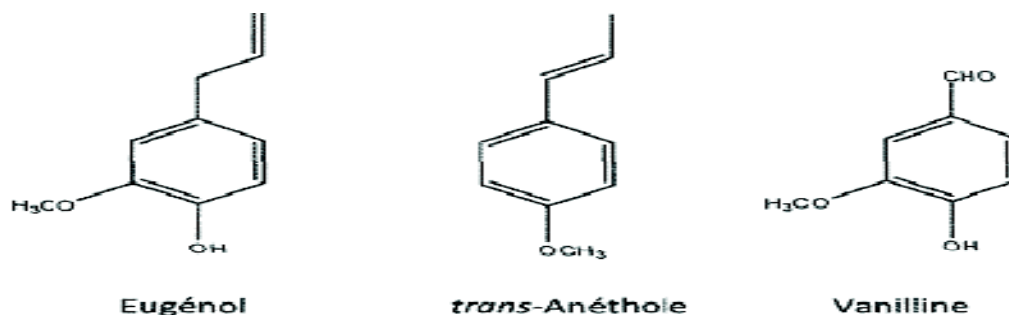


Figure 06: Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (exemple : *Thymus* à thymol, à geraniol, à carvacrol, à linalol), et parmi les nombreux constituants d'une HE, l'un domine généralement; On l'appelle composé majoritaire (Cosentino et *al.*, 1999).

2-4. Répartition botanique:

Les HEs sont largement réparties dans le règne végétal. Elles sont trouvées en quantité appréciable chez environ 2000 espèces de plantes réparties dans 60 familles (Paris et Hurabielle, 1981; Marouf, 2000). Certaines familles en sont particulièrement riches (Tableau 01): Conifères, Myrtacées, Ombellifères, Labiées, Composées (Boulos, 1983). Elles peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux : sommités fleuries, écorce, racines, rhizomes, fruit, bois,...etc. Dans une même plante, elles peuvent être présentes dans différents organes. La composition des HEs peut alors varier d'un organe à l'autre (Paris et Hurabielle, 1981).

Tableau01:Familles botaniques productrices des HEs (Boulos, 1983).

Labiée	Lavande, Thym, Sarriette, Sauge, Menthe,....
Ombellifère	Cumin, Carvi, Anis vert, Fenouil, Aneth,....
Myrtacée	Eucalyptus, Cajeput, Niaouli, Girofle,....
Conifère	Pin, Cèdre, Cyprès, Genévrier, Cade,....
Rutacée (agrumes)	Citron, Orange, Bergamote, Com bava,...
Lauracée	Cannelle, Sassafras, Laurier,.....
Composée ou Astéragée	20'000 espèces dont Armoise, Camomille, Estragon,....

2-5. Les méthodes d'étude**2-5-1. Les méthodes d'extraction:**

L'extraction des HEs est certainement la phase la plus délicate et la plus importante du processus. Elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal. De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction de ces substances (Sallé, 2004).

Le choix d'une méthode d'extraction doit être minutieux, il faut choisir la méthode la plus efficace qui donnerait une huile d'une très bonne qualité, un rendement élevé avec un coût économique faible. En ce qui concerne la qualité, l'HE qu'on doit obtenir doit être limpide, concentré, d'odeur caractéristique du fruit utilisé, et ne contient aucune trace de solvant (Bruneton, 1999).

2-5-1-1. L'enfleurage et la macération:

Cette technique, la plus ancienne, très coûteuse et peu employée aujourd'hui. On l'emploie pour des fleurs sensibles, ne supportant pas un chauffage trop élevé, comme par exemple le jasmin, la violette et la rose. Les fleurs sont mises dans des graisses ou des huiles et chauffées (bain-marie ou soleil) et étalées sur des châssis en bois pendant plusieurs jours. Une fois gorgés de parfum, les corps gras sont filtrés au travers de tissus de lin ou de coton. Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées (Paris et Hurabielle, 1981; Bruneton, 1999).

2-5-1-2. L'expression:

Considéré parmi les premiers procédés d'extraction c'est une technique simple où les écorces des agrumes sont pressées à froid pour extraire leur essence. L'extraction des HEs par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de citrus, ne nécessite pas l'intervention de l'eau comme les autres procédés d'extractions (Paris et Hurabielle, 1981; Bruneton, 1999).

2-5-1-3. La distillation:

La distillation constitue le procédé d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques le plus ancien, apporté par les Arabes au IX^{ème} siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic (Bruneton, 1999). Il existe deux différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau.

-Hydrodistillation:

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition (la chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales). Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité (Figure 07). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules (Bruneton, 1999; Sallé, 2004).

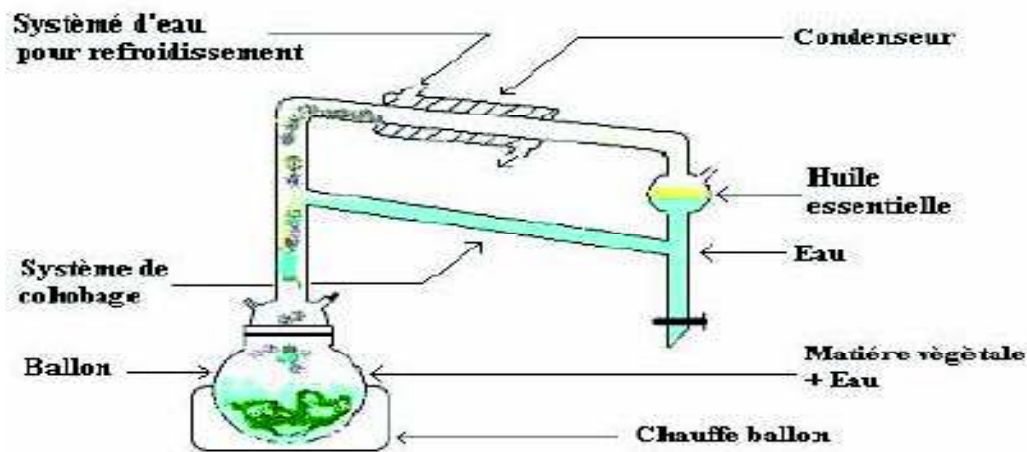


Figure 07: Appareillage utilisé pendant l'hydrodistillation d'huile essentielle (Sallé, 2004)

-Entraînement à la vapeur d'eau:

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite

entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'HE en minimisant les altérations hydrolytiques (Bruneton, 1999; Sallé, 2004).

2-5-1-4. L'extraction par les solvants organiques:

Certains procédés d'extraction ne permettent pas d'obtenir des HEs proprement parler mais des concrètes. Il s'agit d'extraits de plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers sont des solvants usuels utilisés en chimie organique (hexane, éther de pétrole). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres (Richard, 1992; Bruneton, 1999; Sallé, 2004). Elle pose aussi un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutique et agro-alimentaire (Bruneton, 1999).

2-5-1-5. L'extraction assistée par micro-ondes:

C'est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle, les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissent, et décantation (Figure 08). Des études démontrant que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (Scheffer, 1996; Hemwimon et *al.*, 2007).

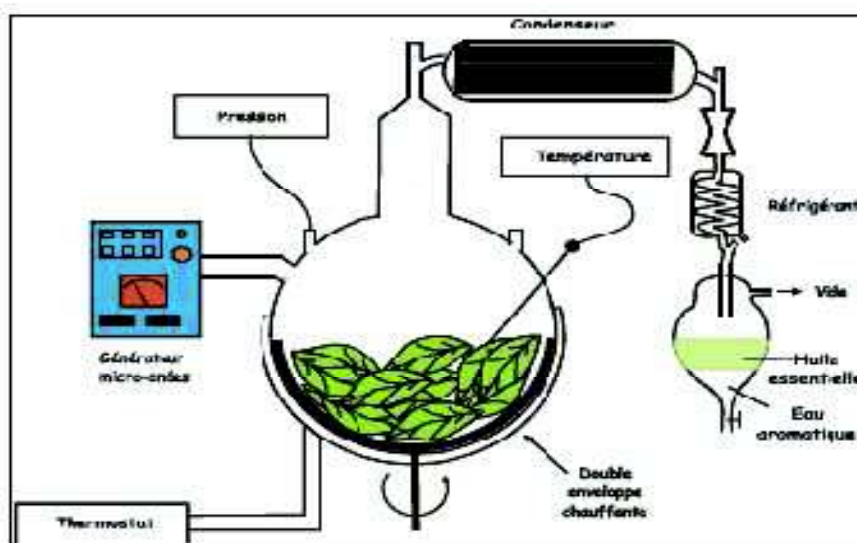


Figure 8: schéma du montage d'extraction assistée par micro-ondes (Lucchesi, 2005)

2-5-1-6. L'extraction par fluides supercritiques:

Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits volatils de très haute qualité avec rapidité, simplicité et ne consomme pas une grande quantité de solvants organiques. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction. Toutefois cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du CO₂ supercritique qui le solvant d'extraction le plus employé. Le CO₂ possède les propriétés intermédiaires entre celle des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (Scheffer, 1996; Bruneton, 1999).

2-5-2. Les méthodes d'analyses:

Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants.

La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des HES. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative et qualitative à partir d'un volume d'injection réduit. Un appareil de CPG comporte trois parties (Djarri, 2011) : un injecteur; une colonne; et un détecteur.

A travers lesquelles un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer. Le gaz vecteur le plus utilisé est l'hélium, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne pas contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur.

2-5-2-1. Chromatographie en phase gaz couplé à spectrophotométrie de masse:

Le couplage CPG/SM est aujourd'hui une des techniques les plus utilisées de la chimie analytique. L'association de deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant.

La principale difficulté rencontrée lors de ce couplage est due à la grande différence de pression. En effet, la SM requiert un niveau de pression très bas, alors que la CPG se déroule à un niveau de pression plus élevée (Croteau et Roland, 1983; Bruneton, 1999).

2-5-2-2. Chromatographie en phase gaz bidimensionnelle:

La chromatographie bidimensionnelle consiste à coupler deux colonnes de polarités différentes pour avoir une séparation parfaite. Cette méthode est appliquée aux mélanges complexes présentant de nombreuses co élutions. Parmi les méthodes de chromatographie à deux dimensions, on distingue la méthode dite par piégeage « heart-cutting », notée CPG*CPG (Dunn et al., 2004), de la chromatographie totale, notée GC×GC (Dugo et al., 2005).

2-6. Les utilisations des huiles essentielles:

L'intérêt pour les HEs s'est accru, et la demande est de plus en plus forte tant pour l'enseignement de l'aromathérapie que pour les traitements (Bremness, 1998). Beaucoup d'entre elles sont utilisées pour assaisonner et aromatiser les aliments. Elles ont aussi une grande importance économique comme saveurs, parfums et solvants (Loza-Tavera, 1999).

Actuellement, près de 2000 HEs font l'objet d'importantes transcriptions commerciales internationales (Delaveau, 1982).

D'après Carette (2000), la phytothérapie et l'aromathérapie sont complémentaires. Les HEs sont employées en aromathérapie pour les cas aigus, alors que la phytothérapie est plus adaptée aux cas chroniques.

