

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République algérienne démocratique et populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب
Université –Ain Temouchent- Belhadj Bouchaib
Faculté des Sciences et de Technologie
Département des Sciences de la Matière



Projet de Fin d'Etudes
Pour l'obtention du diplôme de Master
Filière : Chimie
Spécialité : Chimie Macromoléculaire
Thème

***Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles:
d'Olive, d'Ail, de Camphère, de Girofle, de Rue et de Menthe
Sauvage***

Présenté Par :
Melle. Abed Riheb Zineb

Devant le jury composé de :

Dr. Bachir Cherifa	Pr.	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Président
Dr. Berrichi Amina	M.C.A	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Examineur
Dr. Mekhissi Khaled	M.C.B	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Encadrant
Dr. Rahmani Khaled	Dr.	UAT.B.B (Ain Temouchent)	Co-Encadrant

Année Universitaire 2020/2021

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

*A ma très chère **maman**...Aucune expression, aussi élaborée qu'elle soit, ne pourrait traduire ma profonde gratitude et ma reconnaissance pour toutes ces années de sacrifices et de dévouement surtout celles de mes études. Ta patience, ton grand amour, ton soutien et tes encouragements sont et seraient pour toujours les secrets de ma réussite.*

*A mon très cher **papa** ...Je ne trouverai des mots assez forts pour t'exprimer mon affection, mon estime et mon dévouement pour ta patience, ta compréhension, tes innombrables encouragements et tous les sacrifices que tu as consentis pour moi.*

*A mon très cher mari **Hichem**, en signe d'amour et de gratitude pour m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, pour ces sacrifices, ces encouragements, sa fidélité et sa gentillesse.*

*A mes sœurs : **Monia** et son époux **Karim** et leur petite adorable fille **Eline**,
Amina, **Maroua**, **Kaoutar**, **Ines**.*

A mon beau-père et ma belle-mère.

*A toute la famille **Abed**... A toute la famille **Hamiani**.*

Toutes mes salutations à tous mes collègues de la promotion de chimie macromoléculaire de l'U.B.B d'Ain Temouchent.

A tous mes professeurs de l'université, et à toutes les personnes qui m'ont aidée de loin Ou de prêt et que j'ai omis de citer.

Zineb Rihab

Remerciements

*Avant toute chose, nous remercions « **ALLAH** » le Tout Puissant, le Clément, le Miséricordieux, qui nous a facilité de réaliser ce modeste travail, qui nous a ouvert les portes du savoir, qui nous a donné la patience et la force et la volonté de poursuivre nos études.*

*Nous remercions très chaleureusement notre encadreur **Dr. Mekhissi khaled**, pour nous avoir proposé cet intéressant sujet de fin d'études et pour ses conseils si précieux, sa gentillesse et sa compréhension tout au long de notre projet.*

À Dr. Rahmani khaled,

Pour son aide précieuse, ses suggestions, sa disponibilité ainsi que pour le temps consacré à m'accompagner dans ce travail. Sincères remerciements.

À Dr. Bachir Cherifa ,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury notre mémoire. Pour la qualité de votre écoute et de vos conseils, merci.

À Dr. Berrichi Amina,

Que je remercie d'avoir accepté d'examiner notre mémoire. Soyez assurée ma vive gratitude.

*Nos remerciements aussi à M. Mouden Nasredin Ryadh,
Pour son gentillesse, encouragements, disponibilité et pour toute aide apportée.*

Je ne saurais terminer cette série de remerciement sans penser à tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé et encouragé au cours de la réalisation de ce travail, recevez mes remerciements sincères.

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des huiles essentielles dont la délivrance au public est réservée aux pharmaciens	5
Tableau 2: Exemples d'huiles essentielles pouvant être utilisées dans les produits cosmétiques	9
Tableau 3: Quantités d'huile essentielle obtenues à partir d'une tonne de plantes fraîches	10
Tableau 4: Intérêts et inconvénients des différents procédés de distillation	18
Tableau 5: les résultats de contrôle positif	33
Tableau 6: les différents volumes des solutions	33
Tableau 7: Les résultats du test DPPH par spectrophotomètre UV/VIS	35
Tableau 8: Valeurs des concentrations efficaces (IC50) des huiles testés	37
Tableau 9: Appareils de laboratoire utilisés	38
Tableau 10: Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antibactérienne	39
Tableau 11: Milieux utilisés pour l'activité antimicrobienne d'huile essentielle	39
Tableau 12 : Milieux de culture pour la croissance des souches de référence	40
Tableau 13: Les résultats de lecture	43

Liste des figures

Figure 1: Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes	13
Figure 2: Différents extraits aromatiques obtenus à partir de matières végétales	14
Figure 3: Schéma d'un alembic	15
Figure 4: Schéma d'une installation d'entraînement à la vapeur	16
Figure 5: Schéma d'une installation de vapo-hydrodistillation	17
Figure 6: Structure chimique de l'isoprène	22
Figure 7: Principe du test DPPH	28
Figure 8: Mécanisme réactionnel du test FRAP d'après	28
Figure 9: Structure chimique du radical libre du 2,2-Diphenyl-1-Picryl-Hydrazyl	31
Figure 10: Réaction de test DPPH	31
Figure 11: Le contrôle positive	33
Figure 12: les extraits d'essai avant l'obscurité	33
Figure 13: les essais après 30 min d'obscurité	34
Figure 14: Les courbes de pourcentage d'inhibition	37
Figure 15: Les photos de l'activité antimicrobienne	41

Liste des abréviations

HE: Huile Essentielle

DPPH: Diphényl Picrylhydrazyle

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

CMI: Concentration Minimale d'Inhibition

gram +: gramme positive

gram -: gramme négative

BMH: Bouille Mueller Hinton

GMH: Gélose Mueller Hinton

Table des matières

Dédicaces

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction Générale **1**

Chapitre 1 : Les huiles essentielles (HE)

1.1 Définition d'une HE.....	3
1.1.1 Selon la Commission de la Pharmacopée européenne (2008).....	3
1.1.2 Selon AFNOR NF T 75-006 (1998).....	3
1.1.3 Selon AFNOR ISO 9236 : Matières premières aromatiques d'origine naturelle.....	4
1.2 Utilisation des HE.....	4
1.2.1 En pharmacie.....	4
1.2.2 Dans l'industrie alimentaire.....	7
1.2.3 En agriculture.....	7
1.2.4 En cosmétologie et parfumerie.....	8
1.3 Les Plantes Aromatiques.....	9
1.3.1 Les grandes familles de plants aromatiques.....	10
1.4 Réparation et localisation de l'huile essentielles.....	11
1.5 Origine et rôle des HE.....	12
1.6 Méthodes d'obtention des huiles essentielles.....	13
1.6.1 Techniques d'extraction.....	13
1.6.1.1 Hydrodistillation.....	14
1.6.1.2 Entraînement à la vapeur.....	16
1.6.1.3 Vapo-hydrodistillation.....	17
1.6.1.4 Distillation sèche.....	18
1.6.1.5 Expression à froid.....	18
1.6.1.6 Enfleurage et extraction par les graisses chaudes.....	19
1.6.1.7 Extraction par les solvants.....	19
1.6.1.8 Extraction par le CO ₂ supercritique.....	20
1.6.1.9 Extraction assistées par les micro-ondes.....	20
1.7 Composition chimique des HE.....	21
1.7.1 Les terpènes.....	21
1.7.1.1 Les monoterpènes.....	21
1.7.1.2 Les sesquiterpènes.....	22
1.7.2 Les composés aromatiques.....	22
1.7.3 Les composés d'origine variées.....	22
1.8 Les facteurs influençant la composition chimique.....	22

1.8.1	Les facteurs intrinsèques.....	22
1.8.2	Les facteurs extrinsèques.....	23
Chapitre 2 : L'activité antioxydante et antimicrobienne		
2.1	Définition.....	24
2.2	Définition d'un antioxydant.....	24
2.3	Les substances antioxydantes.....	24
2.4	Les antioxydantes naturels.....	25
2.4.1	Les antioxydants enzymatiques.....	25
2.4.2	Les antioxydants non enzymatiques.....	25
2.5	Les antioxydants synthétiques.....	26
2.6	Définition des radicaux libres.....	26
2.7	Les différents types des radicaux libres.....	26
2.7.1	Les radicaux libres primaires.....	26
2.7.2	Les radicaux libres secondaires.....	27
2.8	Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydant.....	27
2.8.1	La méthode de DPPH.....	27
2.8.2	La méthode de FRAP.....	28
2.9	Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	29
2.10	Méthode de diffusion en disque.....	29
2.11	Méthode de dilution en milieu liquide.....	29
2.11.1	Dilution en bouillon.....	29
2.11.2	Dilution en gélose.....	30
Chapitre 3 : Partie Expérimentale		
3.	Evaluation de l'activité antioxydant.....	31
3.1	Test au DPPH.....	31
3.2	Matériels et méthodes.....	32
3.3	Mode opératoire.....	32
3.4	Expressions des résultats.....	34
3.5	Les résultats et Discussion.....	34
3.6	Conclusion.....	37
4.	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	38
4.1	Matériels utilisées.....	38
4.1.1	Accessoires.....	38
4.1.2	Les huiles utilisées.....	38
4.1.3	Appareils.....	38
4.1.4	Matériel biologique.....	38
4.1.5	Milieux utilisées.....	39
4.2	Purification.....	39
4.3	Méthode de diffusion sur disque.....	40
4.4	Lecture des résultats.....	40
4.5	Discussion	43
4.6	Conclusion.....	44
Conclusion Générale.....		45
Références Bibliographiques.....		46

Introduction générale

Introduction Générale

Depuis l'antiquité, l'homme n'a cessé d'utiliser les plantes que ce soit pour se nourrir ou pour traiter diverses maladies. Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante, dont la valorisation exige une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques [1]. Ces propriétés dues souvent à la fraction d'huile essentielle (HE), peuvent être mises à profit pour traiter des infections ou protéger des aliments.

Une HE est une substance odorante, de composition complexe, obtenue à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage [2].

Les HE s'opposent au développement des germes tels que les bactéries pathogènes y compris les souches habituellement antibiorésistantes, les champignons responsables des mycoses dont les doses actives sont en général faibles et se traduisent soit par l'inhibition de la croissance des micro-organismes, soit par un effet létal [3][4]. En outre, des études récentes ont montré que certaines huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales [5] et antiparasitaires [6].

L'Algérie par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément dans chaque saison de l'année. Pour cette raison, l'intérêt porté en regard de ces plantes, n'a cessé de croître au cours de ces dernières années. Notre travail présenté ici, reflète un de ces intérêts, et porte sur l'étude de cinq types de ces huiles essentielles à savoir: huile d'Olive, d'Ail, de Camphère, de Menthe Sauvage, de Girofle et de Rue.

L'étude de ces huiles est répartie en trois chapitres: le premier chapitre représente une partie bibliographique sur les huiles essentielles, le deuxième chapitre traite l'activité antioxydant et antimicrobienne de ces huiles et enfin le troisième chapitre englobe la partie expérimentale.

CHAPITRE 1 :
LES HUILES ESSENTIELLES

I Définition d'une huile essentielle (HE):

Le terme « huile essentielle » est défini à la fois par l'Agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) pour les usages pharmaceutiques et cosmétiques et par l'AFNOR/ISO pour les usages aromatiques et alimentaires.

1.1 Selon la Commission de la Pharmacopée européenne (2008)

« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » [7].

Selon la monographie de la Pharmacopée européenne, la matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contuse ou pulvérisée, à l'exception des fruits du genre Citrus qui sont toujours traités à l'état frais.

Les HE peuvent subir un traitement ultérieur approprié, destiné à éliminer partiellement ou totalement certains constituants. Elles peuvent être commercialement dénommées comme étant « déterpénées », « désesquiterpénées », « rectifiées » ou « privées de x ».

- Une huile essentielle déterpénée est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures monoterpéniques.
- Une huile essentielle déterpénée et désesquiterpénée est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques.
- Une huile essentielle rectifiée est une huile essentielle qui a subi une distillation fractionnée dans le but de supprimer certains constituants ou d'en modifier la teneur.
- Une huile essentielle privée de « x » est une huile essentielle qui a subi une séparation partielle ou complète d'un ou plusieurs constituants.

1.2 Selon AFNOR NF T 75-006 (1998)

« Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe de citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition... »

1.3 Selon AFNOR ISO 9236 : Matières premières aromatiques d'origine naturelle

« Produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par distillation sèche. » [8].

Généralement, Une huile essentielle ou « essence végétale » est l'essence volatile extraite de la plante par distillation. Il s'agit d'une substance complexe qui contient des molécules aromatiques dont l'action bénéfique sur la santé est étudiée et mise en pratique par l'aromathérapie. Les HE combinent des molécules très variées (en moyenne une centaine de molécules différentes pour une seule essence : terpènes, cétones, alcools, esters, aldéhydes...).

II Utilisation des huiles essentielles

Autrefois réservées à la parfumerie et à la médecine, les huiles essentielles sont aujourd'hui omniprésentes dans notre quotidien : dans des produits cosmétiques, dans des produits d'hygiène ou dans des parfums d'ambiance, dans des huiles aromatiques destinées aux massages bien-être, ou encore commercialisées sous forme de complexes visant à purifier notre air pollué. Elles trouvent également un intérêt grandissant auprès de l'industrie et de l'agroalimentaire.

