

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**وزارة التعليم العالي والبحث العلمي**  
**Ecole Nationale Supérieure Agronomique - El-Harrach - Alger**  
**المدرسة الوطنية العليا للفلاحة - الحراش - الجزائر**  
Département de Technologie Alimentaire et de Nutrition Humaine



## **THESE**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

**Présentée par :**

Mme KERBOUCHE-HAMMOUM Lamia

## **Thème**

Etude de la composition chimique et de l'activité biologique des huiles essentielles et d'extraits non volatils de sarriette (*Satureja calamintha* Scheele), d'origan (*Origanum floribundum* Munby ), de germandrée (*Teucrium polium* Briq.) et de khella (*Ammi visnaga* Lamk).

Jury :

Présidente :	Mme FERHAT Z.	Professeur à l'ENSA
Directeur de thèse :	M. HAZZIT. M	Maître de conférences -A à l'ENSA
Examineurs :	M. AIT AMAR H.	Professeur à l'USTHB
	Mme GUENAFDI-YAHI N.	Professeur à l'USTHB
	Mme EL BAYATIN.	Maître de conférences-A à l'ENS
	M. BENCHABANE O.	Maître de conférences-A à l'ENSA

*Année universitaire: 2015 – 2016*

# Remerciements

---

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à M. HAZZIT M., mon directeur de thèse, je le remercie pour la qualité remarquable de son encadrement tout au long de mon travail. Ses compétences, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail.*

*Mon profond respect et ma grande considération à Mme le Professeur FERHAT Z. de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je la remercie aussi pour ses conseils et ses encouragements.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur AIT AMAR H., en acceptant de participer à ce jury. Je le remercie vivement pour cette marque d'intérêt. Je le remercie aussi pour ses précieux conseils, sa gentillesse et ses grandes qualités scientifiques et humaines.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Mme le Professeur YAHY GUENADFI N. de l'USTHB, à Mme EL BAYATI N. Maître de conférences A à l'ENS et à M. BENCHABANE O. Maître de conférences A à l'ENSA de m'avoir honoré par leurs présences et d'accepter de participer à ce jury.*

*Je tiens à remercier M. le Professeur BENCHABANE A. pour ses conseils, son aide et sa disponibilité.*

*Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire substances naturelles et microbiologie du CRD-SAIDAL, à l'équipe du CNRA ainsi qu'à l'équipe du CRAPC.*

*Je remercie M. le Professeur ABDELKRIM H. et Mme BENHOUBOU S. du département botanique de l'ENSA pour leurs collaborations.*

*Mes remerciements vont également à tout le personnel du Département de Technologie Alimentaire.*

*Un grand merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu, A Sofiane qui m'a aidé, encouragé et surtout supporté.*

*Enfin, merci à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Sommaire

---

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

## Partie I : Etude bibliographique

### Chapitre I : Huiles essentielles et extraits aromatiques

1	Huiles essentielles.....	3
1.1.	Généralités.....	3
1.2.	Biosynthèse des huiles essentielles.....	4
1.2.1	Biosynthèse des monoterpènes.....	4
1.2.2	Biosynthèse des sesquiterpènes.....	4
1.3.	Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	5
1.3.1	Entraînement à la vapeur.....	5
1.3.2	L'Hydrodistillation.....	5
1.3.3	Expression à froid.....	6
1.3.4	Extraction par solvants volatils.....	6
1.3.5	Extraction au CO2 liquide ou supercritique.....	6
1.3.6	Distillation sèche.....	7
1.3.7	Extraction assistée par micro-onde.....	7
1.4.	Analyse des huiles essentielles.....	7
1.4.1	Chromatographie phase gazeuse (CPG).....	8
1.4.2	Chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG-SM).....	8
2	Les Extraits aromatiques : composés phénoliques.....	9
2.1.	Classification des composés phénoliques.....	9
2.1.1	Les acides phénoliques.....	10
2.1.2	Les tannins.....	10
2.1.3	Les flavonoïdes.....	11
2.2.	Rôle physiologique des composés phénoliques.....	13

### Chapitre II: Monographie des espèces étudiées

1	La Germandrée ( <i>Teucrium polium</i> subsp. <i>capitatum</i> Briq.).....	16
1.1	Description et classification.....	16
1.2.	Répartition géographique.....	17
1.3.	L'Huile essentielle de germandrée.....	18
1.4.	Application des HE de germandrée.....	18
2	La Sarriette ( <i>Satureja calamintha</i> subsp. <i>nepeta</i> (L.) Briq.).....	19
2.1.	Description et classification.....	19
2.2.	Répartition géographique.....	21
2.3.	Composition chimique des HE de sarriette.....	21

# Sommaire

---

3	Le Khella « <i>Ammi Visnaga</i> (L.) » .....	21
3.1.	Description et classification .....	21
3.2.	Répartition géographique.....	23
3.3.	Composition chimique de <i>Visnaga daucoïdes</i> .....	23
4	L'Origan ( <i>Origanum floribundum</i> Munby).....	24
4.1.	Description et classification.....	24
4.2.	Répartition géographique.....	25
4.3.	Composition chimique de l'huile essentielle d'origan.....	26
4.4.	Principales utilisations d'origan .....	26
4.4.1	Utilisation comme épice.....	26
4.4.2	Utilisation en médecine traditionnelle .....	26
5	Irradiation des espèces végétales.....	27
5.1.	Traitement par irradiation .....	27
5.2	Sources de rayonnement.....	27
5.3	Doses de rayonnement .....	28
5.4	Conséquences biologiques du traitement par irradiation.....	29

## **Chapitre III: Activités biologiques des substances naturelles**

1	Activité antioxydante .....	31
1.1.	Les espèces oxygénées réactives .....	31
1.2.	Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides.....	31
1.2.1	Auto-oxydation .....	32
1.2.2	Photo-oxydation .....	32
1.2.3	L'oxydation enzymatique .....	33
1.3.	Les antioxygènes .....	34
1.3.1	Les antioxydants naturels .....	34
1.3.2	Les antioxydants de synthèse .....	35
1.4.	Mécanisme d'action des antioxydants.....	35
1.5.	Méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant .....	36
2	Activité antimicrobienne .....	37
2.1.	Les propriétés antimicrobiennes des HE .....	37
2.2.	Mécanismes d'action des HE .....	39
2.3.	Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE .....	40
2.3.1	Type de méthode utilisée.....	41
2.3.2	L'effet de la matrice biologique.....	41
2.3.3	Composition chimique des HE.....	41
2.3.4	Type de microorganismes ciblés.....	42
2.4.	Principales méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE.....	42
2.4.1	Techniques par contact direct ( <i>diffusion en milieu gélosé</i> ) .....	42
2.4.2	Microatmosphère.....	43
2.4.3	Bioautographie sur CCM .....	43
2.4.4	Technique de dilution en gélose ou en bouillon .....	43
3	Activité anti-inflammatoire .....	44
3.1.	La 5-lipoxygénase .....	44

# Sommaire

---

3.2. Les inhibiteurs de la 5-LO .....	45
3.3. Activité anti-inflammatoire des extraits végétaux.....	47

## **Partie II: Etude expérimentale**

### **Chapitre I: Matériels et méthodes**

1	Matériel végétal.....	49
2	Extraction de l'HE.....	49
2.1.	Protocole d'extraction .....	50
2.2.	Rendement de l'extraction .....	50
3	Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CG-SM.....	51
3.1.	Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (GC).....	51
3.2.	Analyse qualitative des HE par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).....	51
3.3.	Identification des constituants des huiles essentielles.....	52
4	Elaboration des extraits non volatils .....	52
4.1.	Protocole d'extraction .....	52
4.2.	Rendement de l'extraction .....	53
5	Analyses phytochimiques des extraits non volatils.....	53
5.1.	Dosage des phénols totaux.....	53
5.1.1	Principe .....	53
5.1.2	Mode opératoire .....	54
5.2	Dosage des flavonoïdes : .....	54
5.2.1	Principe .....	54
5.2.2	Mode opératoire .....	54
6	Evaluation de l'activité antioxydante des HE et des extraits.....	55
6.1.	Activité de piégeage du radical DPPH <sup>•</sup> (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	55
6.1.1	Principe .....	55
6.1.2	Mode opératoire .....	55
6.1.3	Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC <sub>50</sub> ).....	56
6.2	Mesure du pouvoir réducteur .....	56
6.2.1	Principe .....	56
6.2.2	Mode opératoire .....	57
6.3	Inhibition du radical positif ABTS <sup>•+</sup> ou 2,2 -Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid).....	58
6.4	Inhibition de la peroxydation lipidique par le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) .....	59
6.4.1	Principe .....	59
6.4.2	Mode opératoire .....	60
7.	Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE .....	62
7.1	Etude qualitative de l'effet antimicrobien.....	62
7.1.1	Aromatogramme .....	62
7.1.2	Souches microbiennes testées .....	63
7.1.3	Protocole expérimental.....	64
7.2.	Etude quantitative de l'effet antimicrobien .....	66

# Sommaire

---

7.2.1	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) .....	66
7.2.2	Détermination de CMB /CMF .....	67
8	Evaluation de l'Activité anti-inflammatoire des HE .....	67
9	L'irradiation de l'espèce d'origan.....	68
10	Analyse statistique .....	68

## **Chapitre II: Résultats et discussion**

1	Rendement et composition chimique des huiles essentielles .....	69
1.1.	<i>Teucrium polium</i> subsp. <i>capitatum</i> .....	69
1.2.	<i>Calamintha nepeta</i> .....	77
1.3.	<i>Visnaga daucoides</i> .....	81
1.4.	<i>Origanum floribundum</i> .....	84
1.4.1	Influence de la durée d'extraction sur le rendement en HE .....	85
1.4.2	Influence de la durée d'extraction sur la composition chimique .....	86
2	Rendement et teneurs en composés phénoliques des extraits non volatils .....	90
3	Evaluation de l'activité antioxydante des HE et des extraits éthanoliques .....	91
3.1.	<i>Teucrium polium</i> subsp. <i>capitatum</i> .....	92
3.1.1	Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	92
3.1.2	Mesure du pouvoir réducteur ferrique des espèces de germandrée .....	95
3.2.	<i>Calamintha nepeta</i> .....	98
3.2.1	Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	98
3.2.2	Mesure du pouvoir réducteur ferrique des espèces de sarriettes .....	101
3.3.	<i>Visnaga daucoides</i> .....	103
3.3.1	Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	103
3.3.2	Mesure du pouvoir réducteur ferrique de Khella .....	104
3.4.	<i>Origanum floribundum</i> .....	106
3.4.1	Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) .....	106
3.4.2	Mesure du pouvoir réducteur ferrique des espèces d'origan .....	109
4	Influence de la durée d'extraction sur l'activité antioxydante des huiles essentielles .....	111
4.1.	Activité d'inhibition du radical DPPH* .....	112
4.2.	Activité d'inhibition du radical positif ABTS*+ .....	113
4.3.	Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique par le test TBARS .....	114
4.4.	Pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux .....	115
4.5.	Concentrations inhibitrices de 50% des radicaux (IC50) .....	116
5	Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE et des extraits .....	117
5.1.	Activité antimicrobienne des HE des espèces étudiées .....	117
5.2.	Comparaison de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'origan avec celle de son HE .....	121
6	Influence de la durée d'extraction sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielle d'Origan ..	122
6.1.	Etude qualitative de l'activité antimicrobienne .....	122
6.2.	Etude quantitative de l'activité antimicrobienne .....	123
7	Activité anti-inflammatoire des HE d'origan et de germandrée .....	125
8	Etude de l'effet de l'irradiation sur les huiles essentielles d' <i>Origanum floribundum</i> .....	125
8.1.	Effet de l'irradiation sur le rendement en HE .....	125
8.2.	Effet de l'irradiation sur la composition chimique .....	126

# Sommaire

---

**Conclusion générale.....133**

**Références bibliographiques.....137**

**Annexes**

# Liste des abreviations

---

<b>AA :</b>	Acide arachidonique
<b>ABTS :</b>	2,2- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFNOR :</b>	Association Française de Normalisation
<b>ANOVA 1 :</b>	Analyse de la variance à une seule variable
<b>ATCC :</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP:</b>	Adenosine Tri Phosphate
<b>ARN:</b>	Acide ribonucléique
<b>BHA :</b>	Butyl-Hydroxy-Anisole
<b>BHT :</b>	Butyl-Hydroxy-Toluène
<b><sup>137</sup>Cs :</b>	Césium-137
<b>CG/SM :</b>	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
<b><sup>60</sup>Co :</b>	Cobalt-60
<b>CMB :</b>	Concentration Minimale Bactéricide
<b>CMI :</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CMF :</b>	Concentration Minimale fongicide
<b>COX:</b>	Cyclooxygénases
<b>CPG :</b>	Chromatographie en Phase Gazeuse
<b>CRAPC :</b>	Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques
<b>CRD :</b>	Centre de Recherche et de Développement
<b>CRNA :</b>	Centre de Recherche Nucléaire d'Alger
<b>DMPD :</b>	N, N, -dimethyl-p-phenylenediamine
<b>DMSO:</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DPPH :</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>ENSA :</b>	Ecole Nationale Supérieure Agronomique
<b>ERO :</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>FAO :</b>	Food and Agriculture Organisation
<b>FID :</b>	Détecteur à ionisation de flamme
<b>Fig:</b>	Figure
<b>FLAP:</b>	5-LO-activating protéine

# Liste des abreviations

---

<b>GAE :</b>	Equivalent d'Acide gallique
<b>GRAS :</b>	Generally Recognized As Safe
<b>HE :</b>	Huile essentielle
<b>h :</b>	heure
<b>I (%) :</b>	Pourcentage d'inhibition ou activité antioxydante
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Concentration inhibitrice de 50% des radicaux
<b>IR :</b>	Indice de rétention
<b>K<sup>+</sup> :</b>	Ion potassium
<b>KGy :</b>	Kilogray
<b>5-LO:</b>	5-Lipoxygénases
<b>MA :</b>	Malonaldéhyde
<b>MDA :</b>	Malondialdéhyde
<b>min :</b>	Minute
<b>MV :</b>	Masse de la matière végétale
<b>NDGA:</b>	Acide nordihydroguaiarétique
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>QE :</b>	Equivalent de quercétine
<b>PC :</b>	Pression critique
<b>PEG</b>	Polyethyleneglycol
<b>pH :</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>PLA<sub>2</sub>:</b>	phospholipase A <sub>2</sub>
<b>ppm :</b>	Partie par million
<b>R :</b>	Resistante
<b>SFME:</b>	Solvent Free Microwave Extraction
<b>TBA :</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TBARS :</b>	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
<b>TBHQ :</b>	Ter-Butyl-Hydroxy-Quinone
<b>TC:</b>	Température critique
<b>TR :</b>	Temps de rétention
<b>α :</b>	Alpha
<b>β :</b>	Beta
<b>γ :</b>	Gamma