2-7. La toxicité des huiles essentielles:

Par leur composition chimique riche, les HEs doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres: absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaïs, aneth, rue, anis, carvi, romarin (Bernadet, 2000). D'autres sont à éviter durant la grossesse, d'hypertension ou d'affections dermatologiques (Bremness, 1998).

Cet aspect de la connaissance des HEs est d'autant plus important que le développement de pratiques telles que l'aromathérapie et autres, conduisent à une utilisation souvent abusive. L'automédication est dangereuse, souvent favorisée par le fait que bon nombre de ces produits sont distribués en dehors du secteur pharmaceutique (Bruneton, 1999).

En règle générale, les HEs ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible. Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (Bruneton, 1999). Reste à savoir que dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits (Bernadet, 2000).

Les HEs peuvent provoquer: agitation, tremblements généralisés, coma, néphrite aiguë, congestion cérébrale et pulmonaire, dépression du tonus sympathique, spasmes musculaires etc. Dans certains cas la neurotoxicité de quelques huiles peut nécessiter l'hospitalisation (Bruneton, 1999). Certaines huiles sont capables d'induire l'apparition de cancers grâce à la présence de constituants "allyles propénylphénols" (Bruneton, 1999).

2-8. Les activités biologiques des huiles essentielles:

Les HEs des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leur large spectre d'activités biologiques reconnues (Amarti et *al.*, 2010).

Les HEs sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés anti-toxiques, antivenimeuses, antivirales, antioxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Bruneton, 1999; Valent, 2005; Haddouchi et Benmansour, 2008). Dans ce travail on ne étudiées que de l'activité antioxydantes et antibactériennes des HEs.

2-8-1. L'activité antioxydante:

L'activité antioxydante des HEs consiste le sujet d'étude et de recherche le plus intensif car les dommages de l'oxydation de différentes substances biologiques provoquent plusieurs pathologies, parmi lesquelles le cancer, la maladie du foie, les inflammations, diabète, maladie de Parkinson, l'Alzheimer et l'athérosclérose. En effet, plusieurs maladies sont traitées par les antioxydants pour empêcher les dommages de l'oxydation. Récemment, plusieurs recherches ont mis en jeu l'activité antioxydante de différents HEs dans le cadre de chercher des antioxydants naturels (Shaaban et *al.*, 2012).

2-8-1-1. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?

L'oxygène (ou O₂) est un gaz indispensable à la vie. A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, l'O₂ est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie. Au cours de l'évolution, l'adaptation des espèces vivantes à l'O₂ s'est traduite par l'apparition d'enzymes facilitant non seulement sa consommation, mais également la détoxification de ses métabolites réduits qui sont le O₂⁻ et H₂O₂. ces espèces sont appelée espèces réactives de l'oxygène (ERO) car elles sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'O₂ lui-même. Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'O₂ et de ses métabolites est à l'origine des phénomènes de stress oxydant dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

Les EROs sont responsable, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acide nucléiques, protéines, lipides..), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires. Les EROs 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 (Gardès-Albert et *al.*, 2003). Donc la supplémentation de l'organisme par des antioxydants exogènes s'avère très utile pour lutter contre ces espèces nocives.

2-8-1-2. L'activité antioxydante des huiles essentielles:

Les nombreuses propriétés naturelles des HEs en font des agents de conservation très prometteurs pour l'industrie alimentaire. Le recours aux HEs s'avère être un choix pertinent face à un risque de l'oxydation ou à la nécessité de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques (Barkat et Laib, 2011).

De nombreux travaux sur les activités antioxydantes des HEs d'une grande variété de plantes aromatiques montrent que ces propriétés sont en relation avec la composition chimique, Shahidi et *al.*, 1992. ont rapporté que les activités antioxydantes sont dues à la présence de composés qui comportent le groupement hydroxyle. Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'HEs. Le rôle principal de ces composés comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports (Villano et *al.*, 2007).

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HEs qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (Lu et Foo, 2001; Sing et *al.*, 2006).

2-8-2. L'activité antibactérienne:

Dès la naissance l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutané-muqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer trois groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997).

2-8-2-1: La toxicité des antibiotiques:

En médecine, les antibiotiques sont largement utilisée pour le traitement de différents infections bactériennes et en plus de son action sur les bactéries, un antibiotique peut exercer des effets néfastes sur les cellules eucaryotes. Cette toxicité se manifeste la plupart du temps quand la dose administrée est trop élevée ou lorsque le traitement est de longue durée. Il faut noter que les troubles toxiques causés par les antibiotiques sont différents d'une famille à l'autre, et même dans une famille il y a des discordances entre les antibiotiques, il peut y avoir une molécule très toxique et l'autre dépourvue de toxicité ou peu toxique (Berche et *al.*, 1989).

Utilisations des antibiotiques présente actuellement plusieurs obstacles qui sont : la résistance, la multi résistance et la toxicité; ce qui a poussé un grand nombre de gens à fuir ces traitements pour se diriger vers la médecine douce ou médecine naturelle "moderne" avec ses différentes disciplines: *phytothérapie*, *aromathérapie*, basée sur les connaissances antiques et leurs

applications scientifiques rigoureuses, *in vitro* et même *in vivo*; qui s'est montrée aussi efficace que les remèdes chimiques et moins nuisibles et pour la plupart des cas, sans danger.

2-8-2-2. L'activité antibactérienne des huiles essentielles:

Les HEs sont reconnues par leurs composants naturels, comme les monoterpènes, diterpènes et les hydrocarbures avec des groupes fonctionnels divers. Dans les années 1990, Muanza et ses collaborateurs ont recherché des extraits de plantes potentiellement bioactifs contre les bactéries et les moisissures (Muanza et *al.*, 1994). Depuis, beaucoup d'autres chercheurs ont rapporté l'effet antimicrobien (Sivropoulou et *al.*, 1997; Cowan, 1999; Mau, et *al.*, 2001; Hoffman et *al.*, 2004). des HEs dans l'application agroalimentaire, la recherche pharmaceutique et dans d'autres domaines. En 1977 Cowan a été signalé que 60% des dérivés des HEs examinés jusqu'au 1999 sont inhibiteurs de mycètes tandis que 30% inhibent les bactéries.

L'activité antimicrobienne des HEs est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs (Ettayebi et *al.*, 2000). Parmi ces composés qui sont souvent cités comme responsable des ces propriétés HEs sont : le thymol, le carvacrol, le cinnamaldéhyde, l'eugénol, le 1,8-cinéole, le camphre et les thujones (Hubert, 2008). En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des HEs se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leur composés majoritaires :

Phénol > alcool > aldéhyde > cétone > oxyde > hydrocarbures > esters (Lee et *al.*, 1971; Franchomme, 1981).

In vitro, l'effet microbicide de certaines HEs a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques (Valnet et *al.*, 1978; Guesmia, 2002). De plus, elles ont un champ d'action très large. Les mécanismes d'action antibactérienne des HEs sont relativement bien connus. Une des possibilités d'action est la génération de lésions irréversibles sur la membrane des cellules bactériennes qui induisent des pertes de matière (cytoplasmique), pertes de sel, perte de substrats énergétiques (glucose, ATP), amenant directement à la lyse de la bactérie (cytolyse) et donc à sa mort (Djarri, 2011).

Les HEs peuvent être agissant de façon bactériostatique ou bactéricide, alors on peut distinguer :

- **La CMI** : est définie comme étant la plus basse concentration capable d'empêcher une croissance bactérienne visible. La CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur (Mann et Markham, 1998).
- **La CMB** : est la plus petite concentration de l'agent inhibiteur ne laissant subsister que 0,01% ou moins de survivant de l'inoculum initial après 18 heures de culture à 37°C. cette valeur caractérise l'effet bactéricide de l'HE (Haddouchi et *al.*, 2009).

3. Matériel et méthodes

3-1. Matériel

3- 1-1. Matériel biologique

3-1-1-1. Matériel végétal:

Notre étude est réalisée sur deux plantes aromatiques d'origines différentes (Tableau 02). Les plantes récoltées sont séchées à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant une semaine.

Tableau 02: Matériel végétal, durée et région de récolte.

Espèce	Durée de récolte	La région
<i>Brachyapium pomelianum</i>	Mai 2011, Mai 2013	Dar alchieukhe (Djelfa)
<i>Sideritis incana</i>	Mai 2011	Boussaâda (M'sila)

3-1-1-2- Les souches bactériennes:

Le choix des bactéries à été porté sur six souches fréquentes en pathogène humaine (Tableau 03), ces espèces constituant un problème major de santé publique, et par leur résistance naturelle à divers agents antimicrobiens (plus des informations sur les souches utilisés voir l'annexe 02). Nous avons sélectionné les bactéries suivants :

Tableau 03: Les souches bactériennes à tester.

Souche	Forme	Gram	Code
<i>E. coli</i>	Bacille	(-)	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille	(-)	ATCC 27853
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacille sporulé	(+)	ATCC 6633
<i>Lesteria inocula</i>	Bacille	(+)	CIP 74915
<i>Staphylococcus aureus</i> SARM	Cocci	(+)	ATCC 43300
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cocci	(+)	ATCC 25923

Les souches bactériennes sont sous forme des lots ATCC (American Type Culture Collection) et une souche de type CIP (Centre Institut Pasteur d'Algérie). Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance, et incubées dans l'étuve pendant 24 heures à 37°C pour obtenir des cultures jeunes.

3-1-1-3. Les milieux de cultures:

Selon les méthodes employées, et selon les souches, nous avons utilisé les milieux de cultures suivants (l'origine de ces milieux est l'Institut Pasteur, Alger):

La composition chimique des milieux de cultures utilisés est donné dans l'annexe 01.

- Gélose nutritive (GN);
- Mueller Hinton (MH);
- Gélose de CHAPMAN;
- Milieu liquide BHIB;
- Bouillon nutritive liquide.

3-1-2. Matériel chimiques

3-1-2-1. Les antibiotiques utilisés:

Les antibiotiques qui nous allons testé sont sélectionné aléatoirement et sont appartient à plusieurs familles (Tableau 04) :

Tableau 04: Liste des antibiotiques utilisées dans l'antibiogramme.

Les souches	Antibiotique 1	Antibiotique 2	Antibiotique 3	Antibiotique 4
<i>Pseudomonas</i> <i>E. coli</i>	Céfazoline (CZ : 30µg)	Colistine (CT: 10µg)	Acide nalidixique (NA: 30µg)	Amoxicilline +A.clavalanique (AMC : 20µg/ 10µg)
<i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	Pénicilline (P: 10µI)	Erythromycine (E: 15µg)	Ofloxacine (OFX :5µg)	Acide fusidique (FA: 10µg)
<i>B. subtilus</i> <i>L. inocula</i>	Nitroxoline (NTX : 30µg)	Ciprofloxacine (CIP :5µg)	Ofloxacine (OFX :5µg)	Gentamicin (CN : 120µg)

3-1-2-2. Les solvants organiques:

- DMSO :

Le DMSO est utilisé pour la dissolution des HEs lors de la réalisation de l'aromatogramme. C'est un solvant organique polaire (organosulfuré), de formule brute C₂H₆OS. Il se présente comme un liquide incolore, qui dissout à la fois des composés polaires et non-polaires, et qui est miscible dans une large gamme de solvant.

- Méthanol:

pour la solubilisation de DPPH, l'acide ascorbique et l'HE de *B. pomelianum* pour la réalisation de l'activité antioxydante.