On estime à environ 3000 le nombre d'huiles essentielles connues et autour de 300 celles ayant un intérêt commercial, principalement pour l'industrie du parfum et des arômes [9]. Elles présentent de multiples propriétés exploitables qui leur permettent de trouver des applications dans des domaines très variés. C'est par exemple le cas de l'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.) qui est utilisée comme agent de saveur par l'industrie cosmétique dans les dentifrices, mais aussi par l'agroalimentaire dans les liqueurs, chewing-gum, glaces et chocolats. En aromathérapie ce sont ses propriétés antalgiques, anesthésiques, toniques et stimulantes du système nerveux central ainsi que ses propriétés digestives qui sont recherchées. Quant à l'huile essentielle de basilic (*Ocimum basilicum* L.), elle est utilisée par l'industrie du parfum, dans l'agroalimentaire comme arôme pour sauces et condiments, et en médecine comme antispasmodique et régulateur du système nerveux [10].

2.1 En pharmacie

Depuis des milliers d'années, l'Homme utilise les huiles essentielles et plus généralement les plantes aromatiques pour se soigner. Aujourd'hui, les médecines dites naturelles rencontrent un succès grandissant auprès du public [10].

Il est important de bien différencier l'usage traditionnel des huiles essentielles, où elles sont utilisées telles quelles à des fins thérapeutiques ; des applications qu'en fait l'industrie pharmaceutique.

Tableau 1: Liste des huiles essentielles dont la délivrance au public est réservée aux pharmaciens selon [11][12][13].

Famille	Nom commun	Nom latin	Conditions particulières	Justification de la restriction
Amaranthaceae	Chénopode vermifuge	Chenopodium ambrosioides L. C. anthelminticum L.	Liste II des substances vénéneuses	Présence d'ascaridole (peroxyde monoterpénique toxique)
Apiaceae	Fenouil	Foeniculum vulgare L.	Délivrance sur ordonnance et inscription à l'ordonnancier	Peut servir à la fabrication de boissons alcooliques
	Anis étoilé ou Badiane	Illicium verum Hook. F.	Délivrance sur ordonnance et inscription à l'ordonnancier	
	Anis vert	Pimpinella anisum L.	Délivrance sur ordonnance et inscription à l'ordonnancier	
Astéraceae	Grande absinthe	Artemisia absinthium L.	Aucune	Présence de thuyone (cétone monoterpénique hautement convulsivante et
	Petite absinthe	Artemisia pontica L.	Aucune	
	Armoise	Artemisia vulgaris	Aucune	

	commune	L.		hallucinogène)
	Armoise blanche	Artemisia herba alba Asso	Aucune	
	Armoise arborescente	Artemisia arborescens L.	Aucune	
	Tanaisie	Tanacetumvulgare L.	Aucune	
Brassicaceae	Moutarde junciforme	Brassica juncea (L.) Czernj. et Cosson	Liste II des substances vénéneuses	Contient de l'allylthiocyanate (toxique, notamment sur le plan neurologique)
	Thuya du Canada ou Cèdre blanc	Thuya occidentalis L.	Aucune	Présence de thuyone (cétone monoterpénique hautement convulsivante et hallucinogène)
	Cèdre de Corée dit « cèdre feuille »	Thuya koraenensis Nakai	Aucune	
	Thuya	Thuya plicata Donn ex D. Don	Aucune	
Cupressaceae	Sabine	Juniperussabina L.	Liste I des substances vénéneuses	Neurotoxique, présence de thuyone (cétone monoterpénique hautement convulsivante et hallucinogène), de sabinol (alcool terpénique neurotonique) et du pyrogallol (bloque le système digestif des

Lamiaceae	Hysope	Hyssopus officinalis L.	Délivrance sur ordonnance et inscription à l'ordonnancier	Présence de thuyone (cétone monoterpénique hautement convulsivante et hallucinogène)
	Sauge officinale	Salvia officinalis L.	Aucune	
Lauraceae	Sassafras	Sassafras albidum (Nutt.) Nees	Aucune	Présence de safrol (toxique et cancérigène)
Rutaceae	Rue	Rutagraveolens L.	Liste I des substances vénéneuses	Présence de méthyl heptyl cétone (hautement neurotoxique et abortif)

2.2 Dans l'industrie alimentaire

Les premières utilisations des plantes aromatiques par l'homme se sont faites pour enrichir la cuisine. Les Egyptiens diffusaient des odeurs par le chauffage de mélanges contenant des huiles essentielles dans le but d'augmenter l'appétit des personnes malades [14].

Les huiles essentielles sont finalement devenues des arômes naturels et des rehausseurs de goût dans de nombreux domaines de l'agroalimentaire : liqueurs, boissons, confiseries, plats cuisinés [10]. S'il n'existe pas réellement de règle, on peut dire que les huiles essentielles plébiscitées pour des préparations salées sont issues d'épices et d'aromates alors que les huiles essentielles d'agrumes seront préférées pour des parfums plus sucrés [15].

La consommation d'huiles essentielles dans l'agroalimentaire suit la croissance de la consommation de produits préparés, ceci en réponse à une demande croissante de produits naturels de la part des consommateurs et à la mauvaise publicité faite aux conservateurs de synthèse. Le domaine le plus grand consommateur d'huiles essentielles est celui des boissons gazeuses. Celle qui est la plus utilisée dans le monde pour l'agroalimentaire est celle d'orange douce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) [10].

2.3 En agriculture

L'utilisation des huiles essentielles dans le domaine de l'agriculture est encore débutante mais est appelée à se développer. En effet, le contexte réglementaire actuel incite fortement à développer des produits phytosanitaires d'origine naturelle comme alternative aux moyens de lutte chimique. Les huiles essentielles sont actuellement testées sur différentes cibles : les insectes, les champignons, les bactéries, les adventices et également pour la conservation des semences. Des produits à base d'huiles essentielles sont déjà commercialisés dans certains pays d'Europe. L'huile essentielle de clou de girofle (*Syzygium aromaticum* L.) est par exemple proposée pour lutter contre des maladies de conservation des pommes et des poires. La menthe verte (*Mentha spicata* L.) est utilisée pour inhiber la germination des pommes de terre. L'orange douce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) est proposée contre de nombreuses maladies et insectes (mildiou, oïdium, rouille blanche, cicadelles, aleurodes...). De nouveaux produits à base d'huiles essentielles tardent à arriver sur le marché en raison d'une réglementation complexe. En effet, leur autorisation est soumise à la réglementation des produits phytopharmaceutiques, nécessitant d'apporter la preuve de l'efficacité et de la non dangerosité du produit. L'utilisation des huiles essentielles en agriculture biologique nécessite également leur inscription sur une liste dite « positive » de produits autorisés [16] [17].

2.4 En cosmétologie et parfumerie

Les huiles essentielles, matières premières par excellence des parfumeurs, sont classées en fonction de leurs odeurs. Ainsi les huiles essentielles de citron, de bergamote ou encore de lavande constitueront la note la plus éphémère, dite note de tête. Des essences fleuries comme celles de rose ou de néroli participeront à l'élaboration de la note de cœur. Enfin, la note de 20 fonds, la plus durable des trois, comportera plutôt des essences boisées ou épicées comme le santal ou la cannelle [15].

Aujourd'hui, la parfumerie cosmétologique, principalement développée en Amérique du Nord et en Europe, demande une grande variété de produits en faible quantité et au prix généralement élevé. À l'inverse, la parfumerie technique (produits d'entretien ménagers et industriel à qui les huiles essentielles offrent une image verte, de propreté et d'antisepsie) consomme de grandes quantités pour des coûts relativement faibles [10]. Pour cette raison, la cosmétologie reste attachée aux huiles essentielles et aux nuances subtiles qu'elles apportent alors que la parfumerie technique se tourne de plus en plus vers les produits de synthèse dont elle apprécie les prix et la disponibilité constante [18].

Tableau 2 : Exemples d'huiles essentielles pouvant être utilisées dans les produits cosmétiques [15]

Famille	Nom latin	Nom commun	Composés majoritaires	Avantages / Inconvénients
Cupressaceae	<i>Juniperus communis</i> L.	Genévrier	α -pinène, limonène	Odeur forte/désagréable
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Thym (chémotypes phénoliques)	Thymol, carvacrol	Odeur forte/désagréable
	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill	Lavande	Acétate de linalyle, linalol	Incorporation en tant qu'actif
	<i>Origanum vulgare</i> L.	Origan	Carvacrol, thymol	Odeur forte/désagréable
Myrtaceae	<i>Melaleuca alternifolia</i> Che	Arbre à thé	Terpinène-4-ol, γ -terpinène	Odeur forte/désagréable
Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Citronnelle	Néral, géranial	Pro-oxydant

III Les plantes Aromatiques

Certaines plantes sont capables, à partir des sucres issus de la photosynthèse et des nutriments puisés dans le sol, de synthétiser des essences aromatiques. C'est le soleil qui fournit aux plantes l'énergie nécessaire à la synthèse de ces substances. Cela explique pourquoi la majorité des plantes aromatiques poussent dans des zones ensoleillées, chaudes, voire sèches. On peut citer par exemple les régions méditerranéennes avec les plants aromatiques comme thym, le romarin ou la lavande.

Les plantes aromatiques ont en commun le fait d'être odorantes. Mais toutes, ne sont pas forcément capables de produire suffisamment d'essences pour que l'on puisse les extraire sous forme d'HE. Ainsi, sur 4000 plantes sachant synthétiser des essences aromatiques, seulement quelques certaines d'entre elles en produisent suffisamment pour pouvoir être exploitées.

Tableau 3 : Quantités d'huile essentielle obtenues à partir d'une tonne de plantes fraîches [19]

<i>Camomille romaine</i>	<i>Chamaemelumnobile</i>	200g	0.02%
<i>Eucalyptus officinal</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	20 kg	2%
<i>Giroflier, arbre au clou</i>	<i>Syzygium aromaticum (bouton floral)</i>	160 kg	16%
<i>Badiane, anis étoilée</i>	<i>Illicium verum (fruit)</i>	50 kg	5%
<i>Lavande vraie</i>	<i>Lavandulavera</i>	6 kg	0.60%
<i>Baume mélisse</i>	<i>Melissa officinalis (plante)</i>	80 g	8%
<i>Marjolaine à coquilles</i>	<i>Origanummajorana</i>	3 kg	0.30%
<i>Rose de Damas</i>	<i>Rosa damascena</i>	3 g	0.0003%
<i>Thym commun</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	1 kg	0.10%

3.1 Les grandes familles de plantes aromatiques

Les espèces aromatiques sont retrouvées en grande majorité chez les **végétaux supérieurs** et dans un nombre limité de familles.

- Les *Lamiacées* : thym, lavande, sauge, menthe, romarin, marjolaine, sarriette...
- Les *Myrtacées* : eucalyptus, giroflier...
- Les *Rutacées* : citron, orange, bergamote...
- Les *Cupressacées* : cyprès, genévrier...
- Les *Pinacées* : sapin, pin, cèdre...
- Les *Apiacées* : coriandre, fenouil, anis, carvi...
- Les *Astéracées* : camomille romaine, matricaire, armoise, estragon, absinthe...
- Les *Lauracées* : laurier noble, cannelle de Ceylan, bois de rose camphrier, ravintsara...
- Les *Géraniacées* : géranium bourbon et géranium rosat...
- Plus rarement, les *Poacées* (citronnelle de Java, palmarosa, lemon-grass), les *Ericacées* (gaulthérie), les *Annonacées* (ylang-ylang), *Zingibéracées* (gingembre)... [15][18].

D'un point de vue chimique, les composés produits par les plantes sont subdivisés en deux groupes de molécules : les **métabolites primaires** et les **métabolites secondaires** [11].

- Les **métabolites primaires** se trouvent dans toutes les cellules végétales. Ils sont indispensables pour la vie de la plante : sucre, lipides, protéines, acides aminés.

- Les **métabolites secondaires** n'ont qu'une répartition limitée dans la plante et ne font pas partie des matériaux de base de la cellule. Ces composés ne se trouvent normalement que dans des tissus ou organes particuliers à des stades précis du développement. Leur action - 19 - est déterminante pour l'adaptation de la plante au milieu naturel : agents protecteurs contre les stress physiques, défense contre les agressions extérieures, pigmentation de la plante pour capter l'énergie solaire ou à l'opposé protéger l'organisme contre les effets nocifs induits par les radiations solaires...

Il existe différentes classes de métabolites secondaires dont 3 dominent la phytochimie des plantes :

- Les **alcaloïdes** comme la morphine, la caféine, la nicotine, la cocaïne, l'atropine
- Les **terpènes**, c'est la plus grande catégorie de métabolites secondaires avec plus de 22 000 molécules. Elle contient les hormones végétales, les pigments, les stérols, les hétérosides et une grande partie d'**huiles essentielles**.
- Les **substances phénoliques** comme les flavonoïdes, les tanins, la lignine, les coumarines.

Les huiles essentielles et les essences sont donc des métabolites secondaires appartenant principalement à la classe des terpènes et des composés présentant un noyau aromatique.

3.2 Répartition et localisation de l'huile essentielle

Les huiles essentielles sont produites par des cellules végétales spécialisées et peuvent être stockées dans tous les organes végétaux :

- les **feuilles** : eucalyptus, citronnelle, laurier noble...
- les **fleurs** : camomille, lavande...
- les **zestes** : citron, orange, bergamote...
- le **bois** : bois de rose, santal...
- l'**écorce** : cannelle...
- la **racine** : vétiver...
- les **fruits** : anis, badiane...
- les **rhizomes** : curcuma, gingembre...
- les **graines** : muscade...

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiquement spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. On retrouve par exemple :

- les **cellules à huiles essentielles** : chez les Lauracées et les Zingibéracées.
- les **poils sécréteurs** : chez les Lamiacées.
- les **poches sécrétrices** : chez les Myrtacées et les Rutacées.
- les **canaux sécréteurs** : chez les Apiacées et les Astéracées.