# Liste des figures

---

Figure 1: Structure de l'acide gallique, catechine et flavonols (Wang et Mazza, 2002).....	10
Figure 2: Structure générale du noyau des flavonoïdes (Heim et <i>al.</i> , 2002).....	12
Figure 3: Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999). ....	13
Figure 4 : <i>Teucrium polium</i> subsp. <i>capitatum</i> au stade de floraison.....	16
Figure 5: <i>Calamintha nepeta</i> (L.) Savi au stade de floraison.....	20
Figure 6: <i>Visnaga daucoïdes</i> au stade de floraison .....	22
Figure 7: Formules chimiques de la khelline, visnadine et visnagine (Filliat, 2012). ....	24
Figure 8 : <i>Origanum floribundum</i> au stade de floraison .....	25
Figure 9: Oxydation d'un acide gras insaturé (Moll et Moll, 1998). ....	32
Figure 10 : Mécanisme d'initiation de la peroxydase des lipides par l'activité lipoxygénasique (German et Kinsilla, 1985). ....	34
Figure 11: Structures chimiques de quatre antioxydants synthétiques .....	35
Figure 12: Principaux composés des HE impliqués dans les activités antimicrobiennes (Burt, 2004) .....	39
Figure 13: Localisation de la 5-LO à l'intérieur de la cellule (Peters-Golden et Brock, 2000). ....	44
Figure 14: Exemple d'inhibiteur redox (Dupont et coll., 2001). ....	45
Figure 15 : Inhibiteur chélateur de fer optimisé (Summers et coll, 1987). ....	46
Figure 16: Méthoxyethylthiazole et son évolution (Brooks et Summers, 1996).....	47
Figure 17: Structure de l'Acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque). ....	53
Figure 18: Structure de la Quercétine.....	54
Figure 19: Inhibition du radical DPPH par un antioxydant AH. ....	55
Figure 20: Schéma du protocole expérimental de l'évaluation du pouvoir réducteur. ....	57
Figure 21: Réaction du radical ABTS <sup>•+</sup> en présence d'un antioxydant.....	58
Figure 22: Réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec le malonaldéhyde (MA) pour former un chromogène rose.....	60
Figure 23: Schéma du protocole expérimental du test(TBARS).....	61
Figure 24: Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de pétri.....	63
Figure 25: Spèctre de masse du germacrene D. En haut le spectre de masse du composé de l'huile et en bas le spectre de masse de la banque de données (Wiley 7N). ....	73
Figure 26: Spectre de masse du t-Cadinol.....	73
Figure 27: Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de <i>T. polium</i> de Tablat.....	74
Figure 28: Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de <i>T. polium</i> de Boussaâda.....	75
Figure 29 : Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de <i>Sarriette</i> . ....	80
Figure 30: Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de Khella.....	83
Figure 31: Spectre de masse du cembrene C .....	84
Figure 32: Rendement de l'extraction (ml/100g) des huiles essentielles d' <i>O. floribundum</i> en fonction de la durée d'extraction (30 min, 1, 2 et 3 heures).....	86
Figure 33: Chromatogramme GC-MS sur colonne HP5MS de l'huile essentielle d' <i>O. floribundum</i> . (30min). ....	89
Figure 34: Activité de piégeage du radical DPPH des HE de <i>Teucrium polium</i> subsp. <i>capitatum</i> comparée à celles du BHT et BHA.....	93

# Liste des figures

---

Figure 35: Activité de piégeage du radical DPPH des extraits de <i>Teucrium polium</i> comparée à celles du BHT.....	94
Figure 36 : Pouvoir réducteur des HE de <i>Teucrium polium</i> , du BHT et de l'acide ascorbique. ....	96
Figure 37: Pouvoir réducteur des extraits de <i>Teucrium polium</i> , du BHT et de l'acide ascorbique. ....	97
Figure 38: Activité de piégeage du radical DPPH des HE de <i>Calamintha nepeta</i> , comparée à celles du BHT et BHA. ....	98
Figure 39: Activité de piégeage du radical DPPH des extraits de Sarriette comparée à celles du BHT. ..	100
Figure 40 : Pouvoir réducteur des HE de <i>Calamintha nepeta</i> , du BHT et de l'acide ascorbique. ....	101
Figure 41: Pouvoir réducteur des extraits de <i>Calamintha nepeta</i> , du BHT et d'acide ascorbique. ....	102
Figure 42: Activité de piégeage du radical DPPH de l'HE et de l'extrait de <i>Visnaga daucoides</i> , comparée à celle du BHT.....	103
Figure 43: Pouvoir réducteur de l'HE et d'extrait de <i>Visnaga daucoides</i> , du BHT et d'acide ascorbique. ....	105
Figure 44: Activité de piégeage du radical DPPH des HE d'origan et celle du BHA et BHT.....	106
Figure 45: Activité de piégeage du radical DPPH d'extrait d'origan comparée à celle du BHT.....	108
Figure 46: Pouvoir réducteur des HE d'origan, du BHT et d'acide ascorbique.....	112
Figure 47: Pouvoir réducteur d'extrait d'origan, du BHT et d'acide ascorbique.....	113
Figure 48: Activité (%) d'inhibition du radical DPPH par le BHT et les HE extraites à différentes durées (30 min, 1, 2 et 3 heures).....	115
Figure 49 : Activité (%) d'inhibition du radical positif ABTS <sup>•+</sup> par le Trolox et les huiles essentielles extraites pour différentes durées (30 min, 1,2 et 3 heures). ....	116
Figure 50: Activité (%) d'inhibition de la peroxydation lipidique par le BHT et les huiles essentielles extraites pour différentes durées.....	118
Figure 51: Pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux par le Trolox et les huiles essentielles extraites pour différentes durées.....	117
Figure 52: Rendements d'extraction en HE d'origan traité à différentes doses. ....	127
Figure 53: Chromatogrammes successifs des huiles irradiées à différentes doses (0, 5, 10, 20 et 30 kGY) .....	130

# Liste des tableaux

---

Tableau 1: Activités biologiques des composés phénoliques.....	15
Tableau 2 : Composé dominant des HE de différentes espèces germandrée.....	18
Tableau 3: Principaux composés de certaines espèces d'origan. ....	26
Tableau 4 : les principaux effets recherchés par les doses efficaces d'irradiation .....	29
Tableau 5: Les Espèces étudiées avec leurs provenances. ....	49
Tableau 6: Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées .....	64
Tableau 7: Les rendements d'extraction en huiles essentielles de germandrée.....	70
Tableau 8: Composition (%) des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i> de trois régions (Tablat, Boussaâda et Kadiria) .....	70
Tableau 9: Principaux composés des huiles essentielles de <i>Teucrium polium</i> subsp. <i>capitatum</i> de différents pays.....	77
Tableau 10: Rendements d'extraction en huiles essentielles de Sarriette des deux régions .....	78
Tableau 11 : Composition (%) des huiles essentielles de <i>Calamintha nepeta</i> des deux régions (El-Affroun, H. Melouane).....	78
Tableau 12: Principaux composés des huiles essentielles de <i>Calamintha nepeta</i> de différents pays .....	81
Tableau 13: Rendement d'extraction de l'huile essentielle de <i>Visnaga daucoides</i> .....	81
Tableau 14: Composition (%) des huiles essentielles de <i>Visnaga daucoides</i> .....	82
Tableau 15: Rendement d'extraction des HE d' <i>Origanum floribundum</i> .....	85
Tableau 16: Composition (%) des huiles essentielles d' <i>Origanum floribundum</i> extraites pour différentes durées (30 min, 1, 2 et 3 heures).....	86
Tableau 17 : Rendements et Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des extraits .....	90
Tableau 18: Valeurs d'IC50 des extraits et du BHT .....	96
Tableau 19: Valeurs d'IC50 des extraits de sarriette et du BHT .....	101
Tableau 20: Valeurs d'IC50 des HE d'origan et du BHT .....	108
Tableau 21: Valeurs d'IC50 d'extrait d'origan et du BHT .....	109
Tableau 22: Concentrations inhibitrices (mg/L $\pm$ écart type) de 50% des radicaux (IC <sub>50</sub> ) du BHT, du Trolox et des huiles extraites pour différentes durées (30 min, 1h, 2 et 3h). ....	117
Tableau 23: Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des HE d'origan, de sarriette et de germandrée .....	119
Tableau 24: Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) de l'HE et d'extrait d'origan de Lakhdaria.....	122
Tableau 25: Diamètres des zones d'inhibitions (en mm) des HE d'Origan. ....	124
Tableau 26: Concentrations minimales inhibitrices, bactéricides et fongicides des huiles extraites pour différentes durées.....	125
Tableau 27: L'activité anti-inflammatoire de NDGA et des HE exprimé en IC50 .....	126

# Liste des tableaux

---

Tableau 28: Composition (%) des origans irradiés à différentes doses (0, 5, 10, 20 et 30 KGy).....	128
Tableau 29: Comparaison des teneurs (%) des composés majoritaires des HE d'origan irradié.....	131

## Introduction

L'utilisation des plantes aromatiques par l'homme est une pratique antique. La majorité des habitants du globe terrestre utilisent de nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle. Cependant, cette utilisation ne se base sur aucun critère scientifique, elle tient compte simplement des observations au cours des siècles.

Actuellement, la recherche sur les bienfaits des plantes médicinales et aromatique voit son développement s'accroître, notamment avec les huiles essentielles (HE) dont les domaines d'application sont nombreux aussi bien en médecine, en pharmacie ainsi que dans d'autres domaines tels que l'agroalimentaire, les industries chimiques, etc.

Plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques utilisés dans l'industrie agroalimentaire. En effet, les antioxydants de synthèses (BHT, BHA et TBHQ) sont suspectés d'avoir des effets négatifs sur la santé (**Paradis et al., 2006**). De plus, l'usage excessif d'agents antibactériens chimiques conduit à l'apparition de souches bactériennes résistantes (**Mau et al., 2004**).

De nombreuses études s'orientent donc vers la recherche d'antioxydants naturels parfaits, à la fois sûrs et efficaces. Ainsi, les huiles essentielles et les extraits aromatiques commencent à avoir beaucoup d'intérêts comme sources potentielles de molécules naturelles bioactives.

Les plantes sont extrêmement complexes du point de vue de leur composition chimique. Elles sont formées de plusieurs milliers de constituants différents, dont quelques-uns seulement sont responsables de l'effet thérapeutique ou de l'effet toxique. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes aromatiques afin d'étudier leur efficacité, leur mode d'action et bien entendu leurs pouvoirs biologiques.

Dans le bassin méditerranéen, on rencontre un très grand nombre de plantes aromatiques. Son climat riche en luminosité et en chaleur, qu'accompagnent des saisons marquées, exige de la part des plantes des efforts adaptatifs favorable à une richesse moléculaire évolutive leur conférant de multiples propriétés.

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années.

A cet effet, nous nous sommes intéressés à trois espèces de la famille des Lamiacées (*Origanum floribundum*, *Teucrium polium* subsp. *capitatum* et *Satureja calamintha* subsp. *nepeta*) qui est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien et antioxydant et une espèce de la famille des Apiacées (*Ammi visnaga*).

L'objectif de ce travail est de contribuer à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles et d'extraits non volatils de ces plantes ainsi qu'à l'évaluation *in vitro* de leurs activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires d'une part et d'autre part d'étudier l'effet de la durée d'extraction sur la composition chimique et l'activité biologique des huiles essentielles ainsi que l'effet du traitement par l'irradiation aux rayonnements gamma sur la composition de ces derniers.

La première partie de ce manuscrit est réservée à l'étude bibliographique qui est articulée en trois volets. Le premier aborde des notions sur les huiles essentielles et extraits aromatiques. Le deuxième est consacré à la description des plantes étudiées et le dernier volet expose certaines études *in vitro*, d'activités biologiques des huiles essentielles et extraits de plantes.

La seconde partie du travail est réservée à l'étude expérimentale qui comportera :

- L'extraction et l'analyse par chromatographie en phase gazeuse seule et par CPG/SM des huiles essentielles extraites par hydrodistillation ;
- L'élaboration des extraits éthanoliques non volatils par Soxhlet et le dosage des phénols totaux;
- L'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires des différents huiles et extraits étudiés ;
- L'étude de l'impact du temps d'extraction sur la composition chimique et l'activité biologique des huiles essentielles de l'origan.
- L'étude de l'impact de l'irradiation par les rayonnements gamma sur la composition des huiles essentielles de l'origan.

# Huiles essentielles & extraits aromatiques

---

## 1 Huiles essentielles

### 1.1. Généralités

Sous le nom d'huile essentielle, on désigne les principes volatiles généralement odoriférants élaborés par l'organisme végétal. Ces composés volatils ont la propriété de se solubiliser dans les huiles et les graisses et par la même ont reçu empiriquement le nom d'HE. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons (**Bernard et al., 1988 ; Bruneton, 1993**).

Selon **Conner(1993)**, les HE sont des produits odorants, volatils du métabolisme secondaire d'une plante aromatique, normalement formée dans des cellules spécialisées ou groupes de cellules.

L'association française de normalisation (AFNOR) définit une huile essentielle comme étant « un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des citrus, soit par distillation à sec ». L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (**AFNOR, 2000**). Cette définition est restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de molécules organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses (**Garnero, 1996**). L'ensemble de ces composés peut être divisé en deux grands groupes; les hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes et rarement diterpènes) et les composés oxygénés, qui sont considérés comme substances aromatiques, de type phénylpropanoïde (**Besombes, 2008**).

Il existe naturellement d'autres corps qui peuvent entrer en faibles proportions dans la constitution de certaines huiles essentielles : acides organiques, cétones de faible poids moléculaire, coumarines volatiles, flavonoïdes, etc. (**Bernard et al., 1988**).

Dans la plupart des cas, la fonction biologique des HE demeure le plus souvent obscure. Il est toutefois vraisemblable qu'elles ont un rôle écologique aussi bien dans le domaine des

interactions végétales que dans celui des interactions végétales-animales : un rôle répulsif vis-à-vis des prédateurs (insectes, champignons) et attractif pour les insectes pollinisateurs (**Bruneton, 1995**).

Certains terpènes linéaires interviennent dans le métabolisme de la plante, ils peuvent être employés comme source énergétique (**Guignard, 1996**).

## 1.2. Biosynthèse des huiles essentielles

D'après **Bruneton (1995)**, la synthèse et l'accumulation des HE sont souvent associées à la présence de structures histologiques particulières qui sont généralement localisées sur ou à proximité de la surface du végétal tels que les cellules isolées (*Lauraceae* ou *Zingiberaceae*), poils sécréteurs (*Lamiaceae*), poches sécrétrices (*Myrtaceae* ou *Rutaceae*) et canaux sécréteurs (*Apiaceae* ou *Asteraceae*).

Selon **Bruneton (1999)**, seuls les terpènes les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée (monoterpènes et sesquiterpènes) et leurs dérivés oxygénés sont rencontrés dans la composition des HE.

### 1.2.1 Biosynthèse des monoterpènes

Le géranyldiphosphate « GDP » est considéré comme le substrat naturel pour la synthèse des monoterpènes (**Croteau, 1987**), et suite à des étapes d'isomérisation et de cyclisation, il se transforme en LDP (diphosphate linalylique). Le LDP s'ionise et se cyclise donnant ainsi une forme qui correspond au cation  $\alpha$ -terpinyl. De cet intermédiaire universel, la réaction peut prendre l'un des plusieurs itinéraires. Alternativement, le cation  $\alpha$ -terpinyl peut subir davantage de cyclisation, pour fournir l' $\alpha$ - ou le  $\beta$ -pinène. Ce cation peut aussi produire l' $\alpha$ -terpinéol, lequel après hétérocyclisation donne le 1,8-cineole (**Croteau et al., 1994**). Quelques synthèses de monoterpènes produisent les produits acycliques tels que le myrcène et le linalol (**Bohlmann et al., 1997**).