3-1-2-3. L'antioxydant témoin:

-L'acide ascorbique:

l'acide ascorbique ou encours appelé la vitamine C, est utilisé comme agent antioxydant de référence dans le but de comparer avec notre huile.

La vitamine C est une poudre cristalline blanche de formule brute C₆H₈O₆. soluble dans l'eau, plus difficilement dans l'alcool et pas du tout dans l'éther ou le chloroforme.

3-2. Méthodes**3- 2-1. L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation:**

Le matériel végétal est coupé en parties très fines et soumises à l'hydrodistillation pendant trois heures en se servant du dispositif d'extraction type Clevenger (Figure 09).

L'hydrodistillation se base sur le pouvoir qui possède la vapeur d'eau à transporter les HE. L'opération consiste à immerger une quantité de la masse végétale dans un grand ballon en verre (6 litres) contenant une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir complètement le ballon pour éviter les débordements au cour de l'ébullition. Le mélange est porté à l'ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées de l'HE passant à travers le tube vertical, puis à travers le réfrigérant où aura lieu de condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli au préalable d'eau distillée. La vapeur condensée obtenue conduit à la formation de deux phases :

- **phase organique** sous forme d'une huile légèrement colorée et d'odeur assez forte.
- **phase aqueuse** (eaux aromatiques ou hydrolat aromatique) contient une quantité non négligeable d'huile soit sous forme solubilisée, soit sous forme de fines gouttelettes dispersées.

L'HE obtenue est conservée au réfrigérateur dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement à 4 °C et à l'ombre.



Figure 09: L'appareil d'hydrodistillation

3-2-1-1. Calcul de rendements:

Les rendement d'extraction des HEs (R_{HE}), sont calculées de la manière suivante (Fellah et *al.*, 2006):

$$R_{HE} = \frac{\text{Masse des HEs (phase organique)}}{\text{Masse initiale de la matière végétale sèche}} \times 100$$

3-2-1-2. Mesure de la densité :

La densité relative de l'HE est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C (AFNOR, 1992).

3-2-2. L'évaluation de l'activité antibactérienne:

L'examen des données bibliographiques fait apparaitre la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HEs. Le choix de la méthode est conditionné par insolubilité des HEs dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations. la technique qui on utilise est :

3-2-2-1. L'aromatogramme:

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utilisée des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après l'incubation à 37°C, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatiques de l'HE sur le germe testé, et donc d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles testées. On peut exprimer cette activité en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre (Belaiche,1979; Grosmond, 2001).

Protocole expérimentale:**-Préparation de l'inoculum:****✓ Préparation de pré-culture:**

Les tests antibactériens doivent être réalisés sur des cultures jeunes de (18 à 48 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuées par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (BHIB) ou bouillon nutritive liquide. Après

l'incubation pendant 24 heures à 37°C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de pétri contenant de la GN solide, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

✓ Préparation de la suspension bactérienne:

A partir des cultures jeunes sur la GN. On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 10ml d'eau physiologique stérile (la suspension d'inoculum est diluée à 1/10 pour avoir une concentration de 10^6 germes/ml). on agite au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/ml, est réalisée par le paramètre de 0.5 Mac Farland préalablement préparée (l'annexe 03). Selon Mac Farland, on admet une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml.

- Etude de l'activité antibactérienne des HEs *in vitro*:

Pour évaluer l'activité antibactérienne des HEs, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stérile en papier de chromatographie de diamètre 6 mm. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible (Figure 10). L'effet de produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure de la zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

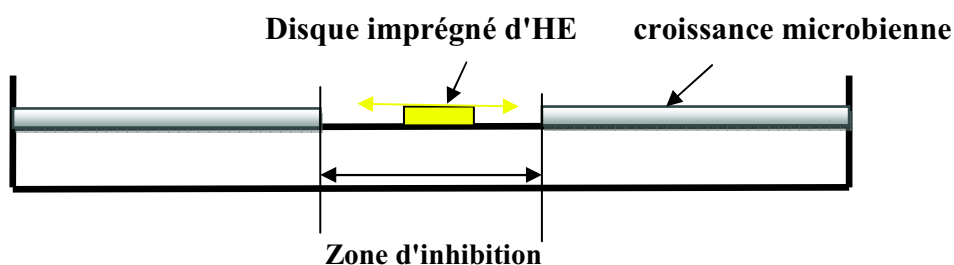


Figure 10: schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme

-Ensemencement de milieu:

Couler aseptiquement le milieu de culture gélosé M.H en surfusion dans des boîtes de pétri à raison de 20 ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier sur la paille, 1ml de chaque suspension de culture bactérienne de concentration environ (10^6 UFC/ml) est préparé à partir d'une culture de 18-24 heures, et ensuite étalé à la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'un râteau ou un écouvillons.

- Dépôt des disques:

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de papier en chromatographie stérile (6mm) et l'imbiber avec l'HE à tester de différents dilution (1/2, 1/5, 1/10) en mettant seulement en contact le bout du disque; celui-ci va absorber progressivement l'HE dilué dans le DMSO jusqu'à l'imprégnation totale du disque (10µl), puis déposer sur la gélose. Les boîtes de pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 min et mise à l'étuve à la température de 37°C pendant 24h. Dans des boîtes de contrôle, les disques sont trempés dans le DMSO. L'expérience est répétée trois fois pour chaque dilution d'HE.

3-2-2-2 : L'antibiogramme:

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de nos HEs. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés l'HE.

-Lecture:

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle en (mm). Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HEs (Ponce et *al.*, 2003).

- **Non sensible (-) ou résistante** : diamètre < 8 mm

- **Sensible (+)** : diamètre comprise entre 9-14 mm.

- **Très sensible (++)** : diamètre comprise entre 15-19mm.

- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre > 20 mm.

Les étapes de l'antibiogramme sont résumé dans la figure 11.

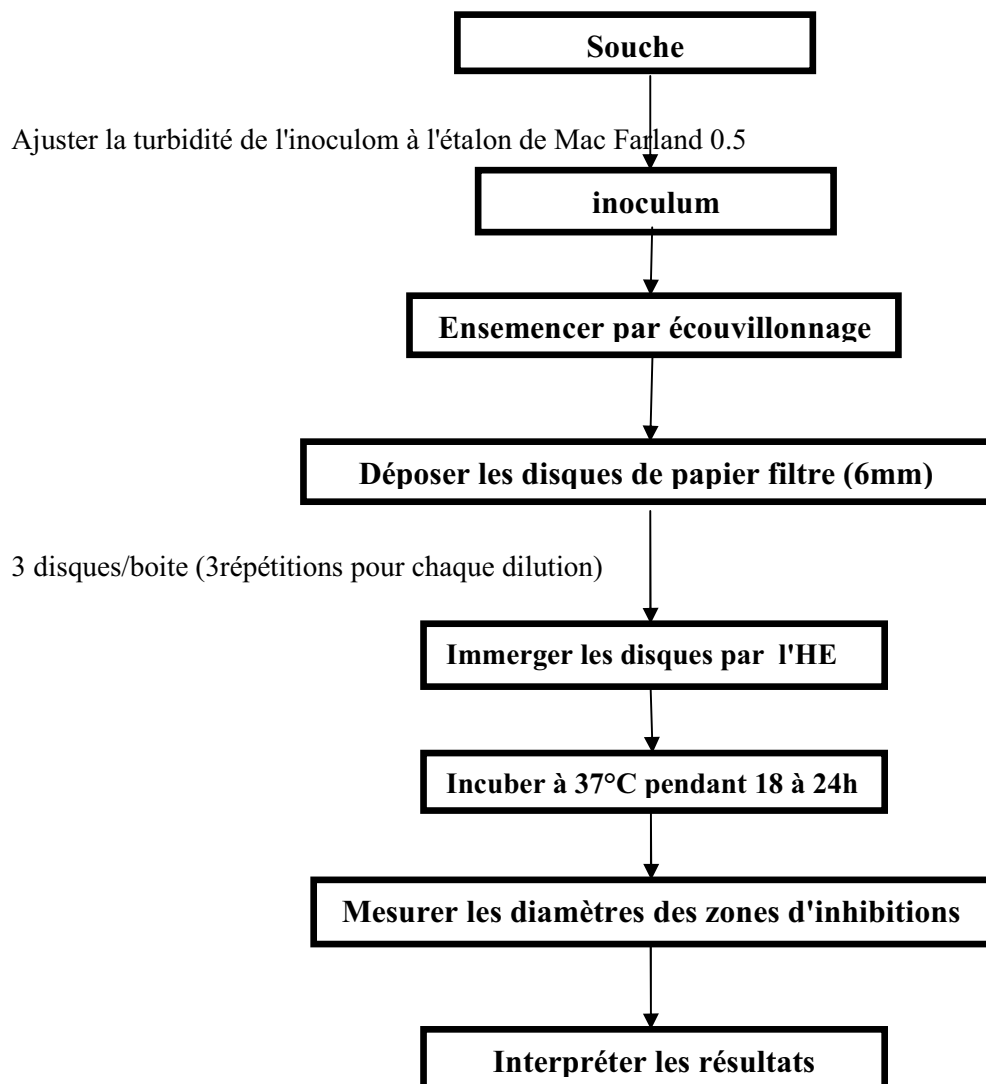


Figure 11: Les étapes de l'aromatogramme

3- 2-3. L'évaluation de l'activité antioxydantes des huiles essentielles:

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante des extraits naturels par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO[•] par les méthodes ORAC et TRAP (Ricardo-da-Silva et *al.*, 1991); les ions ferriques par la méthode FRAP (Benzie et Strain ,1996); ou les radicaux ABTS[•] (Re et *al.*, 1999), ainsi que la methode utilisant le radical libre DPPH[•] (Sharma et *al.*, 2009).

3-2-3-1. Test de DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrozyl):

La capacité antioxydante peut être mesurée en utilisant des radicaux libres plus stable. Le DPPH[•] est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette. Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeur des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome de hydrogène ce qui conduit à la disparition du DPPH au cours de la réaction et à un changement de la coloration dans la solution initiale (Figure 12). Habituellement, l'absorbance de DPPH est mesuré à une longueur d'onde comprise entre 515-520 nm (Bandoniene et *al.*, 2002). La cinétique de la réaction se déroule selon l'équation suivant:



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH. (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H (Brand-Williams et al., 1995).