IV Origine et rôle des HE

Toutes les plantes ont potentiellement la capacité de produire des essences, le plus souvent à l'état de traces. Les plantes dites « aromatiques » sont celles qui en produisent en quantité relativement importante. La teneur dans la plante est alors de l'ordre de 1%. Lawrence estime qu'il y en aurait environ 17 500, presque exclusivement chez les végétaux supérieurs [9]. Bien que les plantes aromatiques se répartissent sur un grand nombre de familles botaniques,

certaines concentrent un grand nombre d'espèces concernées. Citons par exemple les Lamiacées, les Astéracées, les Apiaceae, les Cupressacées, les Rutacées, les Lauracées, les Myrtacées [10].

La fonction exacte de l'essence pour la plante est encore mal connue mais elle semble jouer un rôle important dans son adaptation à l'environnement [12]. Certains composés volatiles produits par les plantes et que l'on retrouve dans les essences vont moduler le comportement des microorganismes, champignons, insectes et herbivores. Ainsi, les essences pourraient être des outils de défense contre les prédateurs, de répulsion des insectes et herbivores ou encore de protection contre les pathogènes. Elles permettraient également d'attirer des insectes pollinisateurs ou des disséminateurs de graines. Elles seraient impliquées dans des processus allélopathiques (ensemble d'interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives d'une plante sur une autre) et des interactions tritrophiques. De telles relations mettent en jeu trois niveaux d'une chaîne alimentaire, le plus souvent une espèce végétale, un insecte herbivore et son propre prédateur ou parasite [13][20].

Les essences jouent également un rôle pour la plante elle-même. On estime que certains de leurs composants seraient des messagers internes ou encore des intermédiaires du métabolisme de la plante. Enfin, les essences pourraient être des sources d'énergie lorsque l'activité de photosynthèse n'est plus suffisante [14].



Figure 1: Exemples d'huiles essentielles issues de différentes parties de plantes.

La synthèse des essences se fait au sein de différents tissus sécréteurs présents dans tous les organes de la plante : les fleurs (bergamotier), les feuilles (menthe poivrée), mais aussi dans

des écorces (cannelier de Ceylan), des bois (santal), des racines (angélique), des rhizomes (gingembre), des fruits (badiane), ou encore des graines (muscade). Ces tissus peuvent également produire des résines, de composition chimique proche des huiles essentielles et également insoluble dans l'eau, mais non volatiles.

V Méthodes d'obtention des huiles essentielles

5.1 Techniques d'extraction

Une fois la matière première végétale identifiée, il convient d'utiliser une méthode d'extraction adaptée pour son obtention.

La neuvième édition de la Pharmacopée européenne indique que les huiles essentielles sont obtenues par :

- Hydrodistillation
- Distillation sèche
- Procédé mécanique sans chauffage

Il existe cependant d'autres méthodes destinées à des utilisations dans d'autres domaines que la santé. De ce fait, à partir d'une même matière première végétale, une multitude d'extraits différents peuvent être réalisés, parmi lesquels on retrouve les huiles essentielles. Le schéma suivant montre les principales possibilités d'extractions des composés aromatiques.

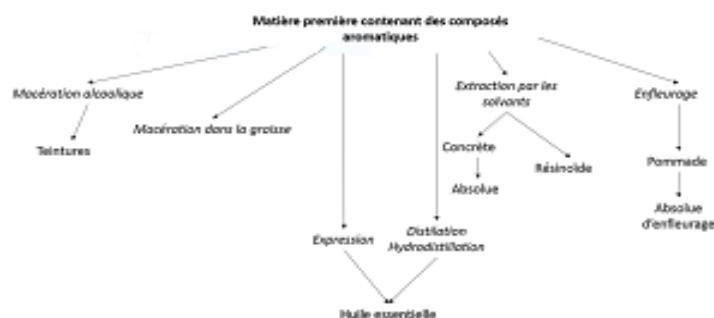


Figure 2: Différents extraits aromatiques obtenus à partir de matières végétales

Il existe pour chacune de ces méthodes d'extraction de nombreuses variantes. À l'heure actuelle, la distillation reste la méthode de référence.

5.1.1 Hydrodistillation

La distillation est un processus ancien puisque les premières traces connues remonteraient à 5000 ans dans la vallée de l'Indus [12]. Cette technique d'extraction est connue depuis l'antiquité, a été transmise par les Arabes et a été perfectionnée par les industriels de Grasse (Alpes-Maritimes). Cette méthode, une des plus anciennes mais aussi une des plus simples, est depuis peu délaissée au profit de nouveaux procédés de distillation pour des raisons de qualité et de coût de production [21]. Aujourd'hui, c'est une méthode normée, que ce soit pour l'extraction des huiles essentielles ou pour le contrôle de leur qualité [22]. Le principe général (représenté dans la figure..) de l'hydrodistillation est le suivant : On chauffe dans un alambic jusqu'à ébullition une suspension d'une matière première végétale dans l'eau de sorte que la vapeur d'eau entraîne les substances volatiles de la plante. Cette vapeur est récupérée et condensée. L'huile essentielle constituée de ces différentes substances volatiles se sépare par gravité de l'eau à laquelle elle n'est pas miscible.

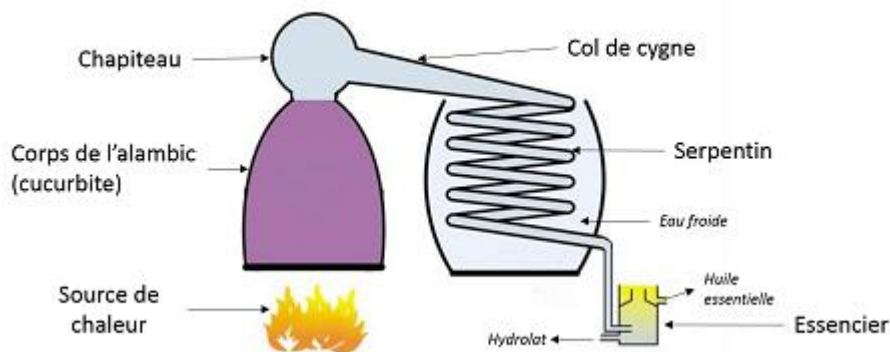


Figure 3: Schéma d'un alambic

La chaleur qui s'applique sur la matière première végétale permet l'éclatement des cellules et la libération des molécules contenues. Il se forme un mélange azéotrope comprenant l'eau et les molécules volatiles dont la température d'ébullition est proche des 100°C alors que la température d'ébullition des molécules aromatiques seules est souvent très supérieure [23]. L'hydrodistillation permet donc de limiter le chauffage à appliquer sur la matière première. Ce procédé d'extraction présente plusieurs avantages. Outre sa relative simplicité de mise en œuvre, c'est son faible coût qui en fait une méthode d'intérêt. De plus, la matière végétale étant en suspension dans l'eau, on peut lui appliquer un brassage qui assure la pénétration de l'eau en son cœur, là où la vapeur d'eau utilisée dans d'autres méthodes, ne peut pénétrer.

C'est par exemple le cas pour les pétales de roses qui ont tendances à s'agglomérer, ce qui rend l'extraction de cette huile essentielle insatisfaisante par entraînement à la vapeur. Cependant, un certain nombre d'inconvénients ont fait que cette méthode est peu à peu remplacée par d'autres. Cette méthode ne s'applique qu'à une plus petite échelle que d'autres techniques. C'est également un procédé beaucoup plus lent que l'entraînement à la vapeur et qui nécessite de ce fait un apport d'énergie plus important, ce qui relativise le faible coût de l'installation. Dans cette technique, la matière première baigne dans l'eau, à température élevée et pendant plusieurs heures, ce qui facilite la survenue d'un certain nombre de transformations au sein de l'essence. Les esters sont en partie hydrolysés, les hydrocarbures monoterpéniques acycliques et les aldéhydes ont tendance à polymériser. Certains composés oxygénés tels que les phénols se dissolvent en partie dans l'eau contenue dans l'alambic et ne sont donc pas extraits [24][25].

5.1.2 Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est une variante plus récente de distillation dans laquelle il n'y a pas de contact direct entre la matière végétale et l'eau. Ici, de la vapeur d'eau est produite dans une chaudière séparée, puis injectée à la base de l'alambic dans lequel se trouve la plante. La vapeur remonte dans l'alambic et traverse la plante. De la même façon que dans l'hydrodistillation, on assiste à un éclatement des cellules et à la formation d'un mélange azéotrope, récupéré en haut de la cuve et condensé [23].

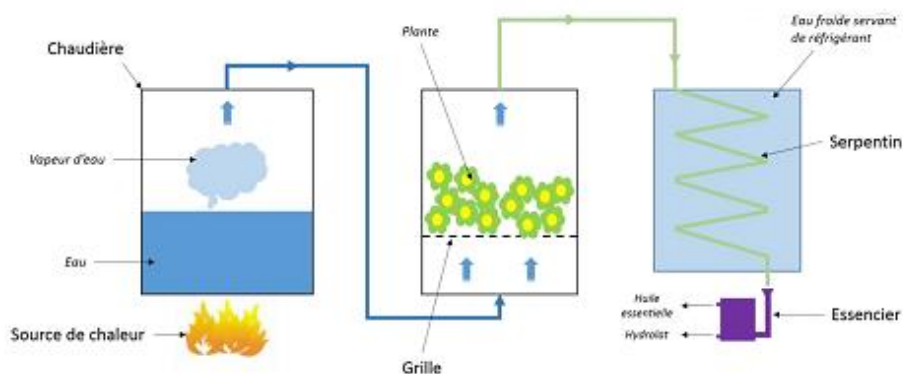


Figure 4: Schéma d'une installation d'entraînement à la vapeur

L'un des principaux intérêts de cette méthode par rapport à l'hydrodistillation est la préservation de la qualité de l'essence. En effet, dans le cas présent, la plante ne macère pas dans l'eau, ce qui limite les phénomènes d'hydrolyse mais également de solubilisation de certains composés hydrosolubles (comme les phénols) qui sont donc mieux extraits. Le risque de dégradation par la chaleur est également mieux maîtrisé puisque le chauffage ne se fait pas directement sur la cuve contenant la matière première végétale [12]. La génération de la vapeur dans une chaudière externe permet d'en contrôler la quantité, la pression ou encore la température à laquelle se fait l'extraction ; elle permet également de réduire le temps d'extraction et l'apport énergétique nécessaire. Enfin, l'entraînement à la vapeur permet généralement des extractions à plus grande échelle. Cependant, cette méthode trouve sa limite dans le coût des installations nécessaires à sa mise en œuvre, bien plus important que pour l'hydrodistillation. Cela pose un problème de rentabilité pour les huiles essentielles présentes en grande quantité et à faible prix sur le marché. Un problème d'accessibilité du matériel se présente également dans les zones pauvres ou particulièrement reculées [25].

5.1.3 Vapo-hydrodistillation

Il s'agit d'une variante à mi-chemin entre l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur dans laquelle la matière végétale et l'eau se trouvent dans la même enceinte mais ne sont pas en contact. L'eau est portée à ébullition par le chauffage de la cuve, se transforme en vapeur et passe au travers de la plante, posée sur une grille au-dessus de l'eau.

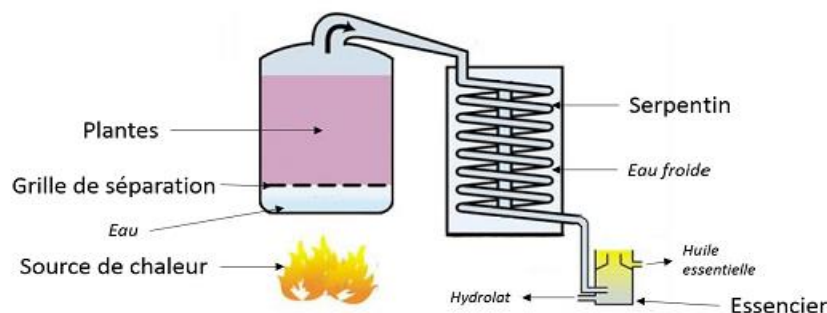


Figure 5: Schéma d'une installation de vapo-hydrodistillation

Tableau 4: Intérêts et inconvénients des différents procédés de distillation [21].

	Hydrodistillation	Vapo-hydrodistillation	Entrainement à la vap
<i>Type d'alambic</i>	Simple, de faible coût, transportable et facilement installable dans les régions de production		De grande dimension pour augmenter la cadence de distillation
<i>Type de matériel végétal</i>	Fleurs principalement, Inadapté si présence de composés saponifiables, hydrosoluble ou à température d'ébullition élevé	Plantes entières et feuillages	Tous sauf matériel finement broyé. Adapté pour les composés à point d'ébullition élevé
<i>Conditions de diffusion</i>	Bonnes, surtout si le matériel végétal est totalement immergé et mobile dans l'eau	Bonnes, si la vapeur circule de manière homogène dans la matière végétale	Bonnes, si la vapeur est légèrement mouillée et si elle diffuse de manière homogène dans le matériel végétal

Température dans l'alambic	Proche de 100°C, risque d'endommagement du matériel végétal par contact direct avec la cuve	Autour de 100°C	Modulable, peut dépasser 100°C
Vitesse de distillation	Relativement faible	Assez bonne	Elevée
Hydrolyse	Vitesse d'hydrolyse d'esters élevée	Moindre problème (contact plante/eau limité)	Faible en général
Rendement	Souvent relativement faible	Bon en l'absence de mouillabilité importante de la plante	Bon si l'extraction est correctement conduite
Qualité de l'huile	Dépend des conditions	Toujours bonne	Bonne si l'extraction est correctement conduite

5.1.4 Distillation sèche

La distillation sèche est une méthode d'extraction des huiles essentielles reconnue par la pharmacopée européenne mais on ne retrouve dans la pratique que peu de documents s'y rapportant. Cette technique, très peu utilisée, consiste en un chauffage doux de la matière première, sans eau ni solvant organique. Les substances volatiles sont ensuite condensées et récupérées.