### 1.2.2 Biosynthèse des sesquiterpènes

Tous les sesquiterpènes sont dérivés du farnésyldiphosphate « FDP », et la diversité structurale de cette classe est plus grande que celle des monoterpènes, le nombre des monoterpènes avoisine les 1000 alors que les sesquiterpènes sont plus de 7000 (**Connolly et Hill,**

1991). De même que les monoterpènes, la formation des composés cyclohexanoïd, tel que  $\alpha$ -bisabolène, exige l'isomérisation préliminaire du trans-farnesyl qui est analogue à FDP et représente le précurseur des sesquiterpènes, suivie d'une cyclisation ionisation-dépendante. La plus grande taille de la chaîne du farnesyl permet également après cyclisation la formation de composés tel que le germacrène Cety-humulène (Steele et al., 1998). Des migrations méthyliques, et des réarrangements de Wagner-Meerwein, permetla génération d'une large gamme de structures. Les sesquiterpènes acycliques, tels que le  $\beta$ -farnésène, sont également dérivés de FDP (Crock et al., 1997). Les mécanismes de réaction des synthèses plastidiales des monoterpènes et les synthèses cytosoliques des sesquiterpènes ont des propriétés similaires (Alonso et Croteau, 1993).

### 1.3. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants qui sont plus ou moins modifiés pendant les processus de préparation (Bruneton, 1995).

#### 1.3.1 Entraînement à la vapeur

Ce procédé consiste à récupérer l'HE des plantes en faisant passer à travers ces dernières un courant de vapeur d'eau, ces vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées et récupérées par décantation. Les phénomènes intervenants lors de l'entraînement à la vapeur seraient des phénomènes d'osmose et de diffusion libre.

L'eau résiduelle peut encore contenir une faible proportion de certains composés volatils et peut être utilisée sous le terme d'eau florale.

#### 1.3.2 L'Hydrodistillation

Cette technique a été proposée par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur, mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Bruneton, 1993).

L'extraction qui s'effectue à température élevée, à pH acide peut engendrer des réactions secondaires au sein de l'HE à savoir : hydrolyse, élimination, cyclisation, réarrangement (**Benhabiles, 1995**). La durée de l'hydrodistillation qui par le contact prolongé de l'eau et de la plante augmente aussi les risques d'artefacts de distillation.

### **1.3.3 Expression à froid**

Cette technique consiste à récupérer les composés volatils par des moyens mécaniques (abrasion, compression, incision, perforation). On obtient ainsi une HE. Cette technologie est utilisée industriellement pour l'obtention d'HE d'agrumes. En général, on couple la récupération d'HE avec l'extraction du jus (**Richard, 1992**). Le principe de cette technique est basé sur la rupture ou la dilacération des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits et sur la pression du contenu de ces sacs sur les parois (**Dugo et Di Giacomo, 2004**).

### **1.3.4 Extraction par solvants volatils**

La technique consiste à la mise en contact de la matière végétale, placée dans un extracteur, avec un solvant volatil. Grâce à des lavages successifs, le solvant vasse charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

La législation sur les produits à destination des industries agro-alimentaires est extrêmement rigoureuse, ce qui conditionne donc le choix du solvant d'extraction. L'extraction est réalisée avec un appareil de type Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson.

### **1.3.5 Extraction au CO2 liquide ou supercritique**

L'extraction au CO2 liquide ou supercritique est une méthode d'extraction moderne, elle est basée sur le fait que certains gaz, notamment le CO2, dans des conditions de pression et de température dites critiques (PC=73,82 bars et TC=31,06°C) ou supercritiques, présentent un pouvoir de dissolution accru vis-à-vis de divers composés tels que les HE, les arômes, les colorants naturels, etc. (**Crabas et al., 2003**).

### 1.3.6 Distillation sèche

Ce procédé est utilisé pour extraire les huiles essentielles des végétaux fragiles tels que les pétales de rose. Elle consiste à chauffer de façon très modérée les plantes ou certaines parties de plantes sans ajout d'eau, ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles. L'avantage de cette méthode est la température à laquelle se déroule l'extraction, inférieure à 100 °C, qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles (Lucchesi, 2005).

### 1.3.7 Extraction assistée par micro-onde

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (méthanol, hexane). L'ensemble est chauffé sans jamais atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement (Anizon *et al.*, 2003).

En 2004, Lucchesi et ses collaborateurs ont mis au point une nouvelle technique d'extraction par micro-ondes sans solvant organique ajouté (SFME). Basée sur un principe relativement simple, l'extraction consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant organique. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes renfermant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite par la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, qui sont facilement séparable par simple décantation. Au cours de ces dernières années, cette technique a été le plus souvent comparée à l'hydro-distillation classique par de nombreux chercheurs. Lucchesi *et al.* (2007) et Bayramoglu *et al.* (2008) rapportent dans leurs études sur les huiles essentielles de cardamome (*Elettaria cardamomum*) et d'origan (*Origanum vulgare*) respectivement, que la technique SFME est très rapide et économique en termes d'énergie et de matière première.

## 1.4. Analyse des huiles essentielles

L'analyse chimique des HE est généralement réalisée par chromatographie en phase gazeuse (analyse quantitative) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie

de masse qui permet une séparation nette et une identification précise des composés d'une essence végétale (**Lahlou, 2004**).

#### **1.4.1 Chromatographie phase gazeuse (CPG)**

Depuis plus d'une trentaine d'années la CPG s'est développée irrésistiblement. Elle est devenue une méthode de choix pour la séparation d'un mélange complexe de produits volatils.

A l'aide de la CPG, les mélanges très complexes de substances volatiles peuvent être séparés, identifiés et quantifiés dans un temps relativement bref (**Richard et Multon, 1992**).

#### **1.4.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)**

Le développement important de la spectrométrie de masse dans l'identification des constituants complexes a été rendu possible grâce au couplage de la chromatographie en phase gazeuse directement avec la spectrométrie de masse. Grâce à ce couplage, il n'était plus nécessaire de recourir à l'isolement des constituants purs par chromatographie préparative, et simultanément il devenait possible d'obtenir un spectre de masse interprétable pour des quantités de substance qui allaient du microgramme au nanogramme (**Richard et Multon, 1992**).

En effet, l'utilisation de la CPG à haute résolution (colonne capillaire) couplée à la spectrométrie à basse échelle de masse, le tout allié à l'outil informatique (micro-processeur), permet le développement de méthodes d'identification fiables et rapides (**Benhabiles, 1995**).

##### ➤ **Principe**

L'échantillon à analyser est introduit dans le chromatographe puis séparé et analysé. Les différents constituants gazeux arrivent dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse où ils sont fragmentés. Les ions issus de la fragmentation sont dirigés vers le dispositif de séparation, ils sont alors triés suivant leur rapport masse/charge, puis leur répartition est donnée sous la forme d'un spectre de masse (**Lahlou, 2004**).

L'appareillage de spectrométrie de masse comprend donc trois parties principales :

- Une chambre d'ionisation ;
- Un système analyseur pour la séparation des ions ;
- Un ensemble de détection, amplification et enregistrement.

Un appareillage de CG-SM permet donc de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondant à l'identification précise de chaque constituant séparé par la CPG. C'est donc une technique de pointe permettant la connaissance d'échantillons parfois complexes en un temps très court.

## 2 Les Extraits aromatiques : composés phénoliques

Les polyphénols constituent l'un des groupes les plus nombreux et largement distribués des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux et présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et la voie acétate (**Lugasi et al.,2003**).

Les composés polyphénoliques sont constitués d'un noyau aromatique comportant une ou plusieurs fonctions hydroxyles ainsi que des groupements fonctionnels (ester, méthyle ester, glycosides).

### 2.1. Classification des composés phénoliques

Selon **Harborne (1989)**, les polyphénols peuvent être divisés en au moins 10 classes différentes selon leur structure chimique de base. Peuvent s'étendre de molécules simples, tels que les acides phénoliques, aux composés fortement polymérisés, tels que des tannins (**Lugasiet al., 2003**).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (**Beta et al.,2005**).

La Figure 1 montre la structure de quelques composés phénoliques.

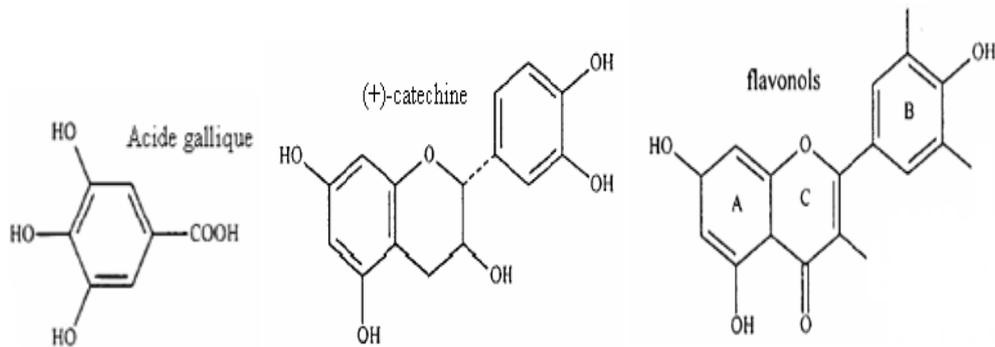


Figure 1: Structure de l'acide gallique, catechine et flavonols (Wang et Mazza, 2002).

### 2.1.1 Les acides phénoliques

Ces acides sont contenus dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotová et al., 2003). Comme exemple d'acide phénolique, on cite : l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide protocatechique, l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide gallique. Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prebiotique, antioxydant, de chélation et anti-inflammatoire. Leur toxicité est faible et considéré non toxique. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (Psotová et al., 2003). Cet acide ainsi que l'acide férulique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris alors que l'acide gallique inhibe la formation du cancer œsophagien chez les rats (Hale, 2003).

### 2.1.2 Les tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires d'origines végétales, existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines, leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3 000 (Cowan, 1999). Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (Berthod et al., 1999). En plus, des propriétés classiques des phénols, les tannins précipitent les alcaloïdes, la gélatine et les protéines.

### 2.1.3 Les flavonoïdes

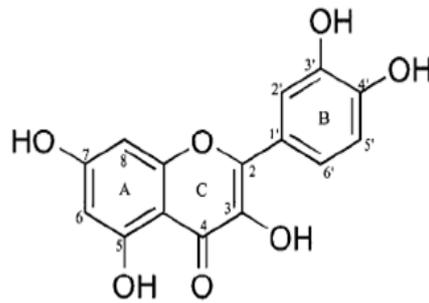
Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (**Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005**).

#### 2.1.3.1 Structure et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (Fig. 2)(**Bruneton, 1999; Pietta, 2000**).

Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C (**Pietta, 2000**), 14 groupes différents ont été identifiés dont six groupes sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (**Heim et al., 2002 ; Hendrich, 2006**).

Les composés de chaque classe se distinguent entre eux par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B (**Heim et al., 2002**). Dans les flavonoïdes au sens strict, le deuxième cycle benzène (B) se lie à l'hétérocycle (C) en position 2. Lorsque la liaison s'effectue en position 3, les composés résultants sont appelés isoflavonoïdes. En plus, l'hétérocycle (C) peut être une pyrone (flavone) ou son dihydrodérivé (flavanone). La fixation d'un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3 dans les deux cas précédents constitue respectivement les flavonols et les flavanonols (**Birt et al., 2001**). À l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone ou génine, l'unité glycosidique la plus commune est le glucose mais parfois elle peut être glucorhamnose, galactose, arabinose ou rhamnose (**Heim et al., 2002**).



**Figure 2: Structure générale du noyau des flavonoïdes (Heim et al., 2002)**

### 2.1.3.2 Biosynthèse des flavonoïdes

Elle se fait à partir d'un précurseur commun, la tétrahydroxychalcone (fig.3). Cette chalcone métabolisée sous l'action d'enzyme ; la chalcone isomérase, en naringénine. Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner : apigénine ou le dihydroflavonol. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase, se métabolise en kaempférol ou en leucoanthocyanidol. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols et anthocyanidols, ce dernier sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (**Marfak, 2003**).

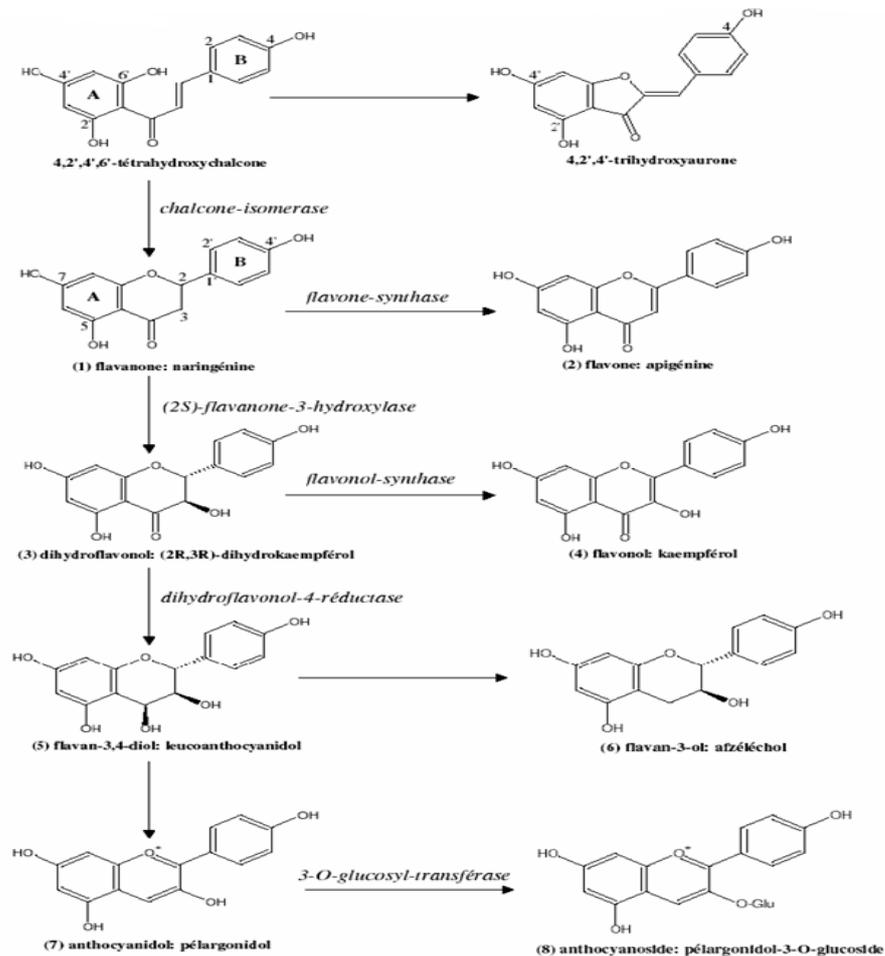


Figure 3: Biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

## 2.2. Rôle physiologique des composés phénoliques

Les flavonoïdes et d'autres polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux. L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur des polyphénols (Lugasi et al., 2003).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Hadi, 2004).

Les pigments responsables de la coloration des fleurs représentent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plupart de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones

et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour altérer, par co-pigmentation, la couleur des fleurs et fruits (**Brouillard et al., 1997**).