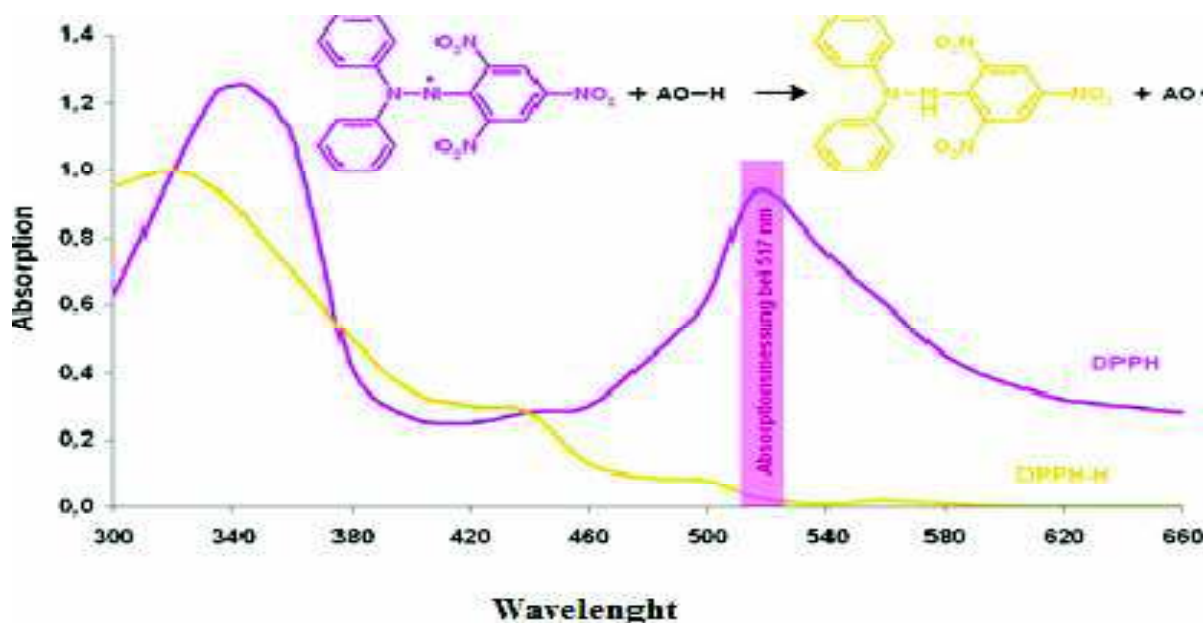


Figure 12: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive (Brand-Williams et *al.*, 1995)

Plus un composé a la facilité de céder son atome de hydrogène, plus celui-ci est jugé efficace comme antioxydant. Le pourcentage de DPPH restant est proportionnel à la concentration de l'antioxydant. La concentration du composé à tester nécessaire pour atteindre une disparition de 50% de DPPH à l'équilibre est connue comme la IC50. (Sanchez-Moreno et Larrani, 1998).

Nous avons choisi la méthode DPPH en raison de sa simplicité, rapidité, sensibilité et de sa reproductibilité, mais aussi parce que les mesures IC50 sont comparables entre elles et non pas seulement à celle d'une référence.

Protocole expérimentale:

-Préparation de la solution DPPH:

Le DPPH (C₁₈H₁₂N₅O₆ ; PM : 394.33), est solubilisé dans du méthanol absolu (4mg/100ml).

- L'essai au DPPH:

Le protocole utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des HEs contre le radical DPPH est celle de Burits et Bucar (2000). Ce protocole a été résumé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 05: Protocole de l'activités antioxydante de l'HE de *B. pomelianum*.

	DPPH	MeOH	HE
Blanc		1400µl	
Control	700µl	700µl	
Echantillon	700µl		700µl

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 700µl de l'huile à tester, on ajoute 700µl de solution au DPPH. Après agitation par un vortex, les tubes sont placés à l'obscurité, à température ambiante pendant 30 minutes. Pour chaque concentration, la lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm par un spectrophotomètre. Le contrôle négatif est composé de 700 µl de la solution méthanolique au DPPH et de 700 µl de méthanol, le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique (2.5 mg/ml) dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

-Expression des résultats:

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50%, les résultats sont exprimés en activité antioxydante. L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Selon Sharififar et al., 2007 le poucentage d'inhibition (valeur IC50 ou EC50) a été déterminée à partir cette relation:

$$\text{Inhibition \%} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}) / \text{Abs}_{\text{control}} \times 100$$

4. Résultats et discussion

4-1. Résultats

4-1-1. Extraction:

L'extraction par l'hydrodistillation, pendant trois à quatre heures, permettant de donner des HEs de rendement et de caractéristiques organoleptiques et physicochimiques différentes, sont illustré dans le tableau si dessous.

Tableau 06: Les caractéristiques organoleptiques et physicochimiques des HEs des deux plantes.

HE	Couleur	Odeur	Densité	Rendement
<i>B. pomelianum</i>	jaune, limpide	Forte	0,669	0,368%
<i>Sideritis incana</i>	jaune pale	forte et agréable.		

4-1-2- L'activité antibactérienne:

Les HES obtenues ont été testées uniquement sur les souches de références 'ATCC'. Le **Tableau 07** montre les résultats de l'activité antibactérienne des HEs de *B. pomelianum* et de *Sideritis incana*. On note que l'huile de *B. pomelianum* a exercé une forte activité antibactérienne par apport l'huile de *Sideritis incana*.

-l'HE de *B. pomelianum*:

La plus grande surface d'inhibition enregistrée de l'huile de *B. pomelianum* est pour la *S. aureus* SARM (extrêmement sensible) avec un diamètre d'inhibition plus de $39,333 \pm 0,192$ mm pour la dilution 1/2 et beaucoup plus grande que les antibiotiques testés: E, P, OFX, FA (tableau 08) qui ont donné les diamètres suivants: 6, 15, 26, 33 mm respectivement (Figure 13). Cette souche est sensible aussi avec les autres dilutions (1/5 et 1/10).

La deuxième souche qui a été inhibé fortement par l'huile de *B. pomelianum* est *E. coli* avec un diamètre d'inhibition plus de $17,667 \pm 0,509$ mm pour la dilution 1/2 et $13,33 \pm 0,760$, pour la dilution 1/5 mm et $11 \pm 0,333$ mm pour la dilution 1/10. Ces diamètres d'inhibitions sont plus grands que ceux des antibiotiques AMC et CZ (10 et 17 mm respectivement), et moins que CT et NA (21 et 30 mm respectivement) (Figure 14).

Ces deux espèces sont alors les plus sensibles à l'HE de *B. pomelianum* avec une sensibilité décroissante avec la diminution de la concentration de l'HE.

P. aeruginosa aussi est sensible à cette huile surtout avec la dilution 1/2 ($11,33 \pm 0,333$), malgré qu' elle présente une résistance aux antibiotiques, notamment, CZ, AMC, NA (Figure 15).

B. subtilis, *S. epidermidis*, *L. inocula* sont aussi sensibles à cette huile surtout avec la dilution 1/2 avec les diamètres d'inhibitions suivants : $13\pm 0,333$, $12,333\pm 0,385$, $11,667\pm 0,192$, $11,33\pm 0,192$ mm respectivement. Mais elles sont extrêmement sensibles aux antibiotiques testés.

-L'HE de *Sideritis incana*:

La pluparts des souches qui sont testées vis-à-vis de l'HE de *S. incana* ont présenté une résistance ou une faible sensibilité à cette huile par rapport aux antibiotiques (tableaux 07 et 08).

La souche la plus sensible à cette huile est *B. subtilis* avec un diamètre d'inhibition $13\pm 0,577$ mm, suivi par *P. aeruginosa* ($9,333\pm 0,333$ mm) et en fin *S. epidermidis* ($8,667\pm 0,333$ mm).

Le DMSO, le solvant dans laquelle on a solubilisé notre HEs, a été testé vis-à-vis de toutes les souches et n'a présenté aucun effet sur la croissance de ces bactéries (Figure 20).

Tableau 07: Effet des HEs sur la croissance des Bactéries (moyenne \pm SEM)

HE de <i>B. pomelianum</i>			
souches	1/2	1/5	1/10
<i>E. coli</i>	$17,667\pm 0,882$ S (++)	$13,33\pm 0,333$ S (+)	$11\pm 0,577$ S (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$11,33\pm 0,333$ S (+)	$9,33\pm 0,333$ S (+)	$6\pm 0,0$ R
<i>Bacillus subtilis</i>	$13\pm 0,577$ S (+)	$10,667\pm 0,333$ S (+)	$9,333\pm 0,333$ S (+)
<i>Lesteria inocula</i>	$11,667\pm 0,333$ S (+)	$8,667\pm 0,333$ S (+)	$8,333\pm 0,333$ S (+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$39,333\pm 0,333$ S (+++)	$19\pm 0,577$ S (++)	$11,667\pm 0,333$ S (+)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$12,333\pm 0,666$ S (+)	$10,667\pm 0,333$ S (+)	$8,333\pm 0,333$ S (+)
HE de <i>Sideritis incana</i>			
Souches	1/2	1/5	1/10
<i>E. coli</i>	$9\pm 0,333$ S(+)	$7\pm 0,0$ R	$6\pm 0,0$ R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$9,333\pm 0,333$ S(+)	$6\pm 0,0$ R	$6\pm 0,0$ R
<i>Bacillus subtilis</i>	$13\pm 0,577$ S(++)	$6\pm 0,0$ R	$6\pm 0,0$ R
<i>Lesteria inocula</i>	$6\pm 0,0$ R	$6\pm 0,0$ R	$6\pm 0,0$ R
<i>Staphylococcus aureus</i>	$6\pm 0,0$ R	$6\pm 0,0$ R	$6\pm 0,0$ R
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	$8,667\pm 0,333$ S (+)	$6,667\pm 0,333$ R	$6\pm 0,0$ R

R : Résistante ; S (+) : Sensible; S (++) : Très sensible; S (+++) : Extrêmement sensible.

Tableau 08: Les diamètres des zones d'inhibitions en mm dans l'Antibiogramme.

souches	ATB			
	CT	NA	AMC	CZ
<i>E. coli</i>	21 S (+++)	30 (S+++)	10 S (+)	17 S (+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19 S (++)	6 R	6 R	6 R
	OFX	NTX	CN	CIP
<i>Bacillus subtilis</i>	34 S (+++)	26 S (+++)	36 S (+++)	35 S (+++)
<i>Lesteria inocula</i>	34 S (+++)	31 S (+++)	29 S (+++)	39 S (+++)
	P	E	OFX	FA
<i>Staphylococcus aureus</i>	15 S (++)	6 R	26 S (+++)	33 S (+++)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	40 S (+++)	12 S (+)	32 S (+++)	34 S (+++)

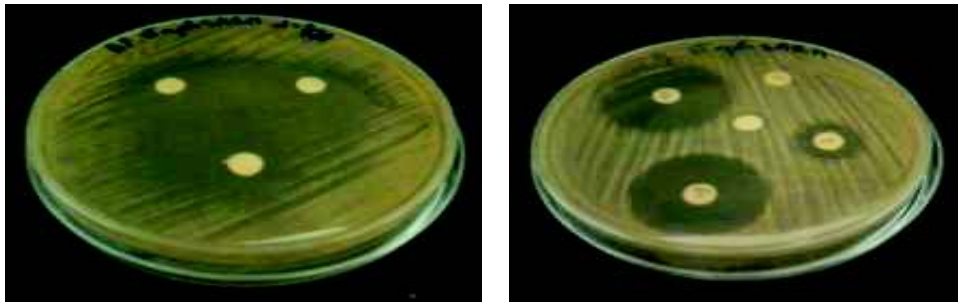


Figure 13: L'aromatogramme de *B. pomelianum* (1) et l'antibiogramme (2) de *S. aureus*