La température est ici inférieure à 100°C, ce qui limite une nouvelle fois les phénomènes de dénaturation liés au chauffage. L'absence d'eau permet également de préserver les substances volatiles de l'hydrolyse. On obtient par ce procédé une huile essentielle de grande qualité, assez fidèle à l'essence présente dans la plante, mais avec un rendement très faible. C'est donc une méthode qui convient aux matières premières particulièrement fragiles [21][23].

5.1.5 Expression à froid

L'expression à froid correspond le troisième procédé d'extraction décrit par la pharmacopée européenne comme un « procédé mécanique sans chauffage ». Elle ne concerne

que la production des huiles essentielles à partir de fruits frais du genre Citrus. C'est la méthode de production la plus simple.

On regroupe sous le terme « expression à froid » tout processus permettant par des moyens mécaniques et sans chauffage d'extraire les huiles essentielles des fruits des agrumes. En règle générale, c'est l'huile essentielle présente dans les glandes oléifères de l'épicarpe que l'on cherche à récupérer. Les moyens utilisés vont de la simple abrasion du zeste du fruit au broyage de la peau dans son intégralité. Cette méthode étant la plus respectueuse du produit de départ, le terme « essence » convient parfaitement pour désigner les huiles essentielles obtenues par ce procédé. En effet, aucune modification n'a lieu au cours de l'extraction.

Les méthodes de productions ayant considérablement évoluées, les essences de certains agrumes sont peu à peu devenues des sous-produits de la production de jus de fruits. S'il est de ce fait nécessaire de porter une attention particulière à la qualité des huiles essentielles obtenues, cela permet également d'en baisser considérablement le coût [26].

5.1.6 Enfleurage et extraction par les graisses chaudes

L'enfleurage est une ancienne technique d'extraction des parfums des fleurs qui a principalement été utilisée dans la région de Grasse (Alpes-Maritimes) jusque dans les années 1930.

Il s'agit d'une extraction à froid par la graisse. Celle-ci est étalée sur une surface plate (tamis ou plateau), les fleurs sont déposées une à une et à la main à sa surface. Par son grand pouvoir d'absorption, la graisse fixe le parfum. On pratique des remplacements successifs des fleurs jusqu'à saturation de la graisse [17]. La matière grasse est ensuite récupérée pour former une « pommade ». Cette pommade subit des traitements successifs à l'alcool qui permettent un passage progressif des substances odorantes de la graisse vers l'alcool, qui sera par la suite éliminé pour donner l'absolu d'enfleurage. L'enfleurage n'est donc pas une technique d'obtention des huiles essentielles, mais de bases parfumées utilisées dans le domaine de la parfumerie.

Cette technique est particulièrement intéressante pour les fleurs qui continuent à dégager leur parfum après la cueillette, comme par exemple la fleur de jasmin (*Jasminum grandiflorum* L.). Dans le cas de cette espèce, les fleurs sont remplacées toutes les 24h pendant environ 70 jours [27].

5.1.7 Extraction par les solvants

L'extraction par les solvants est un procédé inspiré de l'enfleurage qui utilise des solvants non aqueux. Il peut s'agir de l'hexane, d'éthers de pétrole, d'huiles, de gaz... Le solvant idéal devant répondre aux critères suivants [27] :

- Être sélectif : extraire les molécules aromatiques mais pas les molécules indésirables comme les pigments.
- Avoir une température d'ébullition basse, pour permettre une élimination simple.
- Être chimiquement inerte vis-à-vis des substances à extraire.
- Ne pas être miscible à l'eau, qui rendrait la purification de l'extrait plus délicate.
- Être peu coûteux.
- Ne pas présenter de contre-indication dans les domaines d'application de l'extrait obtenu.
- Ne pas être inflammable.
- Présenter la plus faible toxicité possible.

Aucun solvant ne remplit la totalité de ces conditions, mais le plus utilisé est l'hexane. L'intérêt de ces solvants est leur pouvoir d'extraction des parfums très supérieur à celui de l'eau. Cependant, ils n'entraînent pas seulement les composés volatils.

Le point négatif des solvants organiques est leur toxicité. Cela réduit les champs d'application des extraits obtenus (appelés « concrètes »), notamment dans les domaines pharmaceutiques et agroalimentaires [28].

5.1.8 Extraction par le CO₂ supercritique

L'extraction par le CO₂ supercritique est un cas particulier d'utilisation d'un solvant, apparue dans les années 1980. La technique met à profit une propriété originale du CO₂ qui, au-delà du point critique (pression de 73,8 bars et température de 31,1°C), se trouve dans un état intermédiaire entre le liquide et le gaz lui conférant un important pouvoir d'extraction des molécules aromatiques.

Le principe général de la méthode est le suivant. Le CO₂, porté aux conditions de température et de pression souhaitées, chemine au travers de la matière première végétale dont elle tire et volatilise les molécules aromatiques. Le mélange passe ensuite dans un séparateur, où le CO₂ est détendu et se vaporise. Il est soit éliminé, soit recyclé. L'extrait se condense et est récupéré [29].

5.1.9 Extractions assistées par les micro-ondes

L'utilisation des micro-ondes pour l'obtention des huiles essentielles est une méthode décrite au début des années 1990. Il s'agissait alors d'une hydrodistillation par les micro-ondes, sous vide. La matière végétale est placée dans une enceinte close et chauffée par les micro-ondes. Les molécules volatiles sont entraînées par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau contenue dans le végétal. La vapeur est ensuite récupérée et traitée de la même façon que dans les méthodes traditionnelles. Le temps d'extraction, et par extension l'énergie nécessaire, a ainsi été diminué d'un facteur 5 à 10 selon les plantes ; Il faut par exemple quinze minutes pour 40 traiter 2kg de menthe poivrée (*Mentha x piperita* L.) avec un rendement de 1%, contre deux heures pour un même résultat par hydrodistillation [27].

Aujourd'hui, la tendance est plus à l'hybridation des techniques. On parle de méthodes d'extractions assistées par micro-ondes [28].

Dans le cas de l'hydrodistillation, c'est le ballon où est chauffé le mélange d'eau et de matière végétale qui se trouve dans l'enceinte de l'appareil micro-onde. On observe alors une importante réduction du temps d'extraction avec une légère augmentation du rendement d'extraction, sans différence significative dans la composition chimique de l'huile essentielle. La réduction du temps de contact avec l'eau et la réduction de la température de chauffage permettent de mieux préserver les composés oxygénés de l'essence [29][30] [31].

VI Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont un mélange de constituants qui appartiennent à trois catégories de composés: terpénique, aromatique et composé d'origine variée [29].

6.1 Les terpènes

Des composés largement répandus dans le règne végétal, caractérisés par la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone à la formule générale $(C_5H_8)_n$ [32].

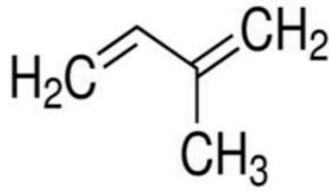


Figure 6: structure chimique de l'isoprène

6.1.1 Les monoterpènes

Dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%) sont les plus simples constituants des terpènes [33], ils comportent deux unités isoprène (C₅H₈) selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acyclique, monocyclique ou bi cyclique.

6.1.2 Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés hydrocarbures de formule C₁₅. Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurelles, acycliques, monocycliques, bicyclique, tricyclique, polycyclique [34]. Ils sont moins volatils et présentent des points d'ébullition plus élevés que les monoterpènes [35].

6.2 Les composés aromatiques

Dérivés du phénylpropane (C₆-C₃), ils sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Constitué d'un noyau aromatique lié à une chaîne de trois carbonées [36]. Sont des composés responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles, nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle [37].

6.3 Les composés d'origines variées

En général ; les composés d'origine variée de faible masse moléculaire, entraînable lors de l'hydrodistillation sont des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée. Porteur de différentes fonctions [38].

Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras, de terpènes. D'autres composés azotés ou soufrés peuvent subsister, mais sont rares [39].

VII Les facteurs influençant la composition chimique

Plusieurs facteurs peuvent influencer le rendement des huiles essentielles ainsi que leurs compositions chimiques. Certains facteurs sont relatifs à la plante productrice, d'autres sont en relation avec son environnement et d'autres sont liés aux conditions de l'extraction et de stockage.

7.1 Les facteurs intrinsèques

Facteur structurel : le potentiel et la composition de l'essence dépendent de l'organe. Ainsi la racine, l'écorce et les feuilles peuvent produire des HE différents [40].

Facteur évolutif : le cycle de la plante (des poussées de biosynthèse engendrent une accumulation plus ou moins importante de certains constituants des chaînes métaboliques au cours des saisons, des mois, voire des journées. Le profil chimique de l'huile essentielle de menthe, par exemple, peut être différent au cours de la journée [41].

Facteur génotypique : Les variations de la composition des HE provenant d'un même phénotype se développant dans le même environnement sont l'expression de différences génotypiques. Elles peuvent être attribuées à des hybridations, à un polymorphisme génétique ou à des mutations (polyploidies, aberration chromosomique) [42].

7.2 Les facteurs extrinsèques

La composition et le rendement des huiles essentielles est influencé par différents facteurs tel que la méthode d'extraction [43] et le stockage des matières premières avant distillation [44].

Les conditions environnementales peuvent influencer le rendement et la qualité des huiles essentielles, dans les mois à basse température et de la courte photopériode, la production des composés volatils sont réduits. De plus, plusieurs phytopathologies sont responsables d'une instabilité de production des huiles essentielles [45].

CHAPITRE 2 :
L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

2.1 Définition

Les cellules et les tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dues à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène [46].

Les antioxydants d'origine alimentaire contribuent vraisemblablement à la défense de l'organisme contre le stress oxydant et ses conséquences. A ce titre, les polyphénols, particulièrement abondants dans une alimentation riche en produits végétaux, pourraient jouer un rôle protecteur important [47].

2.2 Définition d'un antioxydant

On désigne par antioxydant toute substance, qui lorsqu'elle est présente en faible concentration dans la cellule, est capable de retarder, de neutraliser ou de réduire l'oxydation et les dommages causés par les radicaux libres sur les composés cellulaires [48]. La capacité antioxydante des huiles essentielles est étroitement liée à tout le contenu phénol.

2.3 Les substances antioxydantes

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules non enzymatiques. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires dans le but d'atténuer ou d'empêcher les effets nocifs des ERO et des radicaux libres.

Notre organisme réagit donc de façon constante à la production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule.

2.4 Les antioxydants naturels

2.4.1 Les antioxydants enzymatiques

La cellule est pourvue de systèmes de défense très efficaces. Plusieurs enzymes peuvent catalyser des réactions de détoxification des différents pro-oxydants. Les antioxydants enzymatiques sont capables d'éliminer les radicaux libres primaires de façon permanente et efficace, en transformant l'anion OH° et le H_2O_2 en produits non toxiques : l'eau et l'oxygène moléculaire. Les antioxydants enzymatiques sont principalement trois enzymes : la superoxyde dismutase, la catalase et les peroxydases.

En état de stress oxydant, la production des radicaux libres primaires augmente très fortement, de ce fait, les systèmes enzymatiques primaires qui ont une vitesse maximum d'élimination des radicaux libres primaires, sont débordés. Ces radicaux libres primaires non éliminés vont alors oxyder les constituants cellulaires. Ce qui engendre la formation de radicaux libres secondaires (ROO°) qui sont capables de réaction d'oxydation en chaîne conduisant à la destruction des cellules. Ces phénomènes d'oxydation en chaîne, peuvent être ralentis par des antioxydants secondaires non enzymatiques qui sont apportés par l'alimentation.

2.4.2 Les antioxydants non enzymatiques

Divers piègeurs de radicaux libres non enzymatiques peuvent prendre en charge la détoxification d'un grand nombre de radicaux libres. Ces composés sont facilement oxydables, relativement stables et conduisent à des dismutations permettant l'arrêt des réactions radicalaires en chaîne. Ce système de protection peut être à la fois membranaire (vitamine E, A) ou cytosolique et extracellulaire (glutathion, vitamine C).

Certains éléments minéraux exercent indirectement un rôle antioxydant en agissant comme des cofacteurs. Ainsi le cuivre, le zinc et le fer sont des cofacteurs pour la superoxyde dismutase, le fer est également un cofacteur pour la catalase et le sélénium est le cofacteur du glutathion- peroxydase.

Aussi, parmi les antioxydants végétaux, les polyphénols apparaissent parmi les plus efficaces quant à leurs effets protecteurs dans l'organisme.

Les polyphénols, suscitent un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales, est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. En effet, un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que cancers, maladies cardio-vasculaires, ostéoporose ou maladies inflammatoires.

2.5 Les antioxydants synthétiques

Les antioxydants synthétiques tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ) sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques. En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomales du foie et des organes extra-hépatiques.

2.6 Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne.

2.7 Les différents types des radicaux libres

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer deux grandes classes de radicaux libres : les radicaux libres primaires, directement formés à partir de l'oxygène et les radicaux libres secondaires ou organiques générés par l'action des radicaux libres primaires.

2.7.1 Les radicaux libres primaires :

Les radicaux libres primaires sont les plus dangereux car ils sont directement formés à partir de l'O₂. L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ERO). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde (O₂^{•-}), radical hydroxyle (OH[•]), monoxyde d'azote (NO[•]) mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet (¹/₂ O₂), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le peroxy-nitrite (ONOO⁻).