Les cellules végétales répondent au stimuli environnemental en synthétisant les métabolites secondaires qui peuvent les protéger contre les agents de l'agression par la formation d'un tissu cicatriciel résistant aux infections (**Misirli et al., 2001**).

L'attaque de microbe pathogène telle que le virus, les bactéries ou les mycètes induit une cascade de réactions qui peuvent mener à la résistance étant exprimée à l'emplacement de l'infection ou dans d'autres parties non infectées de la plante. Cette résistance systémique implique l'existence d'un signal endogène transféré de l'emplacement d'infection à d'autres parties de la plante. On pense que la première étape du mécanisme de la défense comporte une accumulation rapide des phénols à l'emplacement d'infection, qui fonctionnent pour ralentir la croissance du microbe pathogène (**Misirli et al., 2001**).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Rees et Harborne, 1985**). Les mécanismes de l'action et de l'interaction, et les produits chimiques qu'ils contiennent demeurent dans la plupart indéterminés. Des chercheurs deviennent graduellement intéressés dans l'identification des principes actifs dans les extraits avec l'étude complémentaire intensive de leurs mécanismes d'action (**Sun et al., 2002**).

Les principales activités biologiques des composés phénoliques sont résumées dans le tableau 1:

**Tableau 1: Activités biologiques des composés phénoliques.**

<b>Polyphénols</b>	<b>Principales activités</b>
Acides phénols (cinnamique et benzoïque)	Antibactériens, antifongiques et antioxydants.
Coumarines	Vasoprotectrices et antiœdémateuses.
Flavonoïdes	Antitumorales, anticarcinogènes, anti-inflammatoires, hypotenseurs, diurétiques et antioxydants.
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires.
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, antitumorales, antifongiques et anti-inflammatoires.
Tanins galliques et catéchiques	Antioxydants.

---

## Monographie des espèces étudiées

---

### 1 La Germandrée (*Teucrium polium* subsp. *capitatum* Briq.)

#### 1.1 Description et classification

Le nom *Teucrium* est dédié à Teucer de Troie, qui découvrit dit-on les propriétés de la germandrée (Beloued, 2005). C'est une plante dont l'usage remonte à près de deux mille ans. "Djaïda" chez les Arabes ou plus communément Herbe de Marie, elle est connue pour ses propriétés cicatrisantes, diurétiques, diaphorétiques, antipyrétiques, antispasmodiques et anti-inflammatoires.

La germandrée polium est un sous arbrisseau à tomentum blanchâtre et à pousses nombreuses pouvant atteindre 45 cm de haut. Les rameaux peuvent être dressés ou ascendants avec un tomentum blanc ou doré. Les tiges sont au moins en partie blanchâtres, au sommet desquelles se trouvent plusieurs capitules de 1 cm au plus. Les feuilles dont la taille varie de 7 à 27 mm sont presque sans pétiole, opposées ou groupées en bouquet. Les fleurs sont en grappes denses au sommet des rameaux, les feuilles sont oblongues, entières et crénelées. Les étamines sont tordues en spirales, le fruit quant à lui est indéhiscent (Bärtels A., 1998).



Figure 4 : *Teucrium polium* subsp. *capitatum* au stade de floraison

Le genre *Teucrium* est très complexe et, comme beaucoup d'autres Labiées, il est largement distribué dans les régions du bassin méditerranéen. Les différents taxa peuvent être des arbustes, des arbrisseaux ou des plantes vivaces, annuelles ou bisannuelles. On peut les trouver dans différents habitats incluant des champs cultivés, des dunes de sable ou des montagnes rocheuses à hautes altitudes (**Juan et al., 2004**).

La classification systématique de la germandrée est la suivante (**Spichiger et al., 2004**) :

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Astéridées
<b>Sous classe</b>	Astéridées II
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiaceae
<b>Genre</b>	<i>Teucrium</i>

## 1.2. Répartition géographique

- **Dans le monde**

Il existe plus de 300 espèces de germandrées réparties à travers le monde. L'espèce s'étend de l'Asie occidentale en passant par l'Europe et le Maghreb et jusqu'au nord de l'Amérique. Elle est très répandue en méditerranée (Algérie, Tunisie, Espagne, France, Italie), mais on la trouve également en Iran et en Turquie à l'est, en Scandinavie au nord et même au Canada à l'ouest.

- **En Algérie**

Le genre *Teucrium* est présent en Algérie avec 22 espèces et 12 sous espèces (**Quezel et Santa, 1963**).

### 1.3. L'Huile essentielle de germandrée

Les études menées sur la composition des HE de différentes espèces de germandrée ont montré que, celles-ci étaient majoritairement constituées par de l' $\alpha$ -Pinene et du  $\beta$ -Pinene, du  $\beta$ -Caryophyllene et du Germacrene D ou par du t-Cadinol et ou de l' $\alpha$ -Cadinol (**Kabouche et al., 2006**), comme on peut trouver des HE à Linalol ou  $\beta$ -Eudesmol tel que nous le montre le tableau suivant :

**Tableau 2: Composé dominant des HE de différentes espèces germandrée.**

Espèces	Composé dominant	Références
<i>Teucrium atratum</i>	t-Cadinol (45,3%)	<b>Kabouche et al., 2005</b>
<i>Teucrium polium</i> subsp. <i>aurasiacum</i>	$\alpha$ -Cadinol (46,8%)	<b>Kabouche et al., 2005</b>
<i>Teucrium polium</i> subsp. <i>cylindricum</i>	$\beta$ -Eudesmol (non précisé)	<b>Cozzani et al., 2005</b>
<i>Teucrium scorodonia</i> subsp. <i>scorodonia</i>	Germacrene B (26,2%)	<b>Maccioni et al., 2007</b>
<i>Teucrium flavum</i>	$\beta$ -Caryophyllene (30,6%)	<b>Baher et Mirza, 2003</b>
<i>Teucrium mascatenses</i>	Linalol (27,8%)	<b>Hisham et al., 2006</b>

### 1.4. Application des HE de germandrée

- **Activité antioxydante** : **Ljubuncic et al. (2006)** ont montré que l'HE de germandrée avait une meilleure activité que le BHT, un antioxydant habituellement utilisé dans l'industrie alimentaire. Cette activité peut être attribuée à la présence de polyphénols qui agissent comme des réducteurs.

- **Activité hypoglycémique** : La germandrée aurait un effet significatif sur la réduction du taux de glucose dans le sang. Ceci peut être dû à l'amélioration du métabolisme du glucose au lieu de l'augmentation de la sécrétion d'insuline (**Aburjai et Hudaib, 2006**).

- **Activité anti-inflammatoire :** Les tests effectués sur les œdèmes de la patte d'un rat ont montré des effets pharmacologiques comparables à ceux des anti-inflammatoires conventionnels (Aburjai et Hudaib, 2006).

- **Activité larvicide :** El-Shazly et Hussein (2004) ont montré que l'HE de germandrée avait une remarquable activité larvicide contre les larves de *Culex pipiens*, *Musca domestica* et *Ceratitis capitata*.

- **Activité anti-tumoral :** Elmasri et al., (2016) ont montré que certains composés isolés de l'extrait de *Teucrium polium* provenant d'Egypte inhibent la croissance des cellules tumorales.

## 2 La Sarriette (*Satureja calamintha* subsp. *nepeta* (L.) Briq.)

Nommée *Calamintha nepeta* (L.) Savi selon la nouvelle nomenclature (Dobignard et Chatelain, 2013), elle portera ce nom pour le reste du document.

### 2.1. Description et classification

La sarriette *calamintha* appelée aussi « calament » est l'une des plantes vivaces de la famille des lamiacées originaires d'Europe et d'Asie occidentale (plus précisément d'Iran et d'Europe centrale). C'est une plante des bois et rocaillies incultes, proches de la menthe, dont on utilise les tiges, feuilles et les fleurs.

Le calament des montagnes pouvait être un des multiples constituants de la thériaque de la pharmacopée maritime occidentale au XVIII<sup>e</sup> siècle.

Les calaments sont des plantes aromatiques à inflorescences en cymes lâches et pédonculées. Feuilles ovales entières ou faiblement dentées à odeur de citron ou de menthe. Corolles roses ou violacées, bien plus longues que le calice. Les étamines par paires, un peu conniventes, le fruit quant à lui est ovoïde et lisse (Quezel et santa, 1963).

Les calaments appartiennent aux sous genres : *Acinos*, *Micromeria*, *Clinopodium* et *Calamintha*, qui sont regroupés au sein du même genre *Satureja*.



**Figure 5: *Calamintha nepeta* (L.) Savi au stade de floraison**

Le calament nepeta est un sous-arbrisseau ou plante vivace aromatique à inflorescence en cymes lâches et pédonculés de 5-15 fleurs. Feuilles ovales, souvent dentées de couleur verte sombre de 4 cm de long. Calice bilobé, gibbeux à la base, de 6-7 mm à dents subégales. Corolle violet pâle, parfois roses de 1.5cm avec un fruit ovoïde, lisse. Connue sous le nom de « Meuta » ou « Nebta ».

Ci-dessous la classification systématique de la sarriette (**Spichiger et al, 2004**) :

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Astéridées
<b>Sous classe</b>	Astéridées II
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiaceae
<b>Genre</b>	<i>Satureja</i>

## 2.2. Répartition géographique

- **Dans le monde**

Il existe environ 50 espèces du sous genre *calamintha* repartis dans les régions tempérées de l'hémisphère nord, elles sont répandues en Iran et en Europe centrale.

- **En Algérie**

Le genre *Satureja* est présent en Algérie avec quatre sous genres ; parmi ces derniers le sous genre *calamintha* regroupe cinq espèces et trois sous espèces (**Quezel et santa, 1963**).

## 2.3. Composition chimique des HE de sarriette

Les études menées sur la composition des HE de deux espèces de calament à savoir : *Calamintha sylvatica* et *Calamintha vardarensis* montrent que le composé majoritaire de ces deux huiles est le cis-piperitone oxide avec 65.6% et 48.9% à 59.2% pour *C. vardarensis* et *C. sylvatica* respectivement. Le rendement en HE pour ces espèces est de 1.54% pour *C. vardarensis* et de 0.11% à 0.94 % pour *C. sylvatica* (**Mimica-Dukic et al., 2004**).

## 3 Le Khella « *Ammi Visnaga* (L.) Lam.»

Nommé *Visnaga daucoides Gaertn* selon la nouvelle nomenclature (**Dobignard et Chatelain, 2013**), il portera ce nom pour le reste du document.

### 3.1. Description et classification

Le nom *Ammi* vient du grec ammos, qui signifie «sable», en rapport avec le terrain où pousse la plante. *Visnaga*, le nom de la variété, dériverait de «bis acutum» qui veut dire «à double pointe». Les vieux noms latins étaient *Cuminum alexandrinum*, *C. aethiopicum* et *C. regium* (cumin alexandrin, éthiopien ou royal). Khella, le nom arabe de la plante, est utilisé dans tout le Moyen-Orient et souvent aussi en Europe (**Vogel, 2013**).

Le khella est originaire du delta du Nil et on l'utilisait déjà comme remède dans l'ancienne Egypte comme l'indique le papyrus d'Eber. Dans les souks orientaux, on vend encore aujourd'hui les ombelles séchées de la plante dont les tiges sont utilisées comme cure-dents (**Vogel, 2013**). Elle est communément connue sous le nom « Bachnikha » ou « Noukha » au Maroc (**Satrani et al., 2004**) s'emploie en gargarismes, pour les soins de la bouche (gingivites, abcès buccaux, etc.) et contre les maux dentaires.

L'herbe annuelle ou bisannuelle de la famille des Apiacées à fleurs blanches en ombelles pousse au printemps sous la forme d'une tige dressée, ronde et cannelée, atteignant de 80 à 120 cm de hauteur. Les feuilles gris vert ont environ 20 cm de long ; elles sont disposées en chevrons et pennées. Le haut de la tige est ramifié et légèrement recourbé. Les grandes ombelles terminales réunissent parfois jusqu'à une centaine de pédicelles portant à leur tour de petites ombelles à fleurs blanches. A maturité, les pédicelles épais et rigides sont rétractés et forment comme un nid. Leur goût est agréable et après leur lignification, on les utilise comme cure-dents. Les petits fruits lisses et ovales tombent quand ils sont secs; à la déhiscence, ils donnent deux graines d'un brun grisâtre, d'environ 2 mm de long (Vogel, 2013). Les pédoncules des ombelles, très nombreux, jaunissent et se tassent les uns contre les autres après la floraison (Hammouda et al., 2005).



**Figure 6: *Visnaga daucoïdes* au stade de floraison**

La classification systématique de *Visnaga daucoïdes* est la suivante (Dupont et Guignard, 2007) :

<b>Règne</b>	Plantea.
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>S/ Embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Astéridées
<b>S/Classe</b>	Euastéridées
<b>Ordre</b>	Apiales

**Famille**                      Apiaceae

**Genre**                        *Visnaga*.

### 3.2. Répartition géographique

Elle pousse spontanément autour du bassin méditerranéen, jusqu'au Proche Orient, sur des terres en friche et des terres argileuses. Elle est particulièrement cultivée dans la vallée du Nil en Égypte, au Maroc, dans l'ouest algérien, en Tunisie, en Argentine, au Chili, au Mexique ainsi que dans le sud des Etats-Unis. Bien installée dans tout le pourtour méditerranéen, elle s'est ensuite naturalisée en Europe (**Franchomme et Péroël, 2001 ; Zhiri, 2004**). Cette plante se caractérise par son hygrochassie, c'est-à-dire que les pédicelles des ombelles s'étalent en milieu humide et se recroquevillent en cas de sécheresse. Les ombellifères de nos contrées sont xérochassiques, c'est-à-dire qu'ils s'ouvrent en séchant et se referment à l'humidité. La floraison a lieu en Juillet (**Vogel, 2013**). Originaires d'Afrique du Nord, le Khella pousse à l'état sauvage au Moyen-Orient et dans les autres pays méditerranéens. Il s'acclimaté en Australie et en Amérique du sud (**Larousse, 1997**).

Le Khella affectionne les champs et les lieux sablonneux rocailleux et secs et s'adapte parfaitement aux sols argileux. Vivace, elle pousse couramment aux abords des oueds et des chemins.

### 3.3. Composition chimique de Khella

Les études phytochimiques de Khella ont révélé sa richesse en furanochromones dont la khelline et la visnagine ainsi que des pyranocoumarines dont la visnadine. La khelline est la chromone la plus active présentant des propriétés spasmolytiques. La visnadine a des propriétés antispasmodique et vasodilatatrice des coronaires.

La khelline, la visnagine et la visnadine (fig.7) sont les principes actifs des fruits de *Visnaga*, ils sont ainsi utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour le traitement de l'angine et de l'asthme (**Grayna et al., 1998 ; Kleeman et al., 1999**).

La teneur de ces composés dans les fruits secs varie largement selon les facteurs génétiques et les conditions environnementales (**Gynayd et Erim, 2002**).