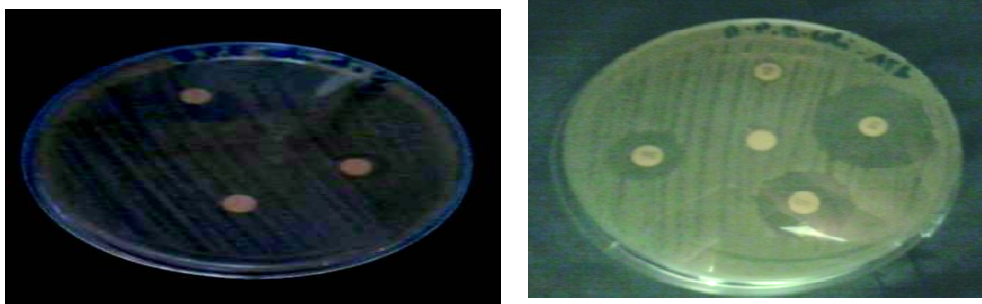


Figure 14 : L'aromatogramme de *B. pomelianum* (1) et l'antibiogramme (2) de *E. coli*

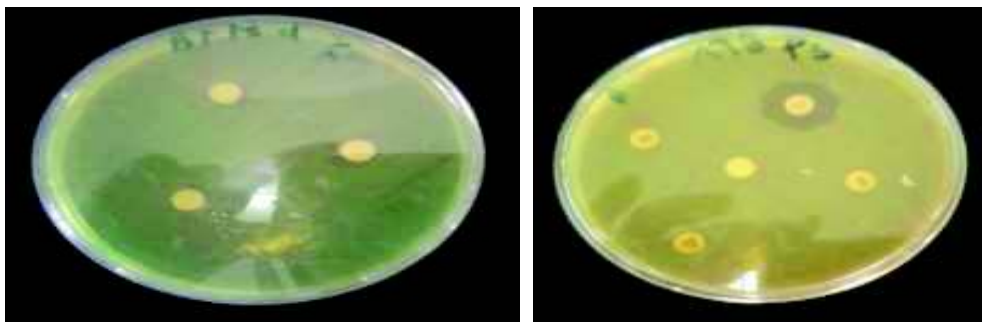


Figure 15: L'aromatogramme de *B. pomelianum* (1) et l'antibiogramme (2) de *P. aeruginosa*

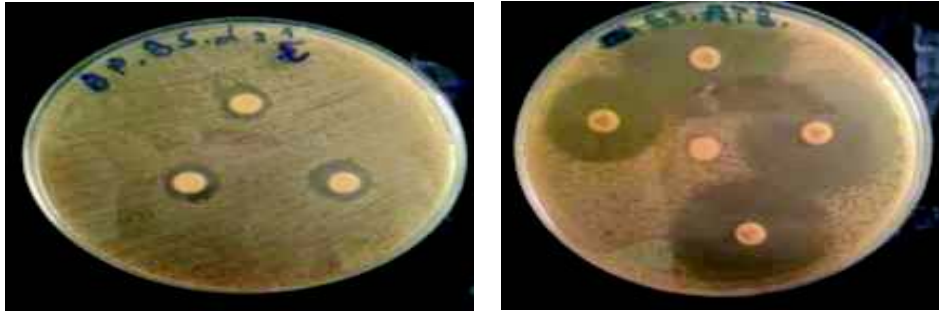


Figure 16: L'aromatogramme de *B. pomelianum* (1) et l'antibiogramme (2) de *B. subtilis*

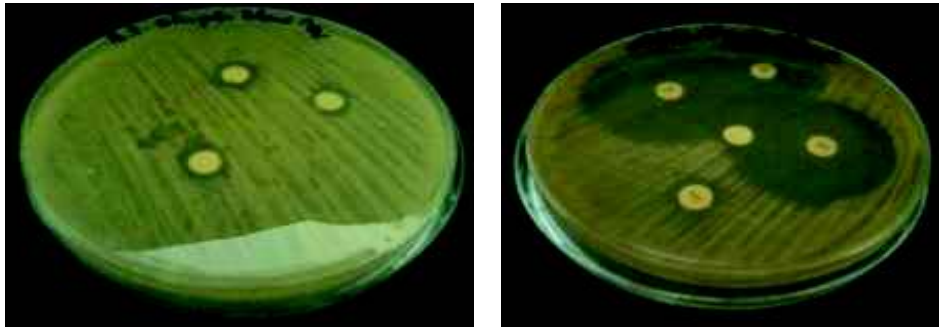


Figure 17 : L'aromatogramme de *B. pomelianum* (1) et l'antibiogramme (2) de *S. epidermidis*

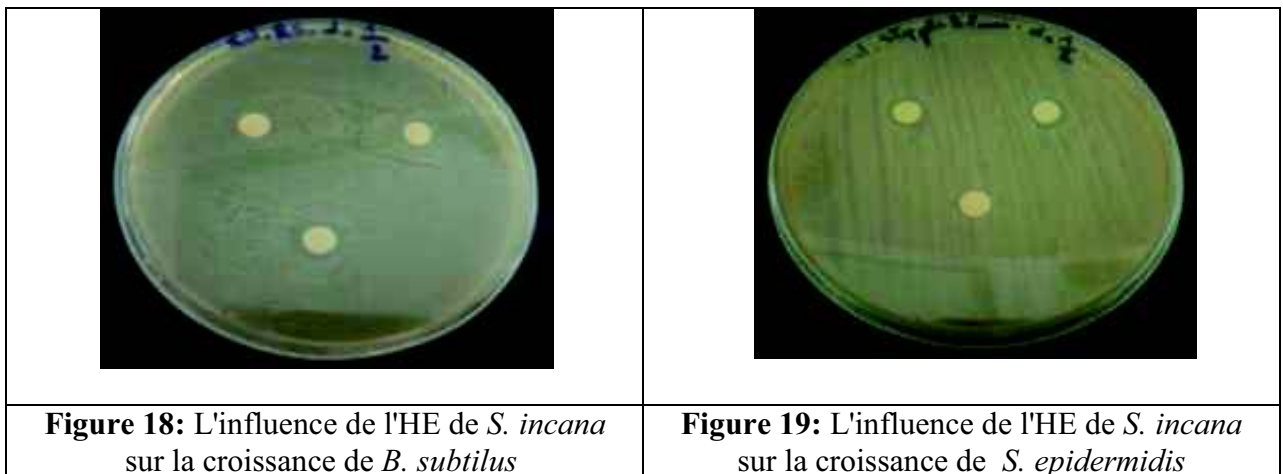


Figure 20: l'effet de DMSO sur la croissance de certaines bactéries

4-1-3. L'activité antioxydante:

Le test de DPPH consiste à ajouter une concentration connue d'HE ou d'acide ascorbique au DPPH qui à l'origine présente une coloration violet. Une diminution de l'intensité de la couleur du DPPH, mesurée à 517 nm, reflète la présence de substances antioxydante dans le milieu (figures 21 et 22).

L'huile de *B. pomelianum* a révélé un pouvoir de capter les radicaux libres. La concentration efficace qui réduit 50% de DPPH en solution est de l'ordre de 29,264 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ et de l'ordre de 78,12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour l'acide ascorbique. La cinétique de réduction du radical libre DPPH obtenue pour les différentes concentrations d'HE et de vitamine C est indiquée dans les figures 23 et 24.



Figure 21: Test de DPPH pour l'HE de l'espèce *B. pomelianum*



Figure 22: Test de DPPH pour l'acide ascorbique

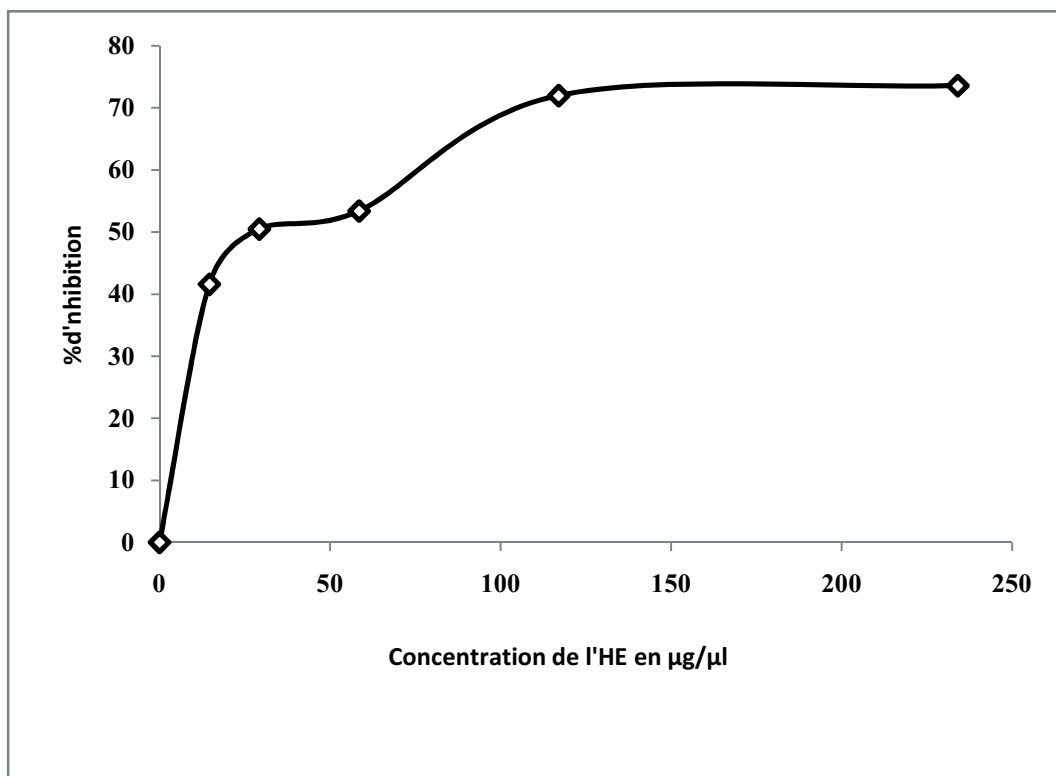


Figure 23: Le pourcentage de réduction du radical DPPH sous l'effet de l'HE de *B. pomelianum*