2.7.2 Les radicaux libres secondaires :

Ils ne sont pas formés spontanément, ils sont formés par l'action d'un radical libre primaire sur un composant cellulaire (acides nucléiques, lipides membranaires, protéines). Ce sont les radicaux alkoxy (RO[•])⁻ et peroxy (ROO[•])⁻ qui se forment lors du métabolisme d'un certain nombre de substances étrangères (xénobiotiques). Ainsi, des composés tels que le 1,2-dibromométhane (additif présent dans l'essence), ou le paracétamol peuvent être métabolisés en radicaux libres, et être ainsi la cause de lésions dans l'organisme.

2.8 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

L'examen des données bibliographiques fait apparaître de nombreuses méthodes spectrométriques de détermination de l'activité antioxydante. Parmi les tests les plus utilisés, nous présenterons ceux couramment cités et qui ont été utilisés au cours de notre étude :

- la méthode au DPPH (Diphényl Picrylhydrazyle)
- la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

2.8.1 La méthode au DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque [49][50], le radical DPPH en solution est coloré en violet. En présence d'antioxydant (donneurs de proton); le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable (Figure 4). Le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre UV à 517 nm, la diminution de coloration de la solution

qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant. L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition.

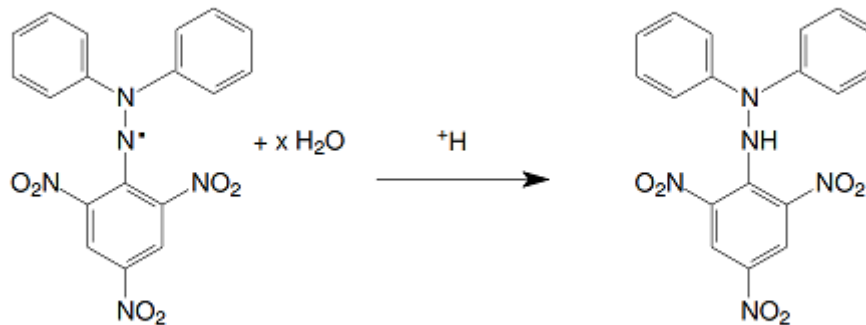


Figure 7: Principe du test DPPH

2.8.2 La méthode de FRAP

Les métaux sont en général les meilleurs initiateurs de réactions en chaîne susceptibles de déséquilibrer la balance du stress oxydatif en faveur de prooxydants. Parmi ces métaux, le cation ferrique Fe^{3+} est le plus actif et on le retrouve souvent dans les aliments d'origine végétale ou animale. Le pouvoir réducteur d'un extrait vis-à-vis du cation ferrique peut être considéré comme un indicateur de son activité antioxydante. L'activité antioxydante, non enzymatique, d'inhibition de radicaux libres et de la peroxydation lipidique, est généralement contrôlée par des réactions d'oxydo-réduction ; la méthode FRAP peut être une bonne méthode pour investiguer le pouvoir antioxydant d'un extrait en évaluant son pouvoir de réduction du cation ferrique.

La capacité totale en antioxydant de chaque extrait de plante est déterminée par la méthode Hinneburg adaptée [45]. Le dosage consiste à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique $[(Fe(III)-TPTZ)]$ de couleur jaune en complexe ferreux $[(Fe(II)-TPTZ)]$ de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron (Figure 5). La variation de la coloration est mesurée à 700 nm.

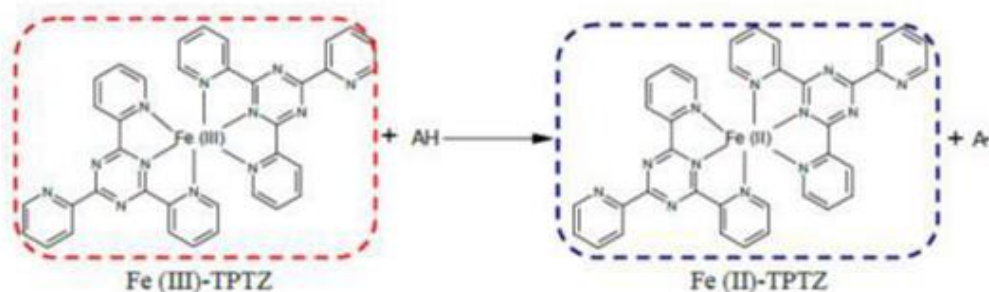


Figure 8: Mécanisme réactionnel du test FRAP d'après [45].

2.9 Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination de l'activité antimicrobienne, *in vitro* : une méthode de diffusion en disque dans un milieu gélosé et les méthodes de dilution (méthode de micro-dilution en bouillon pour les bactéries et *C. albicans*, la méthode de dilution en milieu gélosé pour les champignons), selon le Comité national des normes du laboratoire clinique [11]. Les zones d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la gentamicine et de l'amphotéricine B ont été également déterminées dans des expériences parallèles afin de contrôler la sensibilité des micro-organismes d'essai.

2.9.1 Méthodes de diffusion en disque

La méthode de diffusion en milieu gélosé a été standardisée par le Comité national des normes pour les laboratoires cliniques (NCCLS). Cette méthode est aussi appelée méthode de l'aromatogramme, ou technique de l'antibioaromatogramme ou encore méthode de Vincent [51]. La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient très diluée, il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée. Le diamètre de cette zone d'inhibition est corrélé avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai. Généralement, plus la zone d'inhibition est petite, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance des microorganismes est faible.

2.9.2 Méthode de dilution en milieu liquide

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI, habituellement exprimée en mg/ml ou mg/L).

2.9.2.1 Dilution en bouillon

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 ml (macro dilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de micro-titration (microdilution).

2.9.2.2 Dilution en gélose

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de β en β , suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte.

CHAPITRE 3 :
PARTIE EXPERIMENTALE

3. Evaluation de l'activité antioxydante

3.1 Test au DPPH

Le composé chimique (2,2-diphényle-1-Picryl-Hydrazyl) (figure suivante) fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote [52].

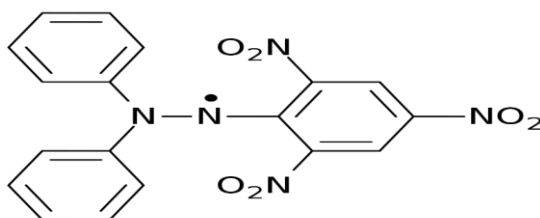


Figure 9 : Structure chimique du radical libre du 2,2-Diphényle-1-Picryl-Hydrazyl

➤ Principe

La réduction du radical libre (2,2-diphényle-1-Picryl-Hydrazyl) par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV- Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants. En présence des piègeurs de radicaux libres, le (2,2-diphényle-1-Picryl-Hydrazyl) de couleur violette se réduit en (2,2- Diphényle-1-Picryl-Hydrazine) de couleur jaune [53].

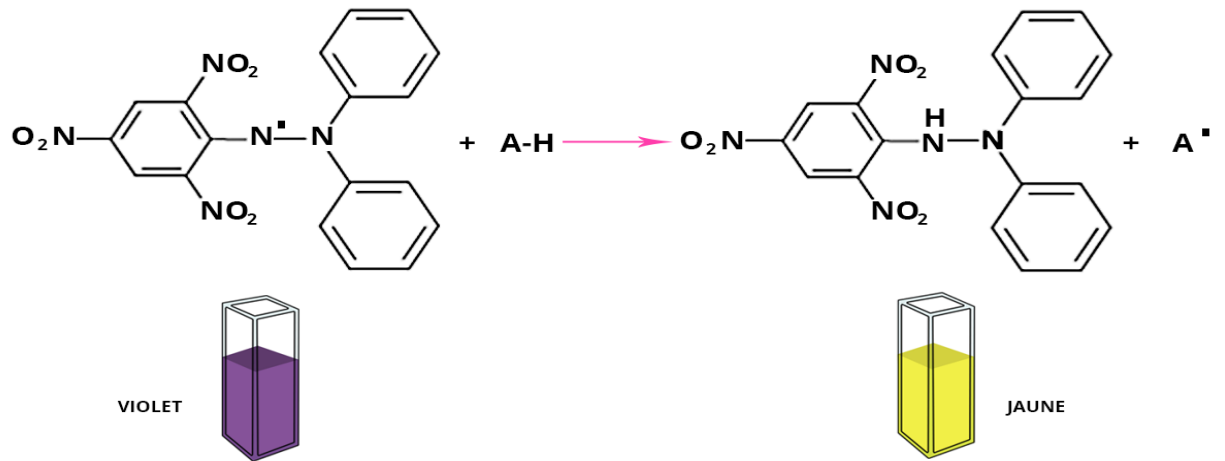


Figure 10 : Réaction de test DPPH

3.2 Matériels

- Les huiles essentielles :
 - Huile de Rue.
 - Huile d'olive.
 - Huile de camphre.
 - Huile d'Ail.
 - Huile de menthe sauvage.
 - Huile de girofle.
- Méthanol.
- DPPH.
- Micropipettes (100µl, 1000µl, 10µl, 50µl).
- Les tubes à essai.
- Spectrophotomètre UV- Visible.

3.3 Mode opératoire

3.3.1 Préparation des solutions des HE

On va préparer des solutions de concentration de 20mg/ml et de volume 5ml pour chaque huile. Pour ça, on va calculer le poids nécessaire d'huile utilisé pour obtenir

cette concentration et compléter après le volume de 5 ml par le méthanol dans une fiole de 5ml, puis agiter la solution.

Ensuite on prépare les six solutions de différentes concentrations à partir des solutions mères dans des tubes à essai fermé (20mg/ml, 5mg/ml, 1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.1mg/ml, 0.05mg/ml) de volume total de 2ml.



3.3.2 Préparation de la solution DPPH

On pèse 7.9 mg de DPPH dans une fiole de 250ml, puis on complète la fiole par le méthanol. Après avoir préparé la solution et l'avoir encapsulée à l'abri de la lumière, nous effectuons un test de contrôle (+) et (-) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS de longueurs d'onde 517nm.

Tableau 5 : les résultats de contrôle positif.

Contrôle (+)	Contrôle (-)
Méthanol	2ml DPPH + 2ml méthanol
0	0.885

Figure 11: le contrôle

positive

2ml de la solution de DPPH dans le méthanol est mélangé avec un volume égal d'extraits d'essai à différents concentrations et maintenu dans l'obscurité pendant 30 min.

Tableau 6 : les différents volumes des solutions

N° tube	01	02	03	04	05	06
[] mg/ml	20	5	1	0.5	0.1	0.05
Solution mère μ l	2000	500	100	50	10	5
Méthanol μ l	0	1500	1900	1950	1990	1995
DPPH μ l	2000	2000	2000	2000	2000	2000

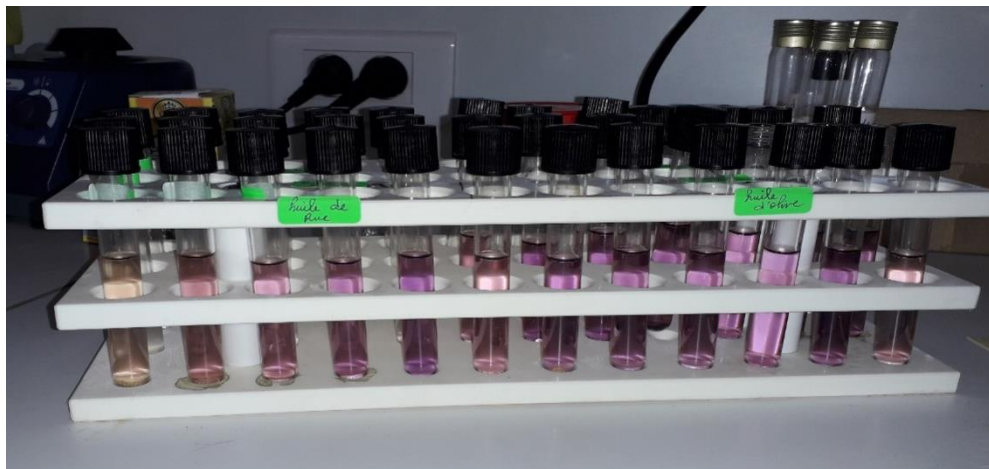


Figure 12: les extraits d'essai avant l'obscurité

Après 30 min d'obscurité, on effectue la lecture des absorbances. L'absorbance est lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV/VIS.