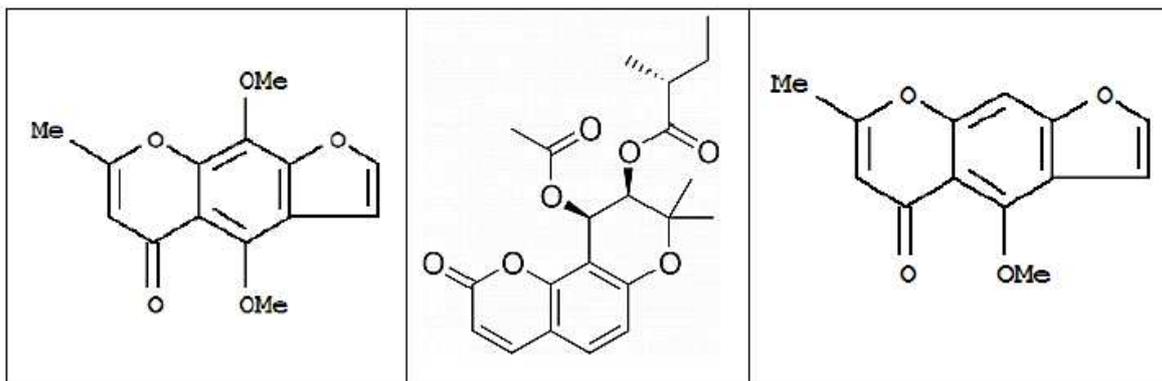


Figure 7: Formules chimiques de la khelline, visnadine et visnagine (Filliat, 2012).

## 4 L'Origan (*Origanum floribundum* Munby)

### 4.1. Description et classification

Le nom origan est dérivé du grec « *oros* » et « *genos* » qui veut dire « éclat ou parure des montagnes ». Connus depuis des millénaires, ils étaient l'objet de certaines superstitions on leur prêtait le pouvoir de préserver l'homme et l'animal des maladies (Richard, 1992).

L'origan est un mini arbuste pérenne, à port dressé ou étalé. Les feuilles sont de forme ovale, pétiolée, contenant des poils glandulaires à leur surface. Ces glandes s'étendent également sur la tige et sur les bractées. Les fleurs sont hermaphrodites, petites de 5mm de longueur environ, aux pétales de couleur rose, sont en nombre de 5, plus grandes que les sépales, présentent des extrémités arrondies, les fleurs sont groupées en panicule (corymbe) au sommet de la tige et des rameaux.

La variation morphologique à travers le genre a mené à la distinction de 10 sections consistant en 42 espèces ou 49 taxons (espèces, sous espèces et variétés) (Danin et Künne, 1996).

Il appartient à la grande famille des Lamiaceae, Le genre *Origanum* inclut des arbustes nains dicotylédones, des plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces qui se reproduisent dans les secteurs chauds et montagneux.



**Figure 8 : *Origanum floribundum* au stade de floraison**

La classification systématique de l'origan est la suivante (Spichiger et al., 2004) :

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Astéridées
<b>Sous classe</b>	Astéridées II
<b>Ordre</b>	Lamiales
<b>Famille</b>	Lamiacées
<b>Genre</b>	<i>Origanum</i>

## 4.2. Répartition géographique

### ➤ Dans le monde

Cette plante méditerranéenne a l'aptitude de pousser dans plusieurs pays d'Europe et d'Asie également, spécialement en Chine et en Inde (Ruberto et al., 2002) 49 taxons sont répartis à travers le monde, dont : 46 sont répartis entre des pays du pourtour méditerranéen ; 21 se trouvent en Turquie, dont 12 sont endémiques à ce seul pays.

### ➤ En Algérie

L'origan est une plante répandue en Algérie, elle est représentée par deux espèces : *Origanum glandulosum* et *Origanum floribundum*. Cette dernière est d'ailleurs une espèce endémique algérienne (Quezel et santa, 1963).

### 4.3. Composition chimique de l'huile essentielle d'origan

La teneur et la composition de l'huile essentielle varie en fonction de l'espèce, du stade de développement et des conditions environnementales. Le tableau ci-dessous, montre les principaux composés de quelques espèces d'origan.

**Tableau 3: Principaux composés de certaines espèces d'origan.**

Espèces	Principaux composés	Références
<i>Origanum heracleoticum</i>	Carvacrol (54%)	Oussalah et al., 2006
<i>Origanum compactum</i>	Carvacrol (22%) et $\gamma$ -terpinène (23 %)	Oussalah et al., 2006
<i>Origanum floribundum</i>	Carvacrol et thymol	Baser et al., 2000
<i>Origanum majorana</i>	Tepinène-4-ol (26%)	Oussalah et al., 2006
<i>Origanum vulgare L.</i>	sesquiterpènes	Lawrence et al., 1984

### 4.4. Principales utilisations d'origan

#### 4.4.1 Utilisation comme épice

Différentes parties de la plante (feuilles, sommités fleuries) sont actuellement employées en industrie alimentaire en tant qu'épices. Elle est considérée comme étant l'une des épices les plus répandues dans la région méditerranéenne (Baser et al., 2000).

#### 4.4.2 Utilisation pour son pouvoir biologique

L'huile essentielle d'origan possède un effet antiseptique, est légèrement tonique et digestive. Elle provoque la menstruation, apaise les nerfs, soulage les maux de tête et de dents, elle aide aussi à lutter contre les insomnies.

L'origan est aussi un anti-inflammatoire, antifongique, antibactérienne, antioxydante antispasmodique expectorant, diurétique et sudorifique. C'est un bon stimulant de l'appareil digestif, il est particulièrement utile dans diverses affections des voies respiratoires (Bronchique, trachéo-bronchite) elle calme la toux en favorisant l'expectoration. Par ailleurs on a rapporté d'autres activités biocides en tant qu'insecticide, nématocide et antimollusque (Alfaïz, 2006).

## 5 Irradiation des espèces végétales

### 5.1. Traitement par irradiation

Le rayonnement est une énergie qui se déplace dans l'espace, tout comme la lumière et la chaleur du soleil. La source de rayonnement la plus utilisée pour l'irradiation des aliments est le cobalt-60 ; celui-ci produit des rayonnements électromagnétiques qui possèdent une énergie beaucoup plus élevée que celle de la lumière (Cabana, 1996).

Grace aux rayons ionisants produit par les irradiateurs, cette technologie est utilisée sur des aliments conditionnés et déjà emballés afin de diminuer le nombre de bactéries, d'améliorer la salubrité de l'aliment, d'augmenter sa durée de vie, et d'éliminer les insectes qu'ils peuvent contenir. L'avantage de l'irradiation par rapport aux autres méthodes traditionnelles est que les rayons pénètrent directement au cœur de l'aliment, contrairement aux pesticides et aux gaz qui eux agissent en surface. Le traitement s'effectue à froid, se qui permet de conserver les valeurs nutritives et les propriétés physico-chimiques des aliments. Avec une telle méthode, l'utilisation des additifs alimentaires tels les nitrites et les nitrates peut être diminuée voire éliminée. Le *Food and Drug Administration* des états-unis a décidé d'utiliser l'irradiation plutôt que la fumigation pour le traitement des épices, des fruits et des légumes.

### 5.2 Sources de rayonnement

Ioniser c'est soumettre les denrées alimentaires à l'action des radiations fondamentales pour les assainir ou les stériliser, et augmenter leur durée de vie (Pouget, 2000).

Trois types de rayonnements ionisants peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire à savoir (Vasseur, 1991) :

- Rayons gamma émis par les radionucléides  $^{60}\text{Co}$  ou  $^{137}\text{Cs}$  ;

- Rayons X produits par des appareils fonctionnant à un niveau d'énergie égal ou inférieur à 5 MeV ;
- Electrons produits par des appareils fonctionnant à un niveau d'énergie égal ou inférieur à 10 MeV.

- **Rayonnement gamma**

Le rayonnement Gamma est un noyau atomique qui ne souffre pas d'un déséquilibre baryonique, mais qui se trouve dans un état d'énergie instable, émet un photon très énergétique, donc très pénétrant, pour atteindre un état d'énergie stable ; il faut plusieurs centimètres de plomb pour l'arrêter. Ce rayonnement est obtenu à l'aide de radioisotopes, généralement du Cobalt-60, et plus rarement du Césium-137.

Les rayons gamma émis par l'un ou l'autre de ces deux radionucléides ont une capacité de pénétration suffisante pour répondre aux besoins de l'irradiation de presque tous les aliments. Le coût des radionucléides artificiels est jugé acceptable pour l'irradiation industrielle des aliments, compte tenu de la grande souplesse d'utilisation et du pouvoir de pénétration élevé des rayons gamma.

Les installations d'irradiation des aliments sont conçues et disposées différemment selon l'objectif visé et, pour l'essentiel, elles sont de deux types, permettant une exploitation en continu ou en discontinu. Dans les installations en discontinu, on irradie une quantité donnée d'aliments pendant une durée précise. La cellule à l'intérieur desquels sont placés les aliments irradiés est ensuite déchargée et l'on procède à la mise en place d'un nouveau lot, qui est à son tour irradié. Dans les installations d'irradiation en continu, les aliments circulent à travers la cellule à une vitesse déterminée, calculée de façon que tous les aliments reçoivent exactement la dose voulue.

### **5.3 Doses de rayonnement**

Dans la pratique, la dose utilisée varie selon le type de nourriture, et selon l'effet désiré. Les niveaux de traitement peuvent être regroupés en trois catégories (**Arvanitoyannis et al., 2008**) :

- Dose dite « **faible** », jusqu'à 1 kGy : Elle est utilisée pour retarder le processus physiologique, tels que le murissement ou la germination des fruits frais et des légumes. Elle diminue aussi les insectes et parasites présents dans les aliments.

- Dose dite « **moyen** », de 1 à 10 kGy : Elle est utilisée pour réduire les microorganismes pathogènes présents dans divers aliments.
- Dose dite « **forte** », plus de 10 kGy : Elle est utilisée pour la stérilisation des viandes, les volailles, les fruits de mer et d'autres aliments. (Seo et al., 2007).

L'intervalle des doses d'irradiation en fonction de l'effet recherché est représenté ci-dessous.

**Tableau 4 : Les principaux effets recherchés par les doses efficaces d'irradiation**

Doses ( kGy)	Effet recherché
0.03 à 0.1	Inhibition de la germination des bulbes et tubercules
1 à 3	Désinsectisation
1 à 6	Pasteurisation(Radurisation)
15 à 50	Stérilisation(Radappertisation)
60	Inhibition de l'activité enzymatique

Dans tout procédé d'irradiation, que ce soit à l'échelle industrielle, ou au laboratoire, il est indispensable de connaître avec précision, la dose d'irradiation absorbée par le produit. Dans le but de déterminer la dose reçue par un objet, et la répartition des doses dans un objet volumineux, plusieurs procédés dosimétriques sont développés (FAO, 1999).

#### 5.4 Conséquences biologiques du traitement par irradiation

Les rayonnements ionisants entraînent surtout des modifications chimiques de l'ADN et de l'ARN: il s'agit de ruptures de chaînes ou liaisons d'hydrogène ou plus grave de formation de ponts entre bases successives d'un même brin (Mafart, 1995).

Les modifications peuvent avoir comme conséquences un blocage de la duplication de l'ADN, lorsqu'il n'existe pas de système de réparation pour ce type de liaison et un arrêt de la synthèse de protéines lorsque l'ARN messager rencontre un codon radiomodifié pour lequel il n'existe pas d'ARN de transfert correspondant (Le Corre et Venaille, 1989).A cela s'ajoute une oxydation détruisant la structure lipoprotéique de la membrane. Ces perturbations entraînent une inhibition de la croissance, voire la mort des cellules.

Les micro-organismes (spécialement les bactéries à Gram négatif comme les salmonelles) peuvent être détruits par irradiation. En revanche, les spores bactériennes ne sont détruites qu'à fortes doses, de sorte que l'irradiation n'exclut pas avec certitude le risque de botulisme, maladie d'origine alimentaire comportant un fort taux de létalité.

Une dose de rayonnement déterminée détruit une certaine proportion de la population microbienne exposée, quelle que soit son effectif. Cette caractéristique ou ce résultat, du traitement par irradiation fait que plus l'effectif de la population d'agents bactériens d'altération est élevé avant le traitement, plus cette population reste nombreuse après l'irradiation. Et il va de soi que si l'altération a déjà commencé, l'irradiation ne peut rien y faire. Par conséquent, comme pour toutes les autres méthodes de conservation, l'irradiation ne saurait se substituer à de bonnes règles d'hygiène lors de la production et de la transformation des aliments.

---

# Activités biologiques des substances naturelles

---

## 1 Activité antioxydante

Les lipides forment une classe de constituants biologiques nutritionnellement importants pour la part calorique et l'apport indispensable d'acides gras essentiels et de vitamines liposolubles qu'ils présentent dans la ration alimentaire. Lorsqu'ils sont extraits de leur contexte de protection naturelle, tous les corps gras (ou lipides ou matières grasses) subissent au cours de leurs conservations ou transformation des altérations de type oxydatif.

### 1.1. Les espèces oxygénées réactives

Les espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive OxygenSpecies) sont générées naturellement dans la mitochondrie au cours de la respiration cellulaire (**Tarnawski et al., 2006**). Ce sont des produits de l'oxygène, généralement divisés en espèces radicalaires et non-radicalaires, qui se caractérisent par une instabilité et/ou un pouvoir oxydant fort. Si les espèces radicalaires se distinguent par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe, les espèces non-radicalaires sont caractérisées par un oxygène avec un étage d'oxydation supérieur à (-2). Dans les deux cas, ces molécules vont chercher par oxydation à compléter la couche électronique externe de l'oxygène pour tendre vers une forme plus stable.

Parmi les espèces oxygénées réactives, nous avons : le superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochloreux (HClO) et le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ). Ces espèces sont généralement à l'origine de toutes les autres et sont fréquemment rencontrées dans les maladies à composante inflammatoire telles que les maladies inflammatoires chroniques et certaines maladies cardiovasculaires (**Néve, 2006**).

### 1.2. Mécanismes généraux de l'oxydation des lipides

D'après **Eymard (2003)**, l'oxydation des lipides peut résulter de plusieurs voies réactionnelles en fonction du milieu et des agents initiateurs :

- L'auto-oxydation catalysée par la température, les ions métalliques, les radicaux libres;

- La photo-oxydation, initiée par la lumière en présence de photosensibilisateurs;
- L'oxydation enzymatique initiée par la lipoxygénase.

### 1.2.1 Auto-oxydation

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Il s'agit d'un enchaînement de réactions radicalaires se déroulant en trois étapes (fig.9). Une première réaction produit un radical libre par élimination d'un hydrogène de l'acide gras (*initiation*). Puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs radicaux libres (*propagation*) qui se combinent pour former des composés non radicalaires (*terminaison*).