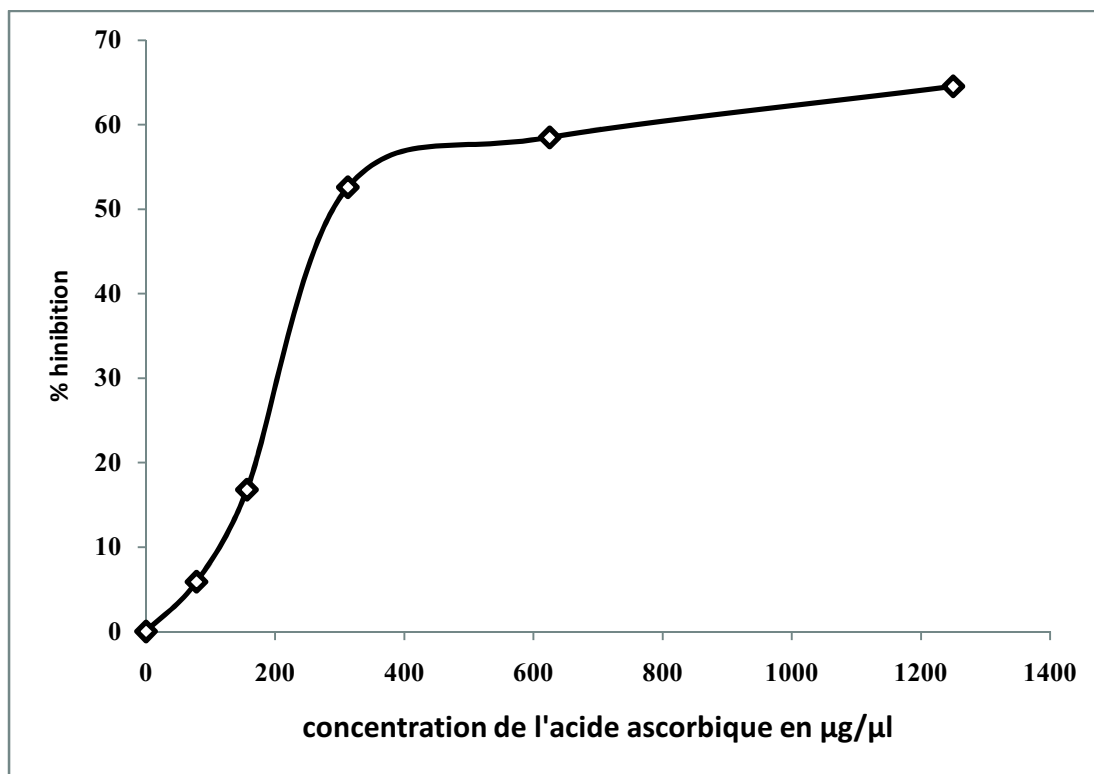


Figure 24: La pourcentage de réduction du radical DPPH sous l'effet de l'acide ascorbique

4-2. Discussion

4-2-1. Extraction:

-Le rendement:

Le rendement en HE obtenu à partir de la plante de *B. pomelianum* est de 0,368% (P/P). Ce rendement est considérable, si on le compare avec le contenu des plantes en HE qui est de l'ordre de 0,1% à 1%, sauf certaines exceptions (Bruneton, 1999). Sachant que le rendement en HE peut être extrêmement variable selon les plantes (Haddouchi et Benmansour, 2008).

Pour l'espèce de *S. incana* on a enregistré un faible rendement en HE par rapport l'espèce *B. pomelianum*; et à cause des conditions défavorables (temps, matériel végétal) on est incapable de refaire l'extraction pour calculer la valeur exacte de ce rendement.

D'après les résultats rapportée par Koutsaviti1 en 2013 sur le rendement en HE de cinq espèces de *Sideritis* récoltées en Grèce dans des périodes déférentes à savoir: *S. clandestina* subsp. *Peloponnesiaca* (juillet 2007), *S. clandestina* subsp. *Peloponnesiaca* (juillet 2006), *S. clandestina* subsp. *Clandestina* (juillet 2006), *S. Euboea* (juillet 2007), *S. romana* subsp. (Mai 2008) et *S. lanata* (Avril 2007). Ces espèces donnent des rendements extrêmement différents qui sont: 0,60; 0,46; 0,26, 0,10; 0,55; 0,94 respectivement.

Des études avaient montré que le rendement et la qualité en HE est dépend de nombreux facteurs : peuvent être dues à certains facteurs écologiques et environnementaux (la température et l'humidité), le stade de croissance, les conditions pédoclimatiques, l'influence du cycle végétatif, à la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante, la technique d'extraction, ou même à des facteurs génétiques...etc. (Satrani et al., 2007; Amarti et al., 2010).

La lumière stimule la production des HEs. Des études ont montré que l'obscurité a diminuer le rendement en huile volatiles. Il est démontré que l'insuffisance ou l'excès d'eau a un effet négatif sur le rendement en HE (Panizzi et al., 1993).

-La densité:

La densité de l'HE de *B. pomelianum* est de 0,669. Sachant que la densité nous renseigne sur la composition chimique des HEs: 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 compositions très variée en composés terpéniques polycycliques (Garnero, 1996).

4-2-2. Activité antibactérienne:

D'après notre résultats sur l'espèce de *B. pomelianum* on conclue que cette espèce possède *in vitro* une forte activité contre les bactéries. Cet effet est attribué au contenu de l'huile et qui peut être relié aux composés majoritaires (Mohammedi et Atik, 2011).

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* vis-à-vis l'HE de *B. pomelianum* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries Gram (+) aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels due à l'absence de la membrane externe (Athamena et al., 2010).

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats. Peut être la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits organiques que la méthode de diffusion en milieu gélosé (Athamena et al., 2010).

Les résultats montrent que les bactéries Gram (-) tel que *E. coli* et *P. aeruginosa* sont plus résistantes que les bactéries Gram (+) notamment, *S. aureus* et *B. subtilis*. Sivropoulou et ses collaborateurs (1996) ont démontré que les bactéries Gram (+) sont plus sensibles que les bactéries Gram (-), se qui est en accordance avec notre résultats.

L'activité antimicrobienne de certaines HEs peut être due à une perturbation de la structure membranaire des microorganismes (Bouzouita et al., 2008). Cette activité est principalement fonction de leur composition chimique, en particulier de leurs composés volatils majeurs. Cependant, tout cela n'empêche qu'un effet synergique entre les constituants majoritaires et minoritaires de l'HE de cette espèce peut aussi être pris en compte dans cette activité (Mansouri et al., 2011).

En effet, plusieurs auteurs (Pellecuer et al., 1980; Gergis et al., 1990; Panizzi et al., 1993; Sivropoulou et al., 1996; Trombetta et al., 2002. Satrani et al., 2008) ont montré que les HEs riches en dérivés phénoliques (carvacrol et thymol) possèdent une forte activité antibactérienne.

Pseudomonas aeruginosa est plus ou moins sensible à l'HE de *B. pomelianum*, ce comportement n'est pas surprenant car elle possède une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides. En effet cette résistance est associée à la nature de sa membrane externe (Haddouchi et Benmansour, 2008).

L'HE de l'espèce *S. incana* a présenté une faible activité antibactérienne vis-à-vis quelques bactéries Gram (+) et Gram (-), notamment, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenue par Dulger et ses collaborateurs en 2005.

La faible activité antibactérienne de l'HE de l'espèce de *S. incana* peut s'expliquer par son profil faible en certains alcools monoterpènes, et les phénols et riche en hydrocarbures terpéniques, notamment l' α pinène et le limonène. Ce dernier, en particulier, ne présente aucun effet bactériostatique (Haddouchi et Benmansour, 2008).

Kiliç et ses collaborateurs (2003) rapportés que les HEs de *Sideritis athoa*, *Sideritis trojana*, *Sideritis dichotoma*, *Sideritis spilyea*, et *Sideritis argyrea* sont active vis-à-vis *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

Mais dans l'étude de Koutsaviti1 (2013) rapportée que Les HEs de *Sideritis* testés exercent la présence une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries gram (+). Et que la souche bactériennes la plus sensible à HE de *Sideritis* est *S. aureus* avec les valeurs de CMI varie entre 2.22 à 6,91 $\mu\text{g}/\text{Ml}$. Tandis que les souches *E. coli*, et *P. aeruginosa* (gram -) ont présentes une résistance vis-à-vis cette huile, ce qui est plus ou moins en accordance avec notre résultats.

Gergis *et al.*, (1990) rapportée que les HEs obtenue en Grèce des espèces *S. sipylea*, *S. euboea*, *S. clandestina* subsp. *cyllenea* et *S. clandestina* subsp. *clandestina* sont moins efficace vis-à-vis les bactéries Gram(-) que les bactéries Gram (+). Mais dans notre étude l'*E. coli* et *pseudomonas* qui sont des bactéries gram (-) sont plus ou moins sensible à l'huile de *S. incana*.

Plusieurs études démontré que les structures identifie en diterpènes dans les HEs de *Sideritis* sont les responsable de leurs activité antibactérienne (Koutsaviti1, 2013).

Rodriguez-Linde *et al.*, (1994) rapportée que les HEs de *Sideritis* possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis six souches bactériennes et trois champignons. Cette activité peut être attribuer à leur contenants en composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les diterpènes (*Palomino et al.*, 1996).

La résistance de la souche *S. aureus* et *L. inocula* vis-à-vis l'HE de *S. incana* peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar (*Athamena et al.*, 2010).

4-2-3. Activité antioxydante:

Le DPPH est initialement violet, se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie. Cette décoloration est représentative de la capacité des composés de l'HE de *B. pomelianum* à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique, de même que l'acide ascorbique. Ce test nous permet donc d'obtenir des informations sur ce pouvoir par la détermination de l'IC50 de chacune des composés testé.

L'IC50 de l'HE de *B. pomelianum* (29.264 µg/µl) est inférieurs à celle de l'acide ascorbique (78.12 µg/µl), alors notre HE possède une forte activité antioxydante.

Notre résultats montre que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine C ou pour l'HE de *B. pomelianum*. En plus les profils cinétiques obtenus révèlent une activité antioxydante fortement dépendante des concentrations de l'agent antioxydant. Plus le composé antioxydant (HE et acide ascorbique) est concentre, plus la baisse de l'absorbance de DPPH est importante, ce qui est en accordance avec les résultats de Popovici et ses collaborateurs (2009).

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'HE. En présence d'un radical libre DPPH[•], l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène. Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'HE, le camphre par exemple possède une forte activité antioxydante (N'dri Séraphin et *al.*, 2011). Le rôle principal des composés phénoliques comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports (Barkat et Laib, 2011).

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant les groupes suivant SH⁻, NH⁻ et OH⁻ (Salah et *al.*, 1995). Il s'effectue a température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Le test est largement utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits naturels (Popovici et *al.*, 2009).

il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Popovici et *al.*, 2009).

Conclusion

Conclusion :

Les principes actifs des plantes médicinales tel que les HEs doivent être considérés comme potentiel actives dans la médecine alternative car les consommateurs aujourd'hui sont très inquiet concernant la toxicité causée par les agents antibactériens (les antibiotiques) et antioxydants (conservateurs des aliments) synthétisé chimiquement.

Dans notre travail, les HEs de deux plantes aromatiques ont été extraites par hydrodistillation, c'est une méthode simple et facile à mettre en œuvre. Mais elle nécessite d'utiliser une grande quantité de matériel végétal pour donner un bon rendement en HE.

Les HEs possèdent plusieurs activités biologiques, tel que antibactérienne, antivirale, anti-cancérigène et antioxydante.

Dans notre étude on a évalué l'activité antibactérienne des HEs de deux plantes aromatiques à savoir: *B. pomelianum* et *S. incana* par la méthode de l'aromatogramme. Et ont a obtenus des résultats intéressantes, surtout pour l'espèce *B. pomelianum*. Mais il faut essayer prochainement d'évaluer cette activité par d'autres méthodes, notamment, la méthode de diffusion en puits parce que la méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe sur les résultats obtenus.

On a aussi essayé de tester l'activité antioxydante de l'HE de *B. pomelianum*, cette huile présenté une forte capacité à piéger le radicale libre DPPH[•]. Bien que le test au DPPH[•] soit considère comme une méthode simple, rapide et facile à mettre en oeuvre, c'est pour ça on a choisis cette méthode pour l'évaluation de l'activité antioxydante de l'HE de *B. pomelianum*. Cependant les expériences ont montre certaines difficultés de la mesure de l'état de réduction: un phénomène dynamique à faible concentration (traces d'antioxydant en ppm) et accompagner de nombreux composés formés, dans certains cas instables (Popovici et *al.*, 2009).