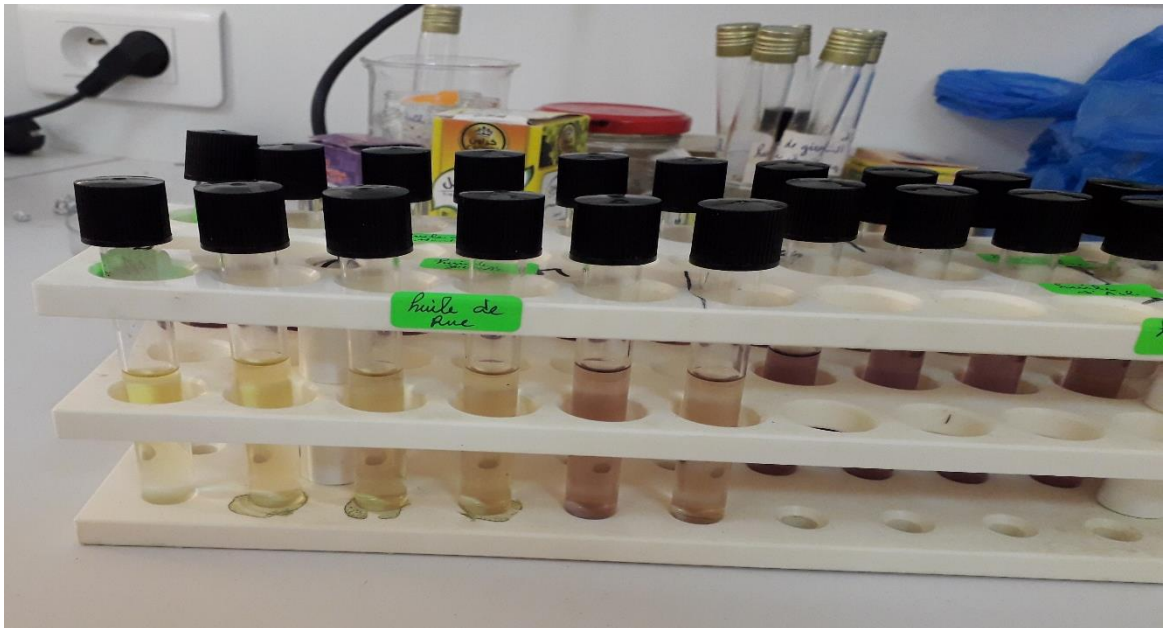


Figure 13 : les essais après 30 min d'obscurité

3.4 Expression des résultats

- Calcul des pourcentages d'inhibition : On calcule ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

Avec :

AC : Absorbance du contrôle

AT : Absorbance du test effectué

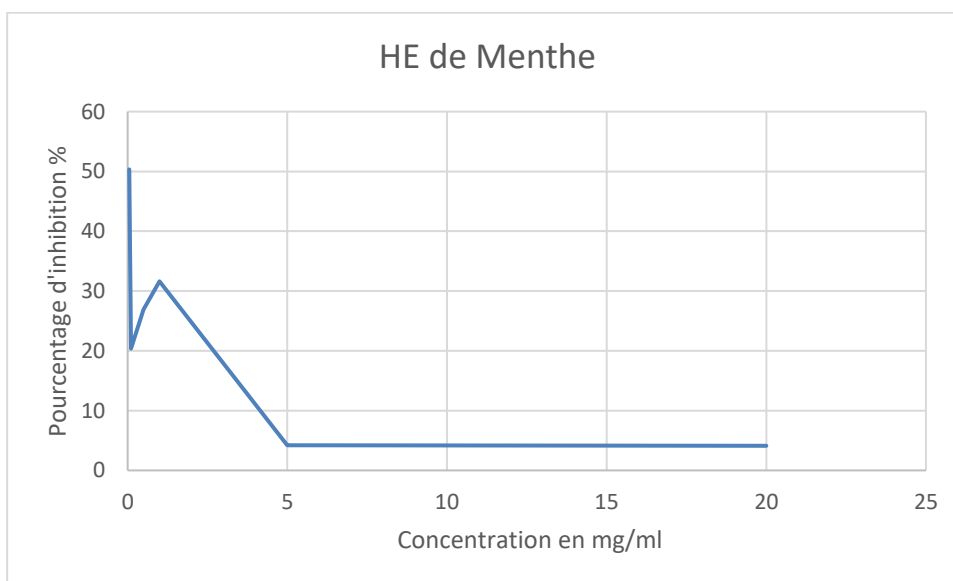
- Calcul des IC₅₀ : IC₅₀ ou la concentration inhibitrice de 50%, est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH•.

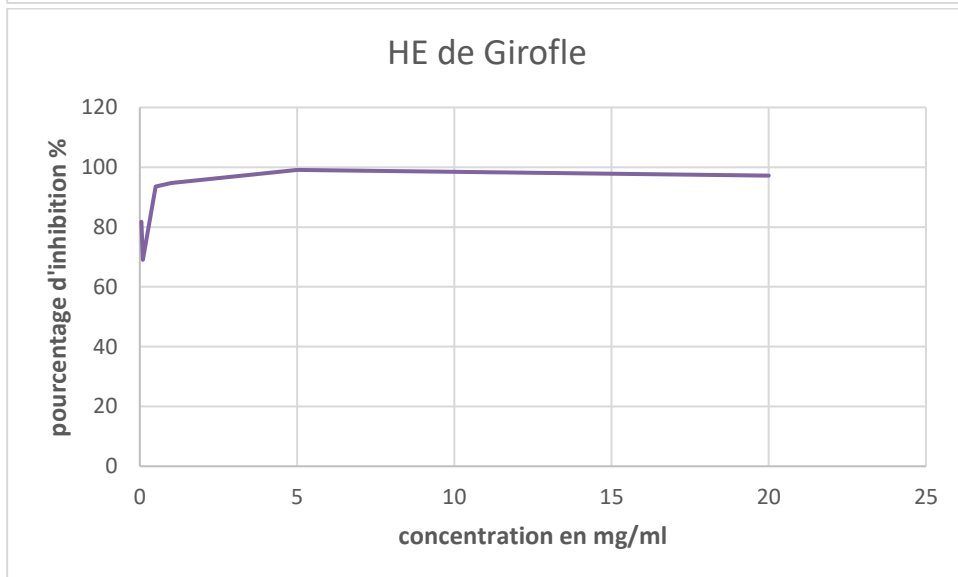
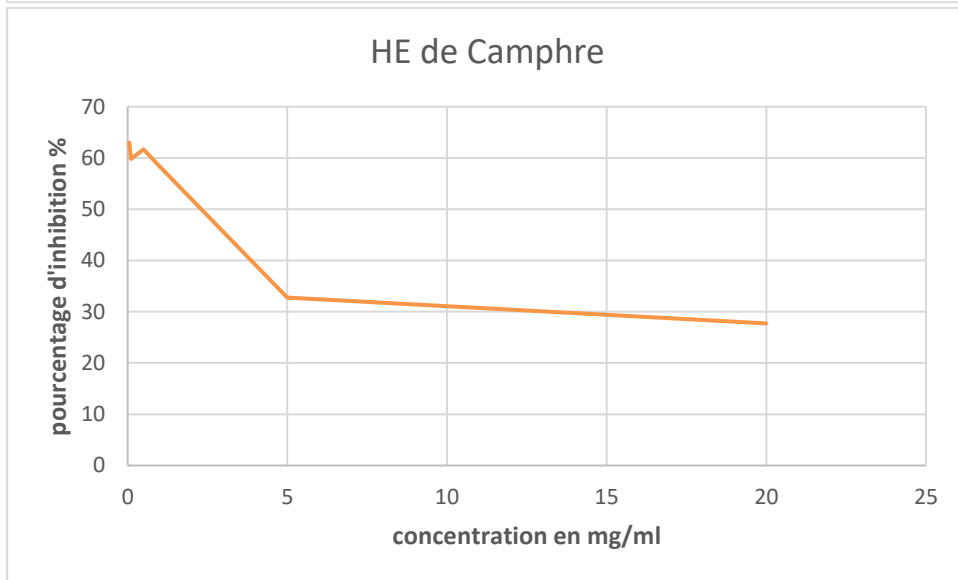
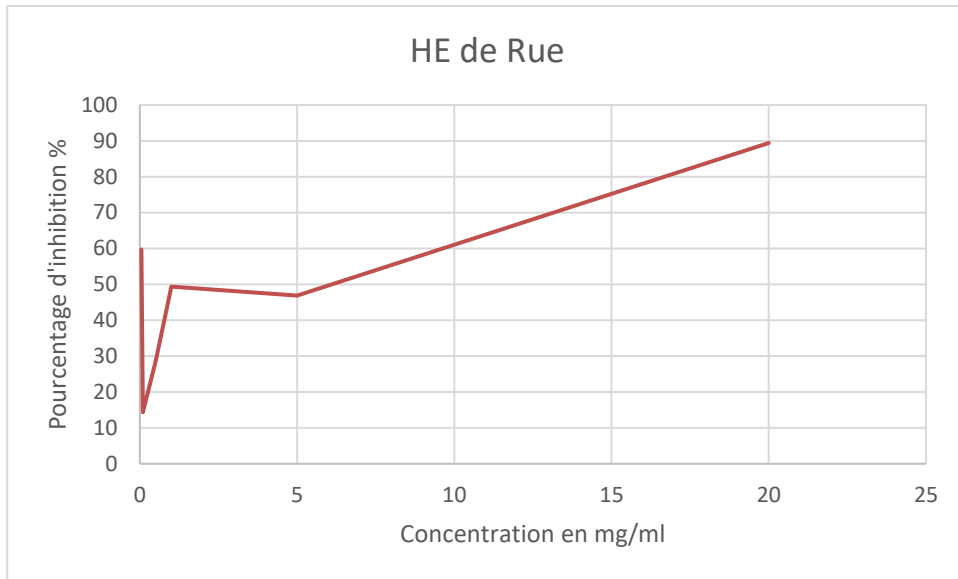
3.5 Les résultats et Discussion

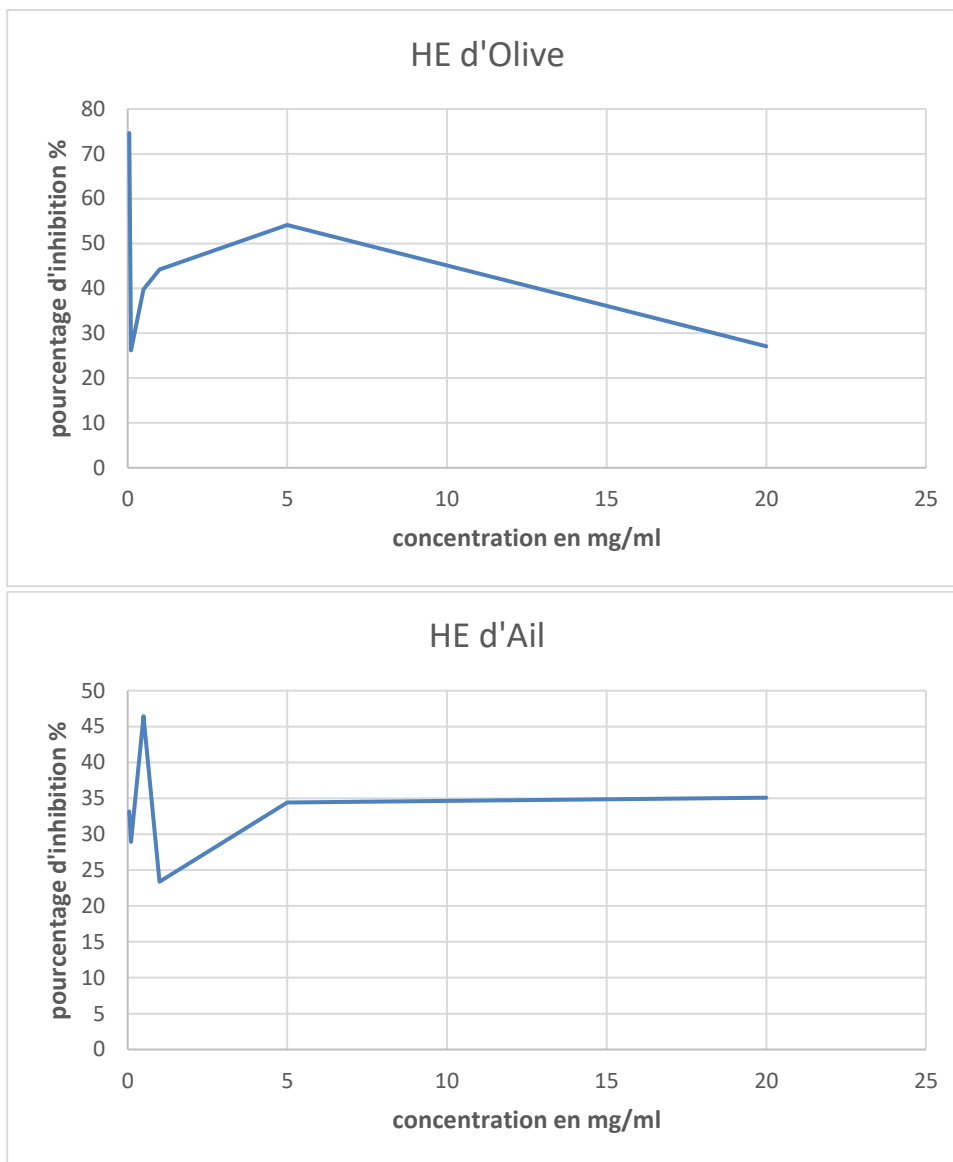
Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un électron. L'activité antioxydant de l'huile essentielle utilisée est évaluée par la mesure de l'absorbance à différentes concentrations.

Tableau 7: Les résultats du test DPPH par spectrophotomètre UV/VIS

N° tube		01	02	03	04	05	06
[] mg/ml		20	5	1	0.5	0.1	0.05
Huile de Menthe	AT	0.861	0.860	0.614	0.656	0.715	0.446
	I%	4.12	4.23	31.63	26.9	20.37	50.33
Huile de Rue	AT	0.095	0.0476	0.455	0.641	0.769	0.362
	I%	89.4	46.9	49.33	28.62	14.36	59.68
Huile de Camphre	AT	0.649	0.604	0.374	0.344	0.361	0.332
	I%	27.72	32.74	58.35	61.69	59.79	63.02
Huile de Girofle	AT	0.025	0.008	0.047	0.058	0.278	0.164
	I%	97.21	99.11	94.76	93.54	69.04	81.74
Huile d'Olive	AT	0.655	0.412	0.501	0.541	0.663	0.228
	I%	27.06	54.12	44.21	39.75	26.17	74.61
Huile d'Ail	AT	0.583	0.589	0.688	0.481	0.638	0.600
	I%	35.08	34.41	23.38	46.44	28.95	33.18







Figures 14 : Les courbes de pourcentage d'inhibition

L'inhibition radicalaire du DPPH est généralement présentée par la valeur IC50, celle-ci est la concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du radical libre DPPH présent dans le milieu réactionnel. Une faible valeur de IC50 indique une activité antioxydante forte. Cette valeur a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons préparés. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 8: Valeurs des concentrations efficaces (IC50) des huiles testés

Huile	Menthe	Rue	Camphre	Girofle	Olive	Ail
-------	--------	-----	---------	---------	-------	-----

IC50 (mg/ml)	0.0496	1.013	0.856	0.072	1.13	0.538
-------------------------	--------	-------	-------	-------	------	-------

Nous remarquons que l'huile de *Menthe* a montré une activité antioxydante notable avec une IC50 de 0.0496 mg/ml, suivi par l'huile de Girofle (IC50 =0.072 mg/ml), ensuite l'huile d'aile (IC50 = 0.538 mg/ml), alors que l'huile de *camphre* et *de rue* ont montré un pouvoir antioxydant modéré avec une IC50 de 0.856 mg/ml et 1.013 mg/ml respectivement. L'activité antioxydante la plus faible a été observée pour l'huile essentielle *d'olive* avec une EC50 de 1.13 mg/ml.