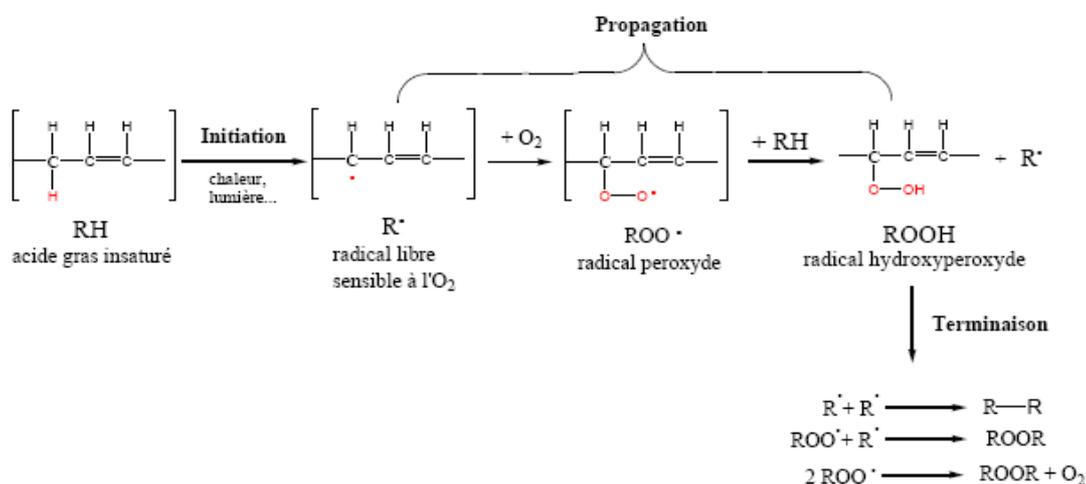


Figure 9: Oxydation d'un acide gras insaturé (Moll et Moll, 1998).

### 1.2.2 Photo-oxydation

La photo-oxydation est une voie importante de production d'hydroperoxydes en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photosensibilisateurs tels que les hémoprotéines ou la riboflavine (Hultin, 1992). Les photosensibilisateurs (Sens) absorbent l'énergie lumineuse et passent à l'état triplet excité (Sens<sup>3</sup>) (Hultin, 1994). Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (Frankel, 1998).

Les photosensibilisateurs de type I, telle que la riboflavine, agissent comme les radicaux libres initiateurs. Dans leur état triplet, elles arrachent un atome d'hydrogène ou un électron aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène.



Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle et l'érythrosine, réagissent dans leur état excité (Sens<sup>3</sup>) avec l'oxygène triplet auquel elles transfèrent leur énergie pour donner de l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>).



L'oxygène singulet ainsi formé est très électrophile et peut réagir directement sur un acide gras insaturé (RH) formant ainsi un hydroperoxyde ROOH.



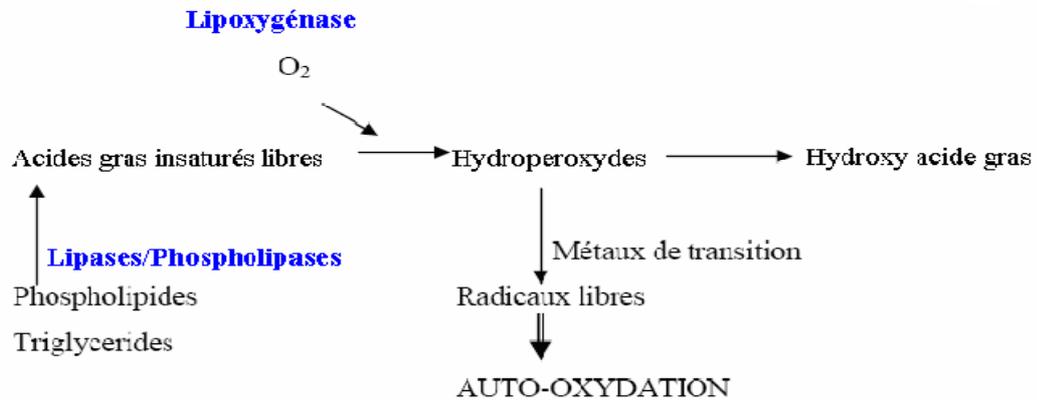
Par la suite interviennent les réactions radicalaires en chaîne de l'auto oxydation. Les hydroperoxydes ainsi formés sont différents de ceux formés par autooxydation (**Frankel, 1998**).

### 1.2.3 L'oxydation enzymatique

Le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés peut être d'origine enzymatique. Les deux enzymes principalement impliquées sont la lipoxygénase et la cyclooxygénase (**Hultin, 1994**). La lipoxygénase catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé selon une réaction stéréospécifique et aboutit à la formation d'hydroperoxydes.

Elle agit spécifiquement sur les acides gras non estérifiés. Son activité est donc souvent couplée avec celle des lipases et phospholipases (Fig.10). La cyclooxygénase est une lipoxygénase qui incorpore deux molécules d'oxygène au niveau d'un acide gras pour former des hydroperoxydes spécifiques (**Eymard, 2003**).

L'oxydation enzymatique se produit même à basse température. Durant le stockage à l'état congelé, l'activité enzymatique est très faible. Cependant, une fois la décongélation amorcée et des températures de 0°C à 4°C atteintes, il semblerait que cette activité reprenne et s'accroisse (**Frankel, 1998**).



**Figure 10 : Mécanisme d'initiation de la peroxydase des lipides par l'activité lipoxygénasique (German et Kinsilla, 1985).**

### 1.3. Les antioxygènes

Un antioxydant est défini comme étant toute substance présente en faible concentration relative à un substrat oxydable et qui diminue ou prévient l'oxydation de ce substrat (Favier, 2003). Cette définition s'applique à un grand nombre de substances :

#### 1.3.1 Les antioxydants naturels

Ils sont de plus en plus préférés aux produits de synthèse. De nombreuses études portent sur la recherche de molécules naturelles ayant des propriétés antioxydantes. Ainsi les sources d'antioxydants naturels sont nombreuses et variées : tocophérols, caroténoïdes, acide ascorbique, extraits de plantes, huiles essentielles, extraits de fruits, de légumes, de thé, etc. (Dorman *et al.*, 2004, Tepe *et al.*, 2005, Kumaran et Karunakaran, 2006).

Des recherches intensives sur plusieurs plantes ont été entreprises, plusieurs composés actifs ont été isolés et évalués comme étant des antioxydants. Dans la majorité des cas le composé actif est un phénol (Cuvelier *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1997) ; flavonoïde (Pietta, 2000) et anthocyanidine (Wang *et al.*, 1998).

Chez les plantes, les substances naturelles se trouvent sous forme de mélange complexe, qui assure la protection de la plante contre le stress oxydatif dû aux effets synergiques ou additifs (Moure *et al.*, 2001). L'utilisation des extraits de plantes ou de fractions enrichies est devenue aujourd'hui une façon très attractive pour préserver les aliments.

### 1.3.2 Les antioxydants de synthèse

Les antioxydants synthétiques, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs en raison de : leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, dans le but de prévenir la rancidité. Plusieurs antioxydants synthétiques comme le BHT (1), le BHA (2), le TBHQ (3) et PG (4), sont utilisés dans les cosmétiques et les huiles végétales (Fig.11) (Guo *et al*, 2006). Malgré leur forte activité antioxydante, l'excès de ces antioxydants synthétiques peut être toxique. Ils sont souvent responsable d'effets carcinogènes et peut même présenter un danger sur la santé humaine (Williams, 1994).

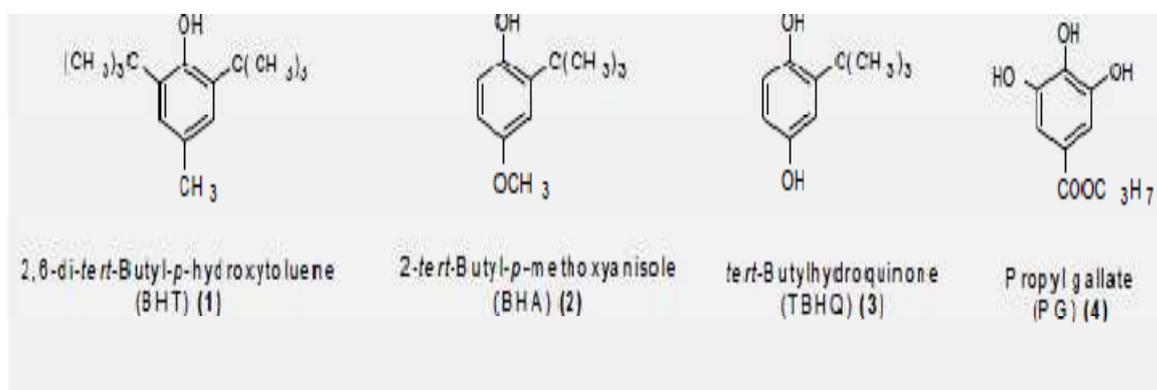


Figure 11: Structures chimiques de quatre antioxydants synthétiques

### 1.4. Mécanisme d'action des antioxydants

Suivant leurs mécanismes d'action les antioxydants peuvent être classés en trois types :

- **Les antioxydants de type I**

L'action des antioxydants de type I repose sur leur capacité à inactiver les radicaux libres. Ils inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents (Belaiche, 1979).

- **Les antioxydants de type II**

Ce type d'antioxydant prévient la formation des radicaux libres et peut intervenir par différents mécanismes. Les flavonoïdes (un énorme potentiel antioxydant naturel) rentrent dans cette catégorie d'antioxydants. Ils agissent en piégeant les radicaux libres et en complexant les métaux pro-oxydants (Roeding-Penman et Gordon, 1998).

- **Les antioxydants de type III**

Ils regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydante en agissant sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression en oxygène, la lumière.

L'efficacité des antioxydants peut être augmentée par l'utilisation d'un mélange d'antioxydants de type I et II. L'association de ces deux types d'antioxydants permet d'inhiber les phases d'initiation et de propagation de l'oxydation des lipides (**Frankel, 1998**).

### **1.5. Méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant**

Dans la littérature, plusieurs méthodes et techniques ont été testées pour suivre l'état d'oxydation des lipides et ainsi évaluer l'activité antioxydante (**Shervin 1968; Ragnarsson et al., 1977; Namiki, 1990; Frankel, 1996**).

Les méthodes les plus couramment utilisées sont celles de la réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•), de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, de la chélation des métaux et de blanchissement du  $\beta$ -carotène dans l'acide linoléique.

La mesure de l'inhibition de la peroxydation d'acide linoléique est une méthode efficace pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles. Cette activité est déterminée par le pourcentage d'inhibition de la peroxydation d'acide linoléique (**Hussain et al. 2008**).

La méthode de chélation des métaux est employée pour déterminer la puissance de réduction des huiles essentielles. Ces derniers ramènent le complexe de  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricyanide [ $\text{FeCl}_3 / \text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$ ] à la forme ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ferreuse (**Oyaizu, 1986**). Par conséquent, selon la puissance de réduction des substances testées, la couleur jaune de la solution d'essai change en vert ou en bleu (**Nikhat et al., 2009**).

L'efficacité d'un antioxydant présent dans l'aliment peut être testée par la mesure de son pouvoir à piéger les radicaux libres. On rencontre dans la littérature, au moins une variante du test de piégeage pour chaque espèce réactive de l'oxygène (ERO) ainsi que les autres radicaux stables utilisés tels que le **DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, l'**ABTS** : 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) et le **DMPD** : N, N, -diméthyl-p phénylenediamine.

Afin de choisir la bonne méthode, il faut savoir ce que l'on va mesurer et évaluer. Le blanchiment du  $\beta$ -carotène dans l'acide linoléique et de la réduction de DPPH• sont des méthodes efficaces, simples, reproductibles et rapides pour évaluer les propriétés antioxydantes des huiles

essentielles (**Hussain, 2009**). Le (DPPH•) est un radical organique stable, coloré et centré sur l'azote. Le maximum de son absorption se situe vers 515 nm dans le méthanol et l'éthanol.

Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH•, ce qui conduit au 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH-H) et au radical R•.

## 2 Activité antimicrobienne

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et d'épices sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments. Ainsi, les huiles essentielles, actuellement employés comme arômes alimentaires sont également connus pour posséder des activités antimicrobiennes et pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés "généralement reconnus comme sains" (Generally Recognized As Safe GRAS), ou approuvés comme additifs alimentaires par la Food and Drug Administration. Ils n'ont, par conséquent, pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments ; cependant, des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne. Cette activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Sipailiene et al., 2006**).

### 2.1. Les propriétés antimicrobiennes des HE

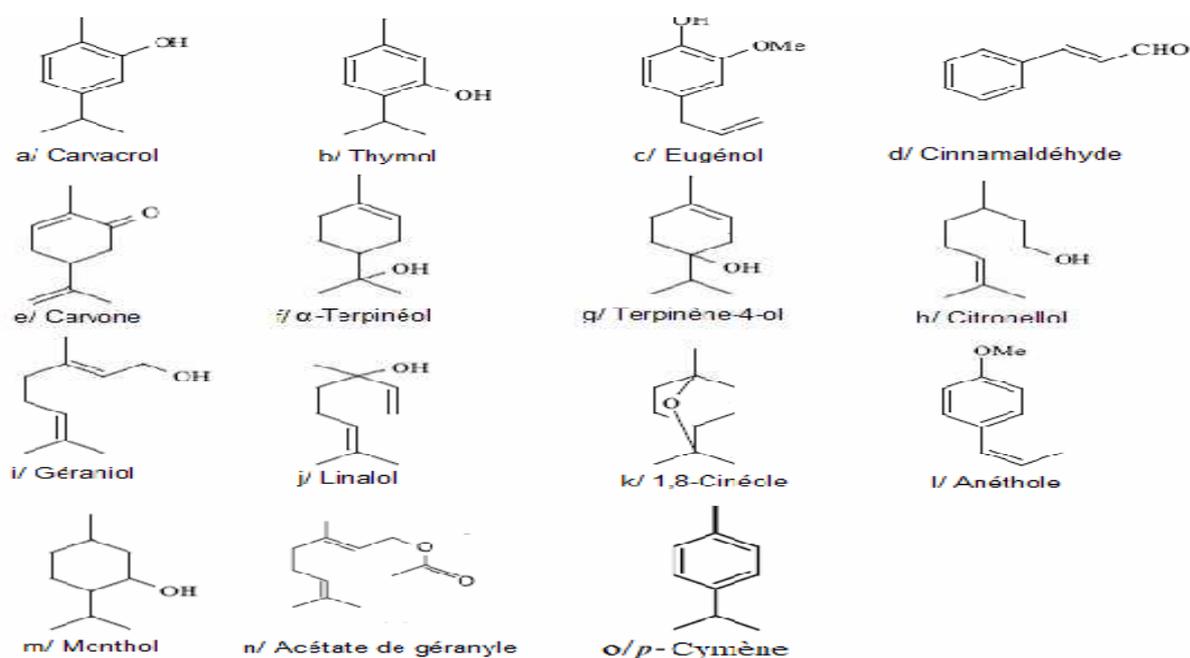
Les HE et les extraits de plantes sont souvent des mélanges complexes de différents composés dont certains, sinon tous, sont dotés de propriétés antimicrobiennes. Certaines études, comme celles de **Paster et al. (1990)** et **Canillac et Mourey (1996)**, confirment les propriétés antimicrobienne de certaines HE.

Le pouvoir antimicrobien des substances naturelles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Evalués séparément sous la forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'huile essentielle de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique (**Koroch et al., 2007**). De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son «totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (**Lahlou, 2004**).

Les molécules réputées actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (**Griffin et al., 1999**). L'effet des terpénoïdes sur des membranes bactériennes isolées suggère que leur activité est fonction des propriétés lipophiles des constituants terpéniques, la nature des groupes fonctionnels, leur solubilité en phase aqueuse et la stéréochimie de la molécule (**Dorman et Deans, 2000**).

Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont des phénols (thymol, carvacrol et eugénol) des alcools, ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des aldéhydes, des cétones et plus rarement des terpènes hydrocarbonés (**Dorman et Deans, 2000 ; Cosentino, 1999 ; Valero et Salmeron, 2003**) (Fig.12).

- **Les alcools** sont plus généralement connus pour leur activité létale que bactériostatique sur les cellules végétatives. Ils agissent en dénaturant les protéines, comme solvants ou comme agents de déshydratation (**Dorman et Deans, 2000**).
- **Les aldéhydes** sont de puissants antimicrobiens. Un groupe aldéhydique conjugué à une double liaison est fortement électronégatif. Les composés électronégatifs peuvent induire des réactions de transfert d'électrons et réagir avec des composés nitrés vitaux pour la bactérie : protéines et acides nucléiques (**Dorman et Deans, 2000 ; Franchome et al., 1990**).
- **Les phénols** sont responsables de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Le thymol et l'eugénol sont responsables de l'activité fongicide (**Bennis et al., 2004**), et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent (**Lambert et Skandamis, 2001 ; Walsh et Maillard, 2003 ; Cox et Mann, 2000**). Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces (**Cosentino, 1999**). Cependant, les phénols ne sont pas seuls responsables de l'intégralité de l'activité ; la totalité de la composition chimique doit être prise en compte (**Cosentino, 1999**). Certaines études ont montré que l'activité (antimicrobienne, antivirale, insecticide et larvicide) des huiles essentielles est supérieure à celle des composés majoritaires testés séparément (**Lahlou, 2004**).



**Figure 12: Principaux composés des HE impliqués dans les activités antimicrobiennes (Burt, 2004)**

## 2.2. Mécanismes d'action des HE

Bien que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et de leurs composants ont été largement étudiées dans le passé, le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Burt, 2004). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles.

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HE sur les bactéries comme : l'altération de la paroi cellulaire (Helander et al., 1998), la dégradation de la membrane cytoplasmique (Oosterhaven et al., 1995 ; Knobloch et al., 1989, Ultee et al., 2002), l'altération des protéines membranaires (Juven et al., 1994 ; Ultee et al., 1999), la fuite du contenu cellulaire (Oosterhaven et al., 1995 ; Helander et al., 1998 ; Cox et al., 2000 ; Lambert et al., 2001), la coagulation du cytoplasme (Gustafson et al., 1998) et l'épuisement de la force de mouvement des protons (Ultee et al., 1999, Ultee et Smid, 2001).

La principale caractéristique des huiles essentielles ainsi que celle de leurs constituants réside dans leur caractère hydrophobe. Ce dernier favorise leur insertion dans les couches

lipidiques de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant ainsi les structures et les rendant plus perméables (Sikkema *et al.*, 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Ultee *et al.*, 2002). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

Les mécanismes d'actions de certaines molécules antibactériennes ont été décrits dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert *et al.*, 2001). En détruisant la membrane externe des bactéries Gram négatives, ils augmenteraient la perméabilité de la membrane plasmique aux métabolites cellulaires (Helander *et al.*, 1998).

Chez les bactéries exposées au carvacrol, une diminution de l'ATP intracellulaire induite par une fuite des protons et du potentiel membranaire sont observés (Ultee *et al.*, 2002). En plus de limiter la croissance, le carvacrol est aussi capable d'inhiber la production de toxines chez *B. cereus* (Ultee et Smid, 2001).

L'action du thymol semble être comparée à celle du carvacrol (Ultee *et al.*, 2002). Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire. De plus, après avoir traversé la membrane, il peut interagir avec des sites intracellulaires (Rasooli *et al.*, 2006).

L'eugénol, principal composant de l'huile essentielle de clou de girofle, semble avoir une action similaire à celle du carvacrol. Il provoquerait une dégradation de la paroi cellulaire entraînant une inhibition de l'activité des ATP synthétases membranaires (Gill et Holley, 2004). Chez *B. cereus*, une inhibition de la production d'amylases et de protéases est observée avec une concentration sub-létale d'eugénol (Thoroski *et al.*, 1999).

### **2.3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des HE**

Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des HE ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation d'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs et le type des microorganismes ciblés.

### 2.3.1 Type de méthode utilisée

L'absence d'une méthode normalisée pour tester les activités biologiques des huiles essentielles pose un sérieux problème pour les chercheurs de différents domaines (microbiologie, biochimie, pharmacologie...). L'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux de cultures utilisés en microbiologie, explique la diversité des techniques employées. D'autres facteurs, tels que le volume de l'extrait ou l'huile placée sur le disque d'aromatogramme, l'épaisseur de la couche d'agar, la présence ou non d'agents émulsifiants, la nature et le type de milieux de culture, les phases de croissances, le volume d'inoculum et la durée d'incubation etc., peuvent induire des biais lors de la comparaison des résultats obtenus (**Burt, 2004 ; Lahlou, 2004**).

### 2.3.2 L'effet de la matrice biologique

Les propriétés antimicrobiennes des HE diffèrent en fonction de la matrice à laquelle elles sont ajoutées, ou résulte du contact avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines qui protègent les bactéries de l'action des HE (**Tassou et al., 1995**). Ainsi les HE diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur les bactéries de la phase aqueuse (**Mejlholm et Dalgaard, 2002**).

D'une manière générale, les concentrations des huiles essentielles et leurs composés bioactifs employés dans les aliments sont plus élevées que celles obtenues lors des tests *in vitro* sur des milieux de cultures. Le rapport enregistré est à environ deux fois dans le lait demi-écrémé, 10 fois dans les saucisses de foie de porc, 50 fois dans la soupe et de 25 à 100 fois dans le fromage à pâte molle (**Burt, 2004**). Cela est probablement dû aux éventuelles interactions entre les composés phénoliques et la matrice alimentaire (**Karatzas et al., 2001**).

### 2.3.3 Composition chimique des HE

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation direct avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (**Lahlou, 2004**) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques des isoprènes (monoterpènes, sesquiterpènes, alcools, phénols et hydrocarbures) qui la constituent et leurs proportions jouent un rôle déterminant (**Pibiri, 2006 ; Koroch et al., 2007**).

### 2.3.4 Type de microorganismes ciblés

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HE est le type des microorganismes testés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des huiles essentielles. Les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries et parmi les bactéries, les Gram – apparaissent plus résistantes que les Gram + (Cox *et al.*, 2000; De Billerbeck *et al.*, 2002 ; Souza *et al.*, 2006).

## 2.4.Principales méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE

La technique de détermination de l'activité antimicrobienne des HE a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants de ces huiles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et des problèmes de standardisation des méthodes (Hulin *et al.*, 1998).

### 2.4.1 Techniques par contact direct (*diffusion en milieu gélosé*)

L'aromatogramme est une variante particulière de la diffusion en milieu gélosé. Elle consiste à déposer des disques de papier filtre imprégnés d'HE, sur la surface d'un milieu gélosé préalablementensemencé en surface à l'aide d'une suspension microbienne. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm. Les disques devraient être disposés de sorte que les zones d'inhibition autour des disques antimicrobiens ne se chevauchent pas pour faciliter ainsi leur mesure. Généralement cela peut être obtenu si les disques sont distants d'au moins 24 mm de centre à centre, bien que cela dépende de la concentration du disque en agent antimicrobien et de la capacité de ce dernier à se diffuser dans la gélose (El Kalamouni, 2010).

Une variante de cette technique consiste en l'aménagement de cavité (puits) à l'emporte-pièce, dans la gélose coulée et solidifiée en boîte. Ensuite, cette cavité sera remplie d'un volume donné d'HE qui va diffuser dans la gélose. Après incubation, une lecture des résultats est effectuée par la mesure du diamètre d'inhibition (Bagamboula *et al.*, 2004).

### 2.4.2 Microatmosphère

Dérivé de la méthode précédente, la différence réside principalement dans la position du disque imprégné. Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Il se produit alors une évaporation des substances volatiles dans la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum (**Hulin et al., 1998**).

L'inconvénient de cette méthode c'est qu'elle ne montre que l'activité des constituants volatils à température d'incubation, et non de l'HE elle-même.

### 2.4.3 Bioautographie sur CCM

Le principe de cette technique consiste à séparer des huiles essentielles en fractions et à évaluer leur bio activité d'une manière simultanée sur une plaque de CCM recouverte de géloseensemencée avec une suspension bactérienne ou fongique. Après incubation, des zones d'inhibitions apparaissent dans des endroits où les composés bioactifs sont en contact direct avec l'agar (**Choma et Grzelak, 2011**).

### 2.4.4 Technique de dilution en gélose ou en bouillon

L'objectif principal des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la plus faible concentration en antimicrobien testé (concentration minimale inhibitrice) qui inhibe la croissance de la souche testée (**Lang et Buchbauer, 2012**).

Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricide et une partie de l'inoculum est capable de se développer après disparition du composé inhibiteur. Ceci a amené à définir un autre paramètre : la « Concentration Minimale Bactéricide » (CMB), parfois appelée aussi « létale » (CML). Elle correspond à la concentration en agent inhibiteur nécessaire pour que l'activité bactéricide soit totale sur un inoculum donné après un temps bien déterminé. Elle est estimée en milieu liquide par l'évaluation des survivants après élimination du composé inhibiteur.

La majorité des chercheurs ont utilisés les méthodes de diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon pour étudier l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales, épices et huiles essentielles (**Burt, 2004**). Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients (**Wilkinson, 2006**).

### 3 Activité anti-inflammatoire

Deux systèmes enzymatiques clés dans l'inflammation se sont **les 5-lipoxygénases** (5-LO) qui contrôlent la formation des leucotriènes, médiateurs de l'inflammation de l'allergie et **les cyclooxygénases** existent sous deux isoformes : COX<sub>1</sub> et COX<sub>2</sub>. La COX<sub>1</sub> est exprimée de manière constitutive et la COX<sub>2</sub> est exprimée de manière inductible. La voie des cyclooxygénases contrôle la formation des prostaglandines, médiateurs de la réponse inflammatoire.

#### 3.1. La 5-lipoxygénase

La 5-lipoxygénase et la cyclooxygénase sont des enzymes qui font partie de la cascade de l'acide arachidonique. Ces enzymes contrôlent la formation des prostanoides biologiquement actifs. La 5-LO est une protéine à fer, elle peut être localisée soit dans le cytoplasme (**Peters-Golden et Brock, 2000**), soit dans le noyau (**Jones et coll., 2002**), selon le type de cellule.

Elle est toujours transloquée vers l'enveloppe nucléaire suite à son activation dans la cellule (**Peters-Golden et Brock, 2000**) (Fig.13). Sur ce site, la 5-LO rencontre deux protéines, la phospholipase A<sub>2</sub> et une protéine appelée la « 5-LO-activating protéine » (FLAP) qui facilite l'insertion de l'AA dans le site actif (**Werz et coll., 2000**), la biosynthèse des produits de la 5-LO commence sur ce plan et pour une activité complète, elle requiert des cofacteurs tels que le calcium et l'ATP.

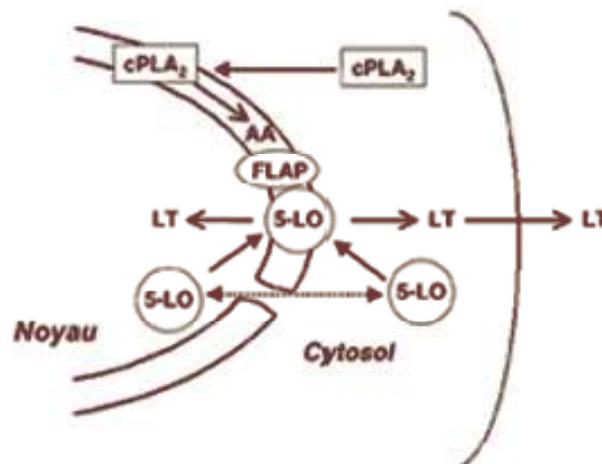


Figure 13: Localisation de la 5-LO à l'intérieur de la cellule (Peters-Golden et Brock, 2000).

### 3.2. Les inhibiteurs de la 5-LO

Des études sur les inhibiteurs de la 5-LO ont émergé trois classes d'inhibiteurs pouvant se distinguer en termes de sélectivité d'enzyme et d'interaction ou non avec l'atome de fer (en fonction de leur mécanisme d'action) :

- le mécanisme scavenger antioxydant et / ou de radicaux libres ;
- le mécanisme qui chélate le fer de l'enzyme ;
- le mécanisme par mimétisme du substrat.

#### a) Les inhibiteurs redox

Cette classe d'inhibiteurs englobe un large panel de composés qui agissent ponctuellement par réduction lors du mécanisme de la 5-LO : ils réduisent l'atome de fer actif ( $\text{Fe}^{3+}$ ) directement, ou bien l'intermédiaire radicalaire qui va ensuite désactiver l'enzyme. compte-tenu de la nature du substrat naturel, la lipophile joue un rôle prédominant et les molécules sont généralement des aromatiques mono ou polycycliques (Fig.14). Les potentiels oxydoréducteurs sont généralement bas.

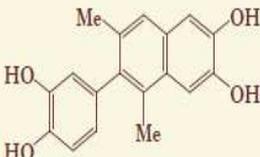
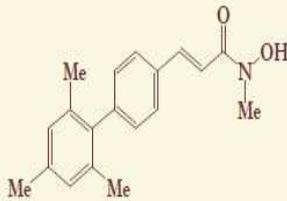
Nom	Structure	Activité
Bis-catéchol		$\text{CI}_{50} (5\text{-LO}) = 0,80 \mu\text{M}$

Figure 14: Exemple d'inhibiteur redox (Dupont et coll., 2001).

#### b) Les inhibiteurs chélateurs de fer

Les inhibiteurs chélateurs de fer sont une approche alternative pour l'inhibition de l'enzyme 5LO. En 1984, Corey et ses collaborateurs furent les premiers à évoquer que la seule présence d'un groupement acide hydroxamique, connu pour être un puissant chélateur de fer non hémique et de zinc des metalloproteinases matricielles (Li et Xu, 2004), sur des molécules simples suffit pour obtenir des inhibiteurs potentiels de la 5-LO. Des lors, cette fonctionnalité fut utilisée pour explorer le mode de liaison des ligands bidentates à la 5-LO.

L'optimisation du pouvoir inhibiteur des acides hydroxamiques a fourni des composés dont l'inhibition *in vitro* est de l'ordre du nanomolaire (Fig. 15).

Nom	Structure	Activité
Acide arylhydroxamique		$CI_{50} (5-LO) = 22 \text{ nM}$

**Figure 15: Inhibiteur chélateur de fer optimisé (Summers et coll, 1987).**

### c) Les inhibiteurs non-redox

Le raisonnement logique suivi pour la conception de ces inhibiteurs s'est basé sur la connaissance du mécanisme intrinsèque de la 5-LO qui implique une déprotonation (présence d'un acide aminé basique) et une oxydation (présence de fer).

Les premières approches ont conduit à des séries d'hydroxyalkylimidazole et de sulfonamidothiazole qui comprenaient un groupe pouvant être déprotoné et un groupe pouvant interagir avec l'atome de fer.