En fin, il faut signaler que les activités biologiques des HEs ne sont pas seulement dues aux composés majoritaires mais à l'ensemble des composées contenant dans cette huiles. C'est pour cela qu'il faut mener une étude détaillée sur les compositions chimiques ainsi que les activités biologiques de ces huiles pour montrer leur importance et la possibilité de leur exploitation dans certains domaines : pharmaceutique, cosmétique, insecticide, alimentaire, etc.

Références bibliographiques

- AFNOR. (1992). Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Paris.
- Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajouri M. et Chaouch A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. Et *Thymus ciliatus* (desf.) Benth. Du Maroc. Biotecnol. Agron. Soc. Environ., **14** (1), 141-148.
- Anne-Laure. (2002). Phytochemical investigation of plants used in African traditional medicine: “*Dioscorea sylvatica*” (Dioscoreaceae), “*Urginea altissima*” (Liliaceae), “*Jamesbrittenia fodina*” and “*J. Elegantissima*” (Scrophulariaceae). *Thèse de Doctorat, Université de Lausanne*.
- Athamena S., Chalghem I., Kassah-Laouar A., Laroui S. et Khebri S. (2010). Activité antioxydante et antibactérienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal, **11**(1). 69-81.
- Bandoniene D., Murkovic M., Pfannhauser W., Venskutonis P.R. and Gruzdiene D. (2002). Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and online HPLC-DPPH methods. *Eur. Food Res. Technol.*, **214**, 143–147.
- Barkat M. et Laib I. (2011). Composition chimique et activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies AgroAlimentaires (INATAA.), *Revue de génie industriel*, **6**, 46-54.
- Belaiche P. (1979). Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Maloine S. A. Paris, T.1, 915p.
- Benzie I. F. et Strain J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
- Berche P., Gaillard J.L., et Simonet M. (1989). Bactériologie: bactéries des infections humaines. Médecine-Sciences Flammarion.
- Bernadet M. (2000). Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles, Editions Dangles.
- Blamey M. et Grey-Wilson C. (1993). Toutes les fleurs de méditerranée, les fleurs, les graminées, les arbres et arbustes. Delachaux et Niestlé, La Martinière Groupe, 13, rue Séguier 75005 Paris. France.
- Boulos L. (1983). Medicinal plants of north Africa, Ed. Reference Publication Inc., Michigan.
- Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M. et Chaabouni M. (2008). Composition chimique et activités antioxydante, antibactérienne et insecticide de l'huile essentielles *Juniperus phoenicea*. Journal de la Société Chimique de Tunisie, **10**, 119-125.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**, 25-30.
- Bremness L. (1998). Les plantes aromatiques et Médicinales. Bordas Editions.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3^{ème} Edition Lavoisier, Paris. 1095p.
- Bull.(1932). Soc. Hist. Nat. Afrique N., **23**, 186p.

Références bibliographiques

- Carette A. S. et épouse Delacour. (2000). La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat.
- CEDAP: Commission interministérielle d'étude des produits destinés à une alimentation particulière.(1996). Avis sur les recommandations relatives au caractère non trompeur des allégations nutritionnelles fonctionnelles.
- Cosentino S., Tuberoso C.I., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F. (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett. Appl Microbiol.*, **29** (2), 103-105.
- Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 5.
- Croteau R. and Roland R. C. (1983). Terpenoids J. Chromatography Library., **22B**, 150-151.
- Delaveau P. (1982). Histoire et renouveau des plantes médicinales. Paris Albin Michel, P. 348.
- Djarri L. (2011). Contribution à l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plantes Algériennes de la famille de Apiaceae *Daucus reboudii* coss. ex Batt. et Trab., *Kundmannia sicula* (L.)D., et *Elaeoselinum thapsioides* Maire. *Thèse de Doctorat en sciences*.
- Dugo G., Tranchida P., Cotroneo A., Dugo P., Bonaccorsi I., Marriott P., Shellie R. and Mondello L. (2005). Advanced and innovative chromatographic techniques for the study of citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, **20**, 249-264.
- Dulger B., Gonus A., and Bican T. (2005). Antimicrobial studies on three endemic species of *Sideritis* from Turkey. *ACTA. BIOLOGICA CRACOVIENSIA Series Botanica*, **47**(2), 153–156.
- Dunn M., Shellie R., Morrison P. and Marriott P. (2004). Rapid sequential heart-cut multidimensional gas chromatographic analysis. *Journal of chromatography A.*, **1056**, 163-169.
- Duquenois P. (1968). L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, leur normalisation et l'europe du médicament. *Parf. Cosm. Sov.* **11**, 414-418.
- Duraffourd C., D'hervicourt L. et Lapraz J. C. (1990). Cahier de phytothérapie clinique. 2^{ème} Ed. Masson, Paris, T. **1**, 89p.
- Esra M., Duman H. and Unal F. (2009). Karyological studies on section empedoclia of *sideritis* (lamiaceae) from turkey. *Caryologie*, **62**(3), 180-197.
- Ettayebi K., El Yamani J. and Rossi-Hassani B. D. (2000). Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS. Microbiology Letters*. **183**,191-195.
- Fellah S., Romdhane M. et Abderraba M. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de *la Salvia officinalis.l* cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *J. soc. alger. chim.*, **16** (2), 193-202.
- Franchomme P. (1981). L'aromatologie à visée anti-infectueuse. *Phytomedecine*. **1**, 25-47.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z. et Jore D. (2003). Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?, Mécanismes biochimiques- l'actualité chimique, 91-96.

Références bibliographiques

- Garnero J. (1996). Huiles essentielles. Dossier : K345. Base documentaire : constantes physico-chimiques. Vol. papier n° : K2.
- Gergis V., Spiliotis V. and Poulos C. (1990). Antimicrobial activity of essential oil from Greek *Sideritis* species. *Pharmazie*, **45**, 70.
- Gibellin D. (2003). La phytothérapie en médecine vétérinaire : états des lieux et perspectives. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons Alfort.
- González-Burgos E., Carretero M.E. and Gómez-Serranillos M.P. (2011). *Sideritis* spp. Uses, chemical composition and pharmacological activities-A review, *J. Ethnopharmacol.*, **135**, 209-255.
- Grosmond G. (2001). La aromathérapie Bulletin des GTV., HS. : Elevage et agriculture biologique, 146-148.
- Guesmia K. (2002). Les huiles essentielles de *Nigella Sativa* L. Compositions chimiques et activité antibactérienne. Thèse de Magistère en biochimies appliquée, 95P.
- Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer 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.
- Haddouchi F. et Benmansour A. (2008). Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire –N°8*. 20-27.
- Hemwimon S., Pavasant P. and Shtiprux A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthroquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and purification Technology*, **54**, 44-50.
- Herbert R. B. (1989). The biosynthesis of secondary metabolites. 2nd Ed., Chapman and Hall, London-New York, pp :63-66.
- Hisil Y. and Pazir F. Supercritical CO₂ extraction of Turkish Mountain Tea (*Sideritis arguta* Boiss. et Heldr.) Ege university, Faculty of engineering, Bornova, Izmir, Turkey.
- Hmamouchi M. (1997). Plantes alimentaire, aromatiques, condimentaites, médicinales et toxiques au Maroc, Chania : CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes, **23**, 89-108.
- Hoffman B.R., DelasAlas H., Wiederhold R.E. and William L., (2004) . Screening of antibacterial and antifungal activities of ten medicinal plants from Ghana. *Pharmaceutical Biology*, **42** (1),13-17.
- Hubert R. (2008). Épices et herbes aromatiques. *Vie, site ressource en Sciences de la Vie*.
- Jaussaud P. (1992). Chimie verte, de la plante au médicament. Paris : Sutip S. A., 96 p.
- Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Treoré A. S. (2005). Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelles du Burkina Faso, Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité de la sécurité des aliments, utilisation des OGM, Analyses des risques en agroalimentaires. Ouagadougou. 8-11.
- Kaufmann S. H. E. (1997). Host response to intracellular pathogens. *New York*. 345 p.

Références bibliographiques

- Kiliç T., Yildiz Y.K., A.C., Goren G. and Tumen Topcu G. (2003). Phytochemical analysis of some *Sideritis* species of Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, **39** (5), 453-456.
- Koutsaviti A., Bazos I., Milenkovic M., Pavlovic-Drobac M. and Tzakou O.(2013). Antimicrobial Activity and Essential Oil Composition of Five *Sideritis* taxa of *Empedoclia* and *Hesiodia* Sect. from Greece. *Rec. Nat. Prod.*, **7**(1), 6-14.
- Larousse encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins. (2001). 2^{ème} Edition. Dorling Kindersley Limited.
- Lee K.H., Huang E.S., Pagana J.S and Geissman T.A. (1971). Cytotoxicity of sesquiterpenes lactones. *Cancer Research*, **31**, 1649-1654.
- Lindqvist C. and Victor A. A. (2002). Origin of the Hawaiian endemic mints within North American *Stachys* (Lamiaceae). *American Journal of Botany*, **89** (10), 1709-1724.
- Loza-Tavera H. (1999). Monoterpene in Essential oil : Biosynthesis and Properties. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **464**, 49-62.
- Lu F. and Foo L.Y. (2001). Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, **75**, 197-202.
- Lucchesi M.E. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en sciences, discipline : Chimie Université de la Réunion, Faculté des sciences et Technologies.
- Mann C.M. and Markham J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of applied microbiology*, **84**, 538-544.
- Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., EL Ghadraoui L., Guedira A. et Aafi A. (2011). Composition chimique , activité antibactérienne et antioxydante de l'huile essentielles de *Juniperus communis* du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **80**, 791 – 805.
- Marouf A. (2000). Dictionnaire de botanique. Duond, Paris, 216p.
- Mau J.L., Chen C.P. and Hsieh P.C. (2001). Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon and *Corni fructus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 183–188.
- Modzelewska A., Sur S., Kumar K.S. and Khan S.R. (2005). Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Curr. Med.Chem. Anti-cancer Agents*, **5**, 477-499.
- Muanza K., Kim B.W., Euler K.L. and William L. (1994). Antibacterial and antifungal activities of nine medicinal plants from Zaire. *International Journal of Pharmacology*, **32** ,337–345.
- N'dri Séraphin K., Bosson A. K., Amoassi M. B., Janat A. M. B., Koffi M. K.; Gnopo J. N., Jean-Luc P. et Yves-Alain B. (2011). Etude Chromatographique et Activite Anti-Oxydante de L'huile Essentielle de *Afraegle Paniculata* (Rutaceae). *European Journal of Scientific Research*, **63** (4), 482-488.
- OMS. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. WHO/EDM /TRM /2002.1.
- Palomino OM., Sollhuber M., Carretero E. and Villar A. (1996). Isoscutellarein 7-glucosyl (1->2) xyloside from sixteen species of *Sideritis*. *Phytochem.* **42**(1), 101-102.