3.6 Conclusion

Dans la présente étude, toutes les huiles essentielles étudiées ont montré une certaine activité antioxydante en piégeant le radical DPPH. Les huiles de *menthe* et de *Girofle* ont présentées des effets antioxydants plus élevés en comparant avec les autres huiles. Cette activité est reflétée par une valeur de IC50 de l'ordre de 0.0496 pour l'huile de *menthe* et de 0.072 mg/ml pour l'huile de *Girofle*.

4. Etude de l'activité antimicrobienne

4.1 Matériel utilisé

4.1.1 Accessoires

- ❖ Bec bunsen
- ❖ Les tubes à essai et les boites de Pétrie
- ❖ Les flacons
- ❖ Ecouvillon
- ❖ Papier whatman (Ø=6mm)

4.1.2 Les huiles utilisées

- * Huile d'*olive*
- * Huile d'*ail*
- * Huile de *camphère*
- * Huile de *menthe sauvage*
- * Huile de *girofle*

* Huile de *rue*

4.1.3 Appareils

Plusieurs appareils ont été utilisés pour étudier l'activité antibactérienne. Le **tableau** ci-dessous site ces appareils.

Tableau 9: Appareils de laboratoire utilisés

Matériel	Utilisation
Agitateur plaque chauffante	Préparation du milieu de culture
Réfrigérateur	Conservation des échantillons
Autoclave	Stérilisation du matériel et des milieux de culture
Etuve réglée à 37°C	Incubation des souches bactériennes

4.1.4 Matériel biologique

Les souches utilisées dans les tests font parties des micro-organismes, qui sont des pathogènes et des contaminants. Le support microbien est composé selon le tableau suivant:

Tableau 10: Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antibactérienne

	Microorganismes	Gram	Code
Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	*Cip A 22
	<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 43300
	<i>Staphylococcus aureus</i>		ATCC 25923

*A.T.C.C: American Type Culture Collection

4.1.5 Les milieux utilisés

Selon le tableau suivant:

Tableau 11 : Milieux utilisés pour l'activité antimicrobienne d'huile essentielle

Milieu		Utilisation
Liquide	Bouille Mueller Hinton (BMH)	Préparation de l'inoculum des quatre souches bactériennes.
Solide	Gélose Mueller Hinton (GMH)	Collage dans des boîtes Pétrie pour l'ensemencement des quatre souches bactériennes.

4.2 Purification

En respectant les conditions d'asepsie, et dans le but de revivifier nos souches de références. Nous avons effectué le repiquage des souches microbiennes à partir d'une culture conservée sur Gélose nutritive inclinée (GNI).

Ces souches de microorganismes ont été ensemencées séparément dans 10 ml de Bouillon MH et ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

Ensuite, de chaque tube incubé nous avons ensemencé par technique d'épuisement deux boîtes de Pétri préalablement coulées contenant le milieu spécifique pour chaque souche, puis nous les avons incubées à 37°C / 24h.

Les différents milieux utilisés pour la culture et l'isolement des différentes souches sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 12: Milieux de culture pour la croissance des souches de référence

Microorganismes	Milieux utilisés	
	Solide	Liquide
<i>Escherichia coli</i>	Gélose Mueller Hinton	Bouillon Mueller Hinton
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		

4.3 Méthode de diffusion sur disques

Cette méthode comprend trois grandes étapes qui sont:

- ✓ **Préparation de l'inoculum**
- ✓ **Ensemencement**
- ✓ **Dépôt de disques**

Des disques de papier filtre stérilisés de 6 mm de diamètre, imprégnés de 25 µl des huiles essentielles testées, sont déposés à la surface d'un milieu de Mueller-Hinton coulé en boîte de Pétri, préalablement ensemencée en surface à l'aide d'un écouvillon avec une suspension bactérienne préparée dans le bouillon M.H d'une densité optique de 0,08 à 0,1 mesuré à 625 nm (environ 10^8 UFC /ml). La suspension bactérienne doit être bien étalée sur la surface de la gélose MH séchée : frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Les boîtes de Pétri sont déposées à 4°C pendant 30 minutes pour permettre une diffusion de gel hydro-alcoolique, après incubation à 37°C pendant 24 heures la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre en mm de la zone d'inhibition [54].

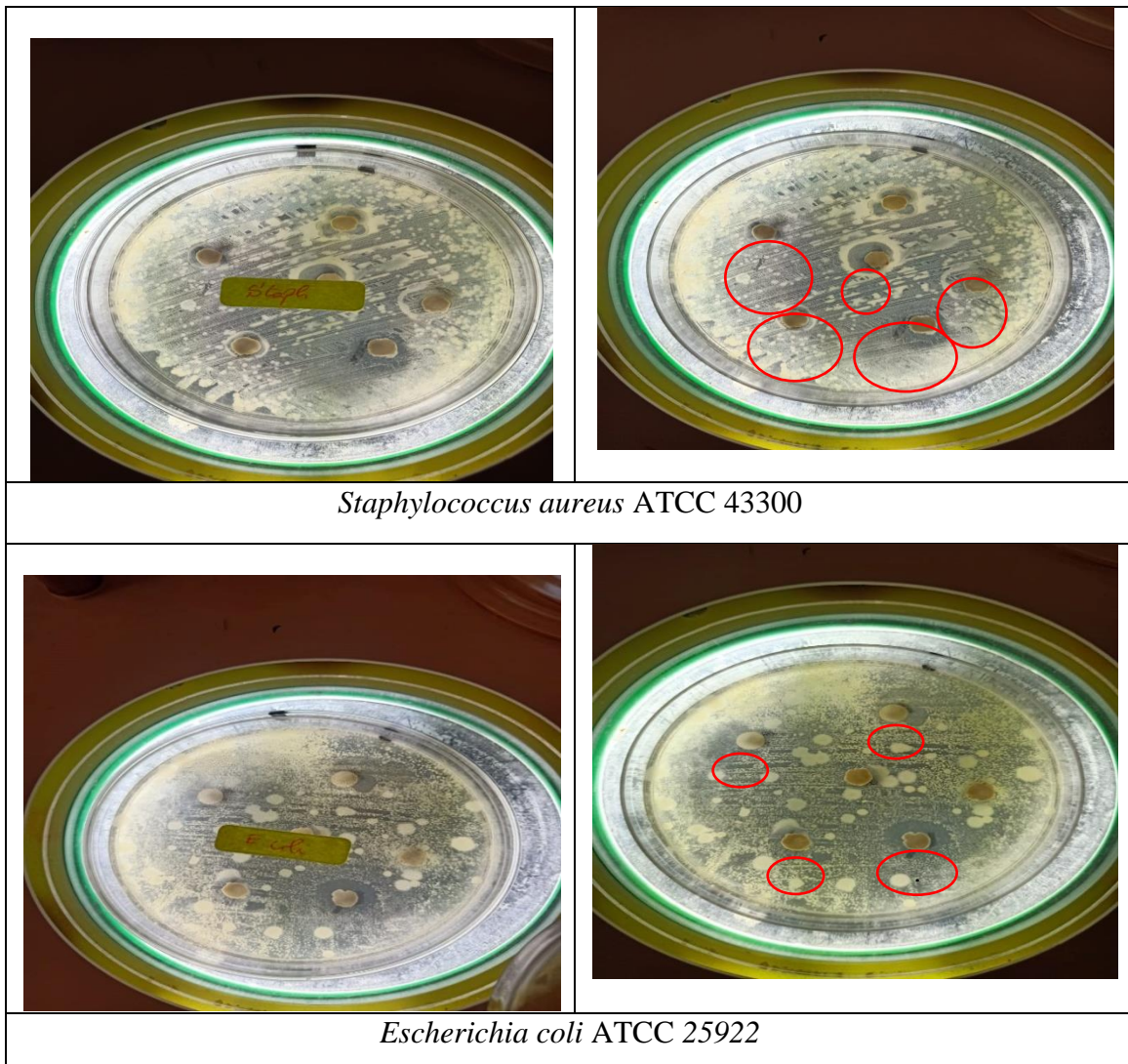
4.4 Lecture des résultats

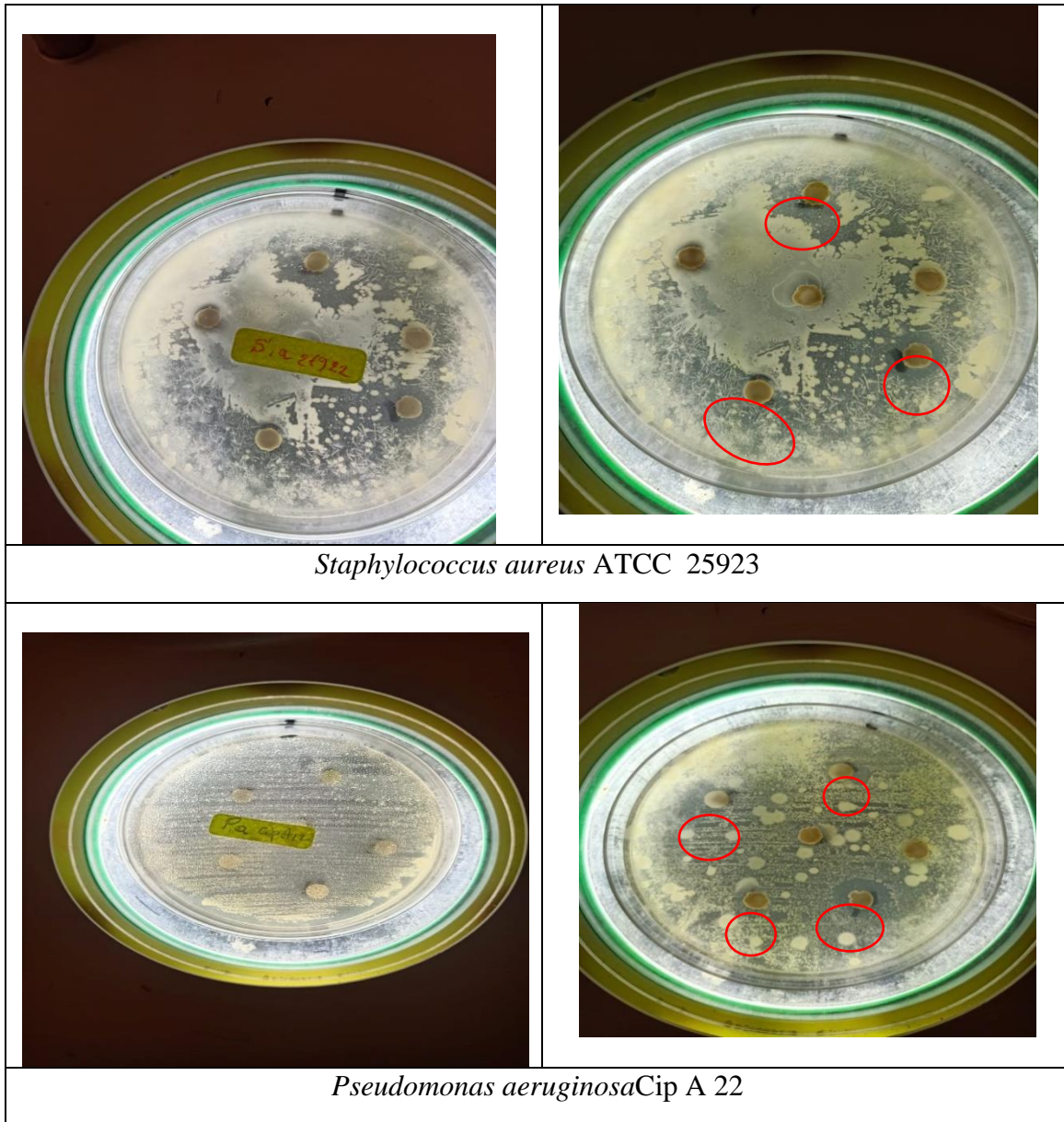
Après la culture, l'effet des bactéries se traduit par l'apparition d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance et donc la zone d'inhibition du principe [55].

La mesure de la distance millimétrique de la zone est reportée sur l'échelle de concordance afin que la souche soit interprétée comme étant : sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis du principe actif étudié.

Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité [56].

- (-) souche résistante ($D < 8 \text{ mm}$)
- (+) souche sensible ($9 \text{ mm} \leq D \leq 14 \text{ mm}$)
- (++) souche très sensible ($15 \text{ mm} \leq D \leq 19 \text{ mm}$)
- (+++) extrêmement sensible ($D > 20 \text{ mm}$)





Staphylococcus aureus ATCC 25923

Pseudomonas aeruginosa Cip A 22

Figure 15: Les photos de l'activité antimicrobienne

Tableau 13: Les résultats de lecture

Souche testé	Gram	Huile	diamètre d'inhibition	
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> *Cip A22	-	Huile d'olive	13 mm	(+) Sensible
		Huile d'ail	15 mm	(++) Très sensible
		Huile de camphere	13mm	(+) Sensible
		Huile de menthe sauvage	15 mm	(++) Très sensible
		Huile clou de girofle	0 mm	(-) Résistante
		Huile de rue (<i>Rutagraveolens</i>)	7 mm	(-) Résistante
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	Huile d'olive	14 mm	(+) Sensible
		Huile d'ail	12 mm	(+) Sensible
		Huile de camphere	13 mm	(+) Sensible
		Huile de menthe sauvage	16 mm	(++) Très sensible
		Huile clou de girofle	0 mm	(-) Résistante
		Huile de rue (<i>Rutagraveolens</i>)	8 mm	(+) Sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> *ATCC 43300	+	Huile d'olive	11 mm	(+) Sensible
		Huile d'ail	8 mm	(+) Sensible
		Huile de camphere	9 mm	(+) Sensible
		Huile de menthe sauvage	13 mm	(+) Sensible
		Huile clou de girofle	15 mm	(++) Très sensible
		Huile de rue (<i>Rutagraveolens</i>)	11 mm	(+) Sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> *ATCC 25923	+	Huile d'olive	15 mm	(++) Très sensible
		Huile d'ail	6 mm	(-) Résistante
		Huile de camphere	9 mm	(+) Sensible
		Huile de menthe sauvage	14 mm	(+) Sensible
		Huile clou de girofle	0 mm	(-) Résistante
		Huile de rue (<i>Rutagraveolens</i>)	0 mm	(-) Résistante

4.5 Discussion

De nombreux travaux rapportent que l'activité biologique d'une huile essentielle est en rapport avec les composés majoritaires, plus particulièrement la nature de leurs groupements fonctionnels et les possibles effets synergiques entre les constituants [57].

Ainsi la plupart des propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont dues à la présence de terpénoïdes oxygénés, en particulier de terpènes phénoliques, de phénylpropanoïdes et

d'alcools. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les hydrocarbonées [58].

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles dépend également du type des microorganismes ciblés, elle est variable d'une souche bactérienne à une autre. En effet dans cette étude, la majorité des huiles

examinées ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées. D'après les zones d'inhibition générées par les huiles étudiées, les huiles d'olive, *ail*, *Menthe et Camphre* ont présenté les meilleures activités sur l'ensemble des souches testées. Tandis que celles de *Rue* ont affichées une activité modérée si non moyennement faible vis-à-vis de toutes les bactéries testées. En revanche l'huile de *Girofle* n'a aucun effet sur les bactéries testées sauf *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

De façon générale le mode d'action des huiles essentielles dépend du type et des caractéristiques des composants actifs, notamment leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation des enzymes de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K⁺): ce mécanisme a été prouvé contre les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram négatif (*E. coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro* avec l'huile de *Melaleuca alternifolia* [59].

4.6 Conclusion

L'importance économique des plantes médicinales sur la scène internationale réside dans leurs bienfaits sur la santé, attribués probablement à la présence des composés biologiques, notamment les composés phénoliques et les composés terpéniques. Les plantes aromatiques sont des sources d'huiles essentielles, leurs composés aromatiques sont utilisés dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

L'activité antimicrobienne a présenté également des effets inhibiteurs importants contre majorité des souches testées par les différentes huiles. Les microorganismes testés tel que *E. coli*, *P. aerogenosa* et *S. Aureus* sont des espèces pathogènes responsables le plus souvent des contaminations alimentaires et des infections nosocomiales chez l'homme.

Conclusion générale

Conclusion

L'étude de l'activité antioxydant des huiles : d'Olive, d'Ail, de Camphre, de Menthe Sauvage, de Girofle et de Rue, a montré que ces huiles possèdent une certaine activité antioxydant. Il a été remarqué que les huiles de *menthe* et de *Girofle* montraient des effets antioxydants plus élevés par rapport aux autres huiles. Cette activité est reflétée par une valeur de IC50 de l'ordre de 0.0496 pour l'huile de *menthe* et de 0.072 mg/ml pour l'huile de *Girofle*.

En ce qui concerne l'activité antimicrobienne, les différentes huiles ont manifestées des effets inhibiteurs très importants contre la majorité des souches testées. Les microorganismes tel que *E. coli*, *P. aerogenosa* et *S. Aureus*, sont des espèces pathogènes responsables le plus souvent des contaminations alimentaires et des infections nosocomiales chez l'homme.

Les différents travaux réalisés au cours de cette mémoire, ont permis de mettre en évidence les propriétés antioxydants des huiles étudiées ainsi que leurs propriétés antibactériennes à l'égard de plusieurs bactéries pathogènes. Nous proposons d'étendre cette étude a un bon nombres d'huiles, que ce soit pour l'activité antioxydant ou antimicrobienne et sur d'autres souches.

Nous proposons également d'étudier d'autres propriétés biologiques de ces huiles essentielles telles que l'activité anti-inflammatoire, anticancéreuse, antidiabétique, antivirale, insecticide et larvicide.

Les résultats obtenues ici sont prometteurs et nous incitent à leur valorisation par la suite avec des tests *in vivo*, dans le but d'être utilisés comme des agents antioxydants et antibiotiques d'origine naturelle, alternatifs aux produits de synthèse.

Références bibliographiques

- [1] Maihebiau P. La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs, Lausanne, p.635, 1994.
- [2] Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales, 4eme éd., Tec doc., Paris, France, p.1288, 1999.
- [3] Cremieux A. Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibacterienne. Study of six essential oils : chemical composition and antibacterial activity, Journal of food science, 85:2437-44, 1990.
- [4] Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales, 2eme éd., Lavoisier, Paris, France, p.915, 1993.
- [5] Bammi J., Khelifa R., Remmal A. Medicinal plants and essential oils, Journal of agricultur food, p.502, 1997.
- [6] Larhsini M., Lazrek H.B., Amarouch H., Jana M. Investigation of antifungal and analgesic activities of extracts from Sium nodiflorum, Original Research Article, Journal of Ethnopharmacology, 53:111-115, 1999.
- [7] BRUNETON J. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales – 5ème éd. Lavoisier, 2016.
- [8] ISO 9235 : 2013 (fr) - Matières premières aromatiques naturelles - Vocabulaire [Internet]. Disponible sur : <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:fr>
- [9] Lawrence B.M. Essential oils, Vol. 9 : 2008-2011. Allured Pub Corp, 9ème éd. p.284, 2012
- [10] Baser K.H.C., Buchbauer G. Handbook of essential oils : science, technology and applications, CRC Press, 1ère éd. p.991, 2009.
- [11] Définition de l'Aromathérapie et des Huiles Essentielles [Internet]. Disponible sur:<https://www.pranarom.com/blog/a-propos/aromatherapie/definition-de-l-aromatherapie>
- [12] De Sousa D.P. Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects, Nova Science Publishers, 1ère éd. p.236, 2012.
- [13] Dudareva N., Pichersky E. Metabolic engineering of plant volatiles. Current opinion in biotechnology, 19 : 181-189, 2008.
- [14] Figueredo G. Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse de Doctorat en Chimie Organique. Université Blaise Pascal – Clermont Ferrand II, France, 2007.
- [15] Familles de plantes à huiles essentielles [Internet]. Disponible sur : <https://www.compagniedes-sens.fr/familles-plantes-huiles-essentielles/>
- [16] AFNOR (Association Française de Normalisation). Huiles essentielles, recueil de normes françaises. AFNOR, 5ème éd., 1996.
- [17] Lucchesi M.E. Extraction sans solvant assistée par les micro-ondes. Thèse de Doctorat en Sciences (Chimie). Université de la Réunion, 2005.

- [18] Search — The Plant List [Internet]. Disponible sur:<http://www.theplantlist.org/tpl/search?q>
- [19] ROUX D. Conseil en aromathérapie - 2ème éd. Pro-Officina, 2008.
- [20] Caissard J.C., Joly C., Bergougnoux V., Hugueney P., Mauriat M., Baudino S. Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Research Developments in Cell Biology*, 2 : 1-15, 2004.
- [21] Duval L. Les huiles essentielles à l'officine. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Rouen, France, 2012.
- [22] AFNOR (Association Française de Normalisation). Huiles essentielles, recueil de normes françaises. AFNOR, 5ème éd., 1996.
- [23] Lucchesi M.E. Extraction sans solvant assistée par les micro-ondes. Thèse de Doctorat en Sciences (Chimie). Université de la Réunion, 2005.
- [24] Tuley de Silva K. A manual on the essential oil industry. United Nations Industrial Development Organization, p.232, 1995.
- [25] Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., Rakesh D.D., Extraction technologies for aromatic and medicinal plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, p.260, 2008.
- [26] Dugo G., Di Giacomo A. Citrus, the genus Citrus. Taylor & Francis, p.565, 2002.
- [27] Garneau F.X. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation - Manuel pratique. Corporation Laseve, Université du Québec à Chicoutimi, p.185, 2005.
- [28] Piochon M. Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire pour la maîtrise en ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi, 2008.
- [29] Gavahian M., Farahnaky A., Javidnia K., Majzooobi M. Comparison of ohmic-assisted hydrodistillation with traditional hydrodistillation for the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Innovative food science and emerging technologies*, 14 : 85-91, 2012.
- [30] Labels et Huiles Essentielles [Internet]. Disponible sur:<https://www.compagnie-dessens.fr/labels-huiles-essentielles/>
- [31] Huiles essentielles : la qualité et les labels au service de la prescription [Internet]. *Le Quotidien du Pharmacien*. [cité 8 oct 2017]. Disponible sur:https://www.lequotidiendupharmacien.fr/actualite/article/2015/11/03/huiles-essentielles-la-qualiteet-les-labels-au-service-de-la-prescription_223571
- [32] Lamarti, A. Badoc, A. Deffieux, G. & Carde, J.P. Biogénèse des mono terpènes, Localisation et sécrétion. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 133 : 69-78, 1994.
- [33] Padua, L.S. N, Bunyaphatsara, R.H.M.J. Lemmens. *Plant Resources of South. East Asia* 12, 1999.
- [34] Bakkali, F. Averbek, S. Averbek, D. Idaomar M. Biological effects of essential oils – A. review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 : 446–475, 2008.

- [35] Baser, K.H.C. Buchbauer, G. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Ed Taylor & Francis Group, p.994, 2010.
- [36] Bruneton, J. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, p.915, 1993.
- [37] Teisseire, P.J. Chimie des substances odorantes. Tec & Doc., Lavoisier, Paris, France, p.480, 1991.
- [38] Ouis, N. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre de fénoule et de persille. Thèse de Doctorat en Chimie Organique. Université d'Oran 1, 2015.
- [39] Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème éd., Tec & Doc., Paris, France, p.362, 1999.
- [40] Pingot, A. Les huiles essentielles. Ed. Tec & Doc., Paris, France, 230-236, 1998.
- [41] Wilchtl, M. Anton, R. Plantes thérapeutiques –Technique et Documentation, Paris, France, p.560, 1999.
- [42] Abdelazize, M. Caractérisation, activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles de trois espèces de sauges (*Salvia algeriensis*, *Salvia argentea* et *Salvia barrelieri*). Mémoire de Magister en Agronomie, Université Hassiba Ben Bouali, Chlef, 2013.
- [43] Besombe, S. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées. Thèse de Doctorat en Génie des Procédés. Université de la Rochelle, France, 2008.
- [44] Huang, H. S, Chang. L. H., Jong T. T., Nien Y. F.& Chang C. M. J. Supercritical carbon dioxide extraction of turmeric oil from *Curcuma longa* Linn. , and purification of turmerones. Separation and Purification Technology, 47 : 119-125, 1995.
- [45] Boira , H. Blanquer ,A. Environmental factors affecting chemical variability of essential oil in *Thymus piperella* L. Biochemistry. System. Ecology. 26:8116-822, 1998.
- [46] Walker J.E.M, Saraste M.J, Runswick and N.J, Gay. Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. The Embo Journal, 1(8) : 945-51, 1982.
- [47] Khati, L. and D. Tadjenant, Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques d'*Urtica dioica* L., Université Mouloud Mammeri, 2016.
- [48] Rahman, K, studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical interventions in aging, 2(2) : p.219, 2007.
- [49] Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C. & Gaydou E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. Free Radical Biology and Medicine, 20 : 35-43, 1996.
- [50] Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C. & Gaydou E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. Free Radical Biology and Medicine, 20 : 35-43, 1996.
- [51] Pibiri P. Assainissement microbiologique de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat, EPFL , Suisse, p.161, 2005.

- [52] Fabian D., Sabol M., Domaracké K., Bujnéková D. Essential oils – their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro*, 20:1435-1445, 2006.
- [53] Gill A.O., Delaquis P., Russo P., Holley R.A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73 : 83–92, 2002.
- [54] Ammar E., Nasri M., Medhioub K. Isolation of phenol degrading bacteria from the wastewater of olive oil processing. *World Journal Microbiological Biotechnology* 21: 253–259, 2005.
- [55] Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M. and Kim J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. 39:756-761, 2006.
- [56] Ponce A.G., Fritz R., del Valle C.E. & Roura S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technologie*, 36: 679-684, 2003.
- [57] Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Guessennd K.N., Boti J.B., Ahibo C., Casanova J.. Etude chimique et activité anti-diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*., 1:94-103, 2008.
- [58] Daouda M.T. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d’Ivoire. Thèse de Doctorat, Université de Félix Houphouët- Boigny, 2015.
- [59] Cox S.D., Mann C.M, Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E, Warmington J.R, Wyllie S.G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88:170-175, 2000.