Références bibliographiques

- Panizzi L., Flamini G., Gioni P.L., and Morelli I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oil of four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacology*, **39**, 169-170.
- Paris M. et Hurabielle M. (1981). Plante à huile essentielle in *Abrège de matière médicale*, (pharmacognosie, Tome1. Paris New York Barcelone Milan Mexico Rio de Janeiro. 335p.
- Pellecuer J., Jacob M., Siméon de Buechberg M. et Allergrini J. (1980). Therapeutic value of the cultivated mountain savory (*Satureia Montana L.*). *Acta Horitic.*, **96**, 35-39.
- Pharmacopée française, X^{ème} édition. *Edition Maisonneuve éditeur*, (1986).
- Piochon M. (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire comme exigence partielle de la maitre en ressources renouvelables, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.
- Ponce A. G., Fritz R., Del Valle C. and Roura S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss Chard. *Lebensmittelchaft and technologic*, **36**, 679-684.
- Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, **4**, 25-39.
- Quezel P. et Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales T. II. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. 15, quai Anatole-France-Paris. P.675.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. and Rice- Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.
- Richard H. (1992). *Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier*. Paris. 339 p.
- Ricardo-da-Silva J.M., Darmon N., Fernandez Y. and Mitjavila S. (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 549-1552.
- Robert G. (2000). *Les Sens du Parfum*. Osman Eroylls Multimedia. Paris. 224 p.
- Rodriguez-Linde ME., Diaz RM., Garcia-Granados A., Quevedo-Sarmiento J., Moreno E., Onorato MR., Parra A., and Ramos-Cormenzana A. (1994). Antimicrobial activity of natural and semisynthetic diterpenoids from *Sideritis* spp. *Microbios*, **77**(310), 7-13.
- Rwangabo P.C. (1994). *La médecine traditionnelle du Rwanda*. Edition Kartala. Paris.
- Salah N., Miller N.J., Paganga G., Tijburg L., Bolwell, G.P. and Rice-Evans C.A. (1995). Polyphenolic Flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339-346.
- Sallé J.I. (2004). *Les huiles essentielles-synthèse d'aromathérapie*. Edition Frison-Roche.
- Sanchez-Moreno C. et Larrani J.A. (1998). Main methods used in lipid oxidation determination. *Food science and technology international*, **4**, 391-399.

Références bibliographiques

- Satrani B. et al., (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cladanthus mixutus*. *Bulle. Soc. Pharm. Bordeaux*, **146**, 85-96.
- Scheffer J.J.C.(1996).Various méthodes for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*, **10**, 56-57.
- Sell C.S. (2006). *The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer*. 2nd edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.
- Shaaban H.A.E., El-Ghorab A. H. and Shibamoto T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review., *The Journal of Essential Oil Research*. **24** (2), 203–212.
- Shahidi F, Janitha D. K. and Wanasandura P. D. (1992). Critical Reviews in *Food Science and Nutrition*, **32**, 67.
- Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M. and Khoshnoodi M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, **18**, 800–805.
- Sharma-Om. P. and Bhat T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*,**113**(4), 1202.
- Sing R., Marimuthu P., De Heluani C.S. and Catalan Ceser A.N. (2006). Antioxidant and biocidal Activities of *Carum nigrum* (seed) Essential oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 174-181.
- Sivropoulou A. et al. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *J.Agric, Food Chem.*, **44**, 1202-1205.
- Sivropoulou C. Nicolaou E. Papanikolaou S. Dokkini T. Lanaras and Arsenakis M. (1997). “Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 3197–3201.
- Trombetta D. et al. (2002). Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant, β -unsaturated aldehydes. *Lett. Appl. Microbiol.*, **35**, 285-290.
- Ulvoas P. (2002). *Les thérapeutiques alternatives en médecine vétérinaire*. Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes.
- Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P. et Cilapraz J. (1978). L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant Med. Phytother*, **12**, 43-52.
- Valent J. (2005). *L'aromathérapie*. Ed Maloine S.A. ISBNE: 2-253-03564-5.
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M. and Garcia-Parrilla M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, **71**, 230–235.

Annexe 01: Composition des principaux milieux de cultures utilisés

1). Les milieux liquide:

1-1. L'eau physiologie stérile (composition en g/l) :

- chlorure de sodium.....9g
- eau distillée1000ml
- PH = 7
- Stérilisation à 121°C/15min.

1-2. Bouillon BRAIN HEART INFUSION (BHIB) (composition en g/l) :

- Protéose-peptone.....10g
- Infusion de cerveau de veau.....12.5g
- Infusion de cœur de bœuf.....5g
- chlorure de sodium.....5g
- Phosphate disodique.....2.5g
- eau distillée qsp.....1000ml
- PH = 7.4
- Stérilisation à 121°C/15min.

1-3. Bouillon Nutritive :

- Peptone.....10g
- Extrait de viande.....5g
- chlorure de sodium.....5g
- eau distillée1000ml
- PH = 7.2

2). Les milieux solide:

2-1. Gélose de Mueller Hinton "MH"(composition en g/l) :

- Extrait de viande.....3g
- Hydrolysate acide de caséine.....17.5g
- Agar.....18g
- PH = 7.4
- Stérilisation à 121°C/15min.

2-2. Gélose nutritive "GN" (composition en g/l) :

- Peptone.....10g
- Extrait de viande.....3g
- Extrait de levures.....3g
- chlorure de sodium.....5g
- Agar.....18g
- PH = 7.3 +/- 0, 2
- Stérilisation à 121°C/15min.

2-3. Gélose de CHAPMAN (composition en g/l) :

- Extrait de viande.....1g
- Extrait de levures.....3g
- Tryptone.....5g
- Peptone Bactériologique.....10g
- chlorure de sodium.....70g
- Mannitol.....10g
- Rouge de phénol.....0.025g
- Agar.....15g
- PH = 7.4
- Stérilisation à 121°C/15min.

Annexe 02: Aperçue sur les souches à tester

Staphylocoques:

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont des coques (cocci) à Gram positif, groupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive et oxydase négative. Parmi les 27 espèces du genre actuellement répertoriées, les principales sont :

-*Staphylococcus aureus* : sont connues pour provoquer des infections cutanées furoncles, panaris, abcès mammaires chez les femmes qui allaitent .

-*Staphylococcus epidermidis* (*S. Albus*) : à la différence au *S. aureus* les *S. blancs* ont à coagulase négative. principalement *S. epidermidis* (70%), font naturellement partie des flores cutanéomuqueuses de l'homme (bactéries commensale). Les souches de *S. Albus* (ou *S. blancs*) isolées en milieu hospitalier sont fréquent multirésistantes aux antibiotiques (50% à 70%) des souches.

Listéria :

Les bactéries du genre *Listeria* sont des petits bacilles à Gram positif, à extrémités arrondies, asporulés, non acido-alcool-résistant, mobiles à 20-25°C. Il existe 7 espèces, mais seule l'espèce *L. monocytogenes* joue un rôle en pathologie humaine.

Escherichia coli :

E. coli (colibacille) est une entérobactérie mobile capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole. C'est un genre très courant anaérobie facultatif. Son habitat est le colon humain où il est le plus abondant, alors que sa survie est extrêmement difficile dans l'environnement. Commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales

Pseudomonas :

Les *Pseudomonas* sont aérobies stricts, oxydase positif, mobiles, produisant souvent des pigments diffusibles et naturellement résistants à de très nombreux antibiotiques. Saprophytes, on les trouve essentiellement dans l'eau. Ils peuvent contaminer des solutés pour perfusion, des solutions antiseptiques, des préparations médicamenteuses liquides.

Bacillus subtilis :

Le genre *Bacillus* comprend des bactéries en forme de bâtonnets, généralement mobiles, sporogènes. Ces bacilles sont à Gram positif, aérobies stricts ou anaérobies facultatifs. Ces espèces de *Bacillus* peuvent parfois jouer le rôle de germes opportunistes et on sait que durant ces dernières années, une augmentation significative des infections nosocomiales a été constatée.

Annexe 03: Etalon MAC Farland 0.5

- ✓ En versant 0.5 ml de solution de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Chlorure de Barium dihydraté) à 1.175% (1,175g/100ml), dans une éprouvette de 100 ml, compléter à 100ml avec de H_2SO_4 à 1% (1ml/100ml). ainsi préparé il doit avoir une densité optique (DO) de 0.08-0.1 lu à 625nm.
- ✓ Aliquoter la solution en volumes de 10 ml , dans des tubes identiques à ceux qui serviront à la préparation de l'inoculum.
- ✓ Sceller ces tubes de façon à éviter toute évaporation (parafilm, ruban adhésif...);
- ✓ Repérer le niveau de liquide à l'aide d'un marqueur, et le contrôler régulièrement en prenant la densité optique.
- ✓ Conserver les tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière (papier d'aluminium).
- ✓ Homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé : l'inoculum et étalon doivent avoir le même turbidité lorsqu'ils sont examinés sur un fond rayé (si la suspension est trop trouble, ajuster l'opacité en ajoutant de l'eau physiologique).

Extraction et Bioactivités des huiles essentielles de deux plantes aromatiques Algériennes

Résumé :

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes et des capacités antioxydantes.

La présente étude a porté sur l'extraction par l'hydrodistillation les huiles essentielles de deux plantes aromatiques : *Brachyapium pomelianum* et *sideritis incana*. L'activité antibactérienne de ces HEs à été étudiée vis-à-vis de 6 souches bactériennes (souches de références "ATTC" et "CIP") par la méthode de l'aromatogramme. L'HE de *B. pomelianum* à été présenté une forte activité antibactérienne que l'HE de l'espèce *Sideritis*, surtout vis à vis les bactériens gram positif, notamment, *Staphylococcus aureus* SARM.

Ce travail s'inscrit aussi dans le cadre de la valorisation de l'HE de l'espèce *B. pomelianum* en tant qu'antioxydant. La méthode appliquée pour mesurer l'activité antioxydante est celle du piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH•. Cette huile à été présenté une forte activité antioxydante avec une IC50 correspondant à 29.264 µg/µl.

Mots clés : Activité antibactérienne , Activités antioxydante, DPPH, Huiles essentielles, plantes médicinales.

المخلص :

تحتوي المستخلصات الطبيعية المستخرجة من النباتات على أنواع من المكونات الفينولية و الزيوت الأساسية و التي تناسب لها القدرة التثبيطية للأحياء الدقيقة و القدرة المضادة للأكسدة.

في هذه الدراسة قمنا باستخلاص الزيوت الأساسية من النبتتين العطريتين : *Sideritis* و *Brachyapium pomelianum* *incana* بالتقطير المائي. تمت أيضا دراسة النشاطية المضادة للبكتيريا لهذه الزيوت على 6 سلالات بكتيرية (سلالات مرجعية: ATCC, CIP) بطريقة الانتشار في الوسط الصلب. اظهر الزيت الأساسي ل *B. pomelianum* فعالية كبيرة مقارنة بزيت النوع *Sideritis* خاصة ضد البكتيريا الموجبة الغرام , مثل *S. aureus* SARM .

هذا العمل يندرج أيضا في إطار تقييم النشاطية المضادة للأكسدة لزيت نبتة *B. pomelianum* . الطريقة التي استعملت لقياس هذه النشاطية هي طريقة إرجاع الجذر الحر DPPH. اظهر هذا الزيت قدرة كبيرة مضادة للأكسدة بقيمة IC50 مساوية ل 29.264 µg/µl

الكلمات المفتاحية : النشاطية المضادة للبكتيريا, النشاطية المضادة للأكسدة, DPPH, الزيوت الأساسية, النباتات الطبية.