Ces composés, bien qu'actifs *in vitro*, ils perdent totalement leur activité *in vivo*. Alors, l'idée de fusionner les deux structures fut émise et fut positive car les composés de type méthoxyalkylthiazole (Fig.16), dont l'activité correspondait avec celle espérée sont apparus (Brooks et Summers, 1996).

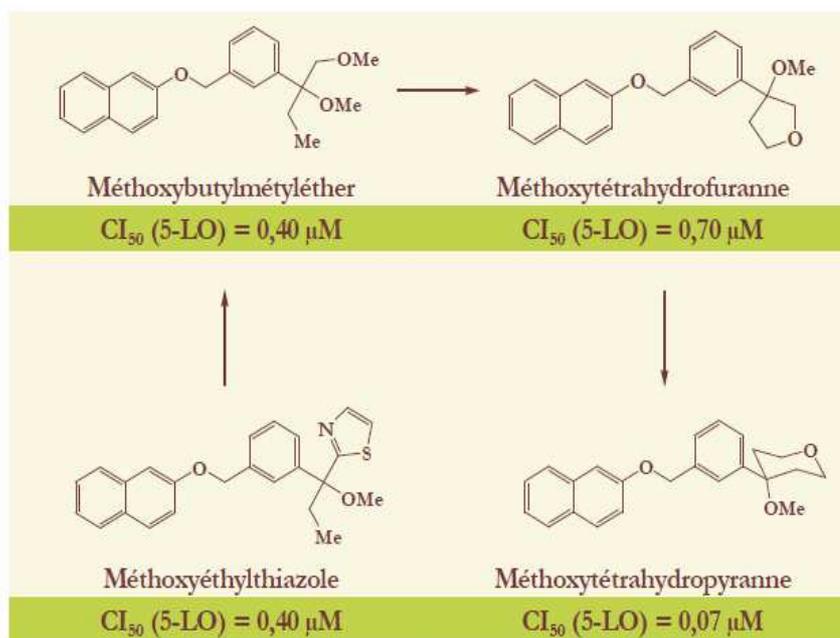


Figure 16: Méthoxyéthylthiazole et son évolution (Brooks et Summers, 1996).

### 3.3. Activité anti-inflammatoire des extraits végétaux

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipooxygénase ainsi que par d'autres mécanismes.

De nombreuses études ont prouvé que les flavonoïdes déploient leurs activités pharmacologiques, notamment anti-inflammatoires, par l'inhibition d'importantes enzymes de régulation. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, des molécules pro inflammatoires très actives. Cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipooxygénase, de la cyclooxygénase et de la phospholipase A<sub>2</sub> (Manthey *et al.*, 2000). Certaines kinases (protéine kinase C et tyrosine kinases) impliquées dans la réponse inflammatoire sont aussi affectées par les flavonoïdes (Middleton *et al.*, 2000). Les flavonoïdes trouvés lors des criblages photochimiques peuvent expliquer cet effet anti-inflammatoire (Luigiaet *al.*, 2007). En effet, l'application topique de la quercétine et la myricétine exerce une forte inhibition sur la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Kim *et al.*, 1998).

**Amezouar et al., 2013** ont enregistré un pouvoir anti-inflammatoire *in vivo* de l'extrait de *Erica arborea* comparable à celui du diclofénac.

**Albano et al., 2012** ont signalé une inhibition de la 5-lipoxygénase par les HE de huit espèces de la famille de lamiacées dont *Origanum vulgare*. **Bourkhiss et al., 2010** ont aussi utilisé cette méthode enzymatique pour étudier l'effet anti-inflammatoire *in vitro* de l'HE de *Tetraclinis articulata*.

## Matériel et méthodes

### 1 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de trois espèces de la famille des lamiacées à savoir : *Teucrium polium* subsp. *capitatum* ; *Origanum floribundum* et *Calamintha nepeta* et une espèce de la famille des Apiaceae : *Visnaga daucoïdes*

Tableau 5: Les Espèces étudiées avec leurs provenances.

Espèces	Famille	Nombre d'échantillons	Provenance
<i>Teucrium polium</i> subsp. <i>capitatum</i>	Lamiacées	Trois	Boussaâda
			Kadiria
			Tablat
<i>Origanum floribundum</i>		Trois	Lakhdaria
			Maala (Bouira)
			Kadiria (échantillons irradiés)
<i>Calamintha nepeta</i>	Deux	El Affroun	
		Hammam Melouane	
<i>Visnaga daucoïdes</i>	Apiacées	Un	Boufarik

L'authentification de la plante et de l'espèce ont été réalisées au département de botanique de l'ENSA par comparaison avec les spécimens de l'herbier et la confirmation des professeurs du département.

### 2 Extraction de l'HE

L'extraction de l'HE a été effectuée au niveau du laboratoire de chimie de l'ENSA par une hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger modifié. L'ensemble du montage est fixé à des supports sauf le chauffe-ballon et le ballon qui sont munis d'un support élévateur pour faciliter à la fois, leurs chargements et déchargements.

## 2.1. Protocole d'extraction

Après avoir pesé 100 g de matière végétale, constituée des parties aériennes (feuilles et sommités fleuries) des espèces étudiées, nous les avons introduit dans un ballon de 2 litres rempli d'eau aux 2/3 de son volume. Le ballon chauffé à l'aide d'un chauffe ballon produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact du réfrigérant. Le condensât est recueilli dans un erlenmeyer à col rodé (à défaut de trouver une ampoule à décanter adaptable à notre dispositif) puis dans une ampoule à décanter où l'on sépare la phase aqueuse de la phase organique (phase supérieure) qui constitue l'HE qui sera séchée avec du sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) afin d'éliminer toutes traces d'eau. L'HE séchée et séparée du sulfate de sodium par filtration sur de la laine de verre et conservée à une température de 4°C dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement en vue de son analyse.

## 2.2. Rendement d'extraction

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport en pourcentage entre le volume de l'huile essentielle récupérée (ml) et la masse de la matière végétale sèche (g). Le rendement en HE est donné par la relation suivante :

$$\text{Rdt}\% = (\text{V}_{\text{HE}} / \text{Mvs}) * 100$$

**Avec :**

**Rdt %:** Rendement en HE.

**V<sub>HE</sub> :** Volume de l'HE (ml).

**M<sub>vs</sub> :** Masse de la matière végétale sèche (g).

### **3 Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CG-SM**

#### **3.1. Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (GC)**

Cette analyse a été effectuée à l'aide d'un appareil de type CP. Chrompack 9002 en utilisant deux types de colonnes capillaires selon les conditions opératoires suivantes : Colonne capillaire : Stabilwax de phase stationnaire polyéthylenglycol (PEG) d'une longueur de 30 m et diamètre interne : 0,32 mm (Pour les HE de germandrée) et une Colonne capillaire : HP 5MS de phase stationnaire (5% Phenyl methyl siloxane) de longueur : 30 m ; et de diamètre interne : 0.25 mm ; épaisseur du film de la phase 0,25  $\mu\text{m}$  (Pour les autres échantillons). Températures de l'injecteur et du détecteur (FID), 250 et 320°C, respectivement. Programmation de la température : 60°C pendant 8 min puis augmentation de la température à raison de 2 °C/min jusqu'à 280 °C ; maintenue en isotherme pendant 15 min. Gaz vecteur : Azote. Débit du gaz vecteur : 1 ml/min. Volume injecté : 0,2  $\mu\text{l}$  dans le mode d'injection split avec un rapport de division de 1/20.

Les concentrations relatives des constituants des huiles sont obtenues à partir des aires des pics obtenus par GC-FID.

#### **3.2. Analyse qualitative des HE par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)**

Cette analyse a été effectuée sur un appareil de type HP6890 N (*HP Agilent technologies*) couplé à un spectromètre de masse 3973 A (*HP Agilent technologies*), selon les conditions opératoires suivantes : Colonne capillaire: HP5MS (5% Phenyl methyl siloxane) ; longueur : 30 mètres ; diamètre interne: 0,25 mm ; épaisseur du film de la phase: 0,25  $\mu\text{m}$  ; température d'injection : 250 °c ; gaz vecteur: hélium ; débit du gaz vecteur: 5 ml/ min ; volume injecté: 0,2  $\mu\text{l}$  dans le mode split avec un rapport de division de 1/20. La programmation de température du four est identique à celle décrite ci-dessus dans la section : analyse par CPG. Le potentiel d'ionisation est de 70 eV. Le mode de détection est Scan dans la gamme 30-550 unités de masse atomique.

### 3.3. Identification des constituants des huiles essentielles

L'identification des constituants des huiles essentielles est basée sur la comparaison des indices de rétention (**IR**) déterminés par rapport à une série de *n*-alcane injectés dans les mêmes conditions que les huiles essentielles par rapport à ceux de certains composés purs disponibles dans le laboratoire (étalons : **Et**) ainsi qu'à ceux disponibles dans la littérature (**Babushock et al., 2011**). En parallèle nous avons comparé les spectres de masse des pics à ceux stockés dans les banques de données informatiques (Wiley 7N et NIST 2005) reliées à l'appareil GC-MS et par comparaison aussi des spectres à ceux de la bibliographie (**Adams, 2007**). Les indices de rétention **IR** sont calculés selon la formule suivante :

$$IR = 100z + 100n \cdot \frac{TR_c - TR_z}{TR_{z+n} - TR_z}$$

Avec:

- **TR<sub>c</sub>**: Temps de rétention du composé étudié (**mn**);
- **TR<sub>z</sub>**: Temps de rétention de l'alcane à **z** atomes de carbone qui précède le composé étudié (**mn**);
- **TR<sub>z+n</sub>** : Temps de rétention de l'alcane à **z+n** atomes de carbone qui suit le composé (**mn**);
- **n** : Différence des nombres d'atomes de carbone (n est généralement égal à 1).

## 4 Elaboration des extraits non volatils

Dans cette partie, une extraction solide-liquide par Soxhlet a été réalisée.

### 4.1. Protocole d'extraction

Après broyage du matériel végétal, 20g de poudre ont été placées dans une cartouche et soumises à une extraction avec 100 ml d'éthanol à 99%. L'extraction est répétée jusqu'à ce que le solvant récupéré devienne incolore. Après 6 heures d'extraction, le solvant riche en substances extraites, a été récupéré dans un ballon et passé au rotavapor afin d'évaporer le solvant puis liophilisé. L'extrait ainsi récupéré a été placé dans un dessiccateur, pesé et conservé à 4-6°C jusqu'à son utilisation.

## 4.2. Rendement d'extraction

Le rendement en extrait élaboré est considéré comme étant, le rapport en pourcentage entre la masse (g) de ce dernier et la masse de la matière végétale sèche (g). Le taux d'extraction est calculé comme suit :

$$\text{Le taux de matière extraite (\%)} = [(P_1 - P_0) / E] \times 100$$

$P_0$  : poids du ballon vide (g).

$P_1$  : poids du ballon après évaporation du solvant (g).

$E$  : poids de l'échantillon (poudre) (g).

## 5 Analyses phytochimiques des extraits non volatils

### 5.1. Dosage des phénols totaux

Les phénols totaux des extraits ont été déterminés par la méthode de Folin-ciocalteu décrite par **Singleton et al., 1999** utilisant l'acide gallique comme standard.

#### 5.1.1 Principe

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux. Le phénol standard utilisé dans cette méthode est l'acide gallique dont la formule chimique est la suivante :

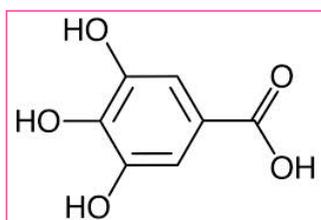


Figure 17: Structure de l'Acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque).

### 5.1.2 Mode opératoire

Un volume de 0,25ml d'extrait dissout dans de l'éthanol est mélangé à 1,25 ml de réactif de Folin-ciocalteu. Après 3 minutes de temps de réaction du mélange, 1ml de la solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à une concentration de 75g/l est ajouté. Après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance est lue à 765 nm. L'expérience est répétée trois fois pour chaque concentration d'extrait.

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et sera exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique par mg d'extrait.

## 5.2 Dosage des flavonoïdes :

La méthode au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) modifiée (**Lamaison et Carnet, 1990; Huang et al., 2004**) a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes des extraits étudiés.

### 5.2.1 Principe

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe avec les flavonoïdes dont on dose l'absorbance à 420 nm. Le flavonoïde standard utilisé dans cette méthode est la quercétine dont la formule chimique est la suivante :

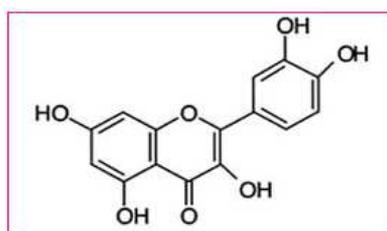


Figure 18: Structure de la Quercétine

### 5.2.2 Mode opératoire

1ml d'extrait dissout dans de l'éthanol est ajouté à 1 ml de la solution éthanolique de chlorure d'aluminium. Après 1h d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 420 nm. Cette expérience est répétée trois fois.

La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine et sera exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalent de quercétine par  $\text{mg}$  d'extrait.

## 6 Evaluation de l'activité antioxydante des HE et des extraits

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par quatre méthodes de référence citées dans la littérature : l'activité d'inhibition du radical DPPH $\cdot$  ou (2-2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) ; l'activité de réduction du radical cation ABTS $^{+\cdot}$  ou (2,2'-azino-bis (3-éthylbenzthiazoline-6-sulphonique acide) ; le pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux et le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Chacun des précédents tests a été comparé par rapport aux antioxydants de synthèses.

### 6.1. Activité de piégeage du radical DPPH $\cdot$ (2-2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)

#### 6.1.1 Principe

La capacité de céder des hydrogènes par les huiles essentielles, extraits ou par certains composés purs, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution alcoolique (méthanol ou éthanol) contenant le radical libre DPPH $\cdot$  comme l'illustre la figure suivante où AH est un antioxydant (Fig.19).

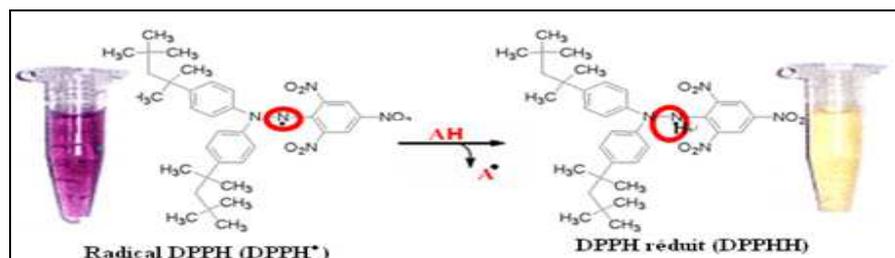


Figure 19: Inhibition du radical DPPH par un antioxydant AH.

#### 6.1.2 Mode opératoire

Le test du radical DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Burits et Bucar (2000)** et **Hazzit et al. (2009)**, où 25  $\mu\text{l}$  de chacune des dilutions des extraits testés (huiles essentielles ou extraits non volatils) et des témoins positifs utilisés (BHT, BHA) sont mélangés

avec 975µl d'une solution éthanolique de DPPH (60 µM). Après une période d'incubation de 30 mn à l'abri de la lumière et de l'oxygène atmosphérique, et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm. Les expériences sont réalisées en 3 expériences indépendantes pour chaque concentration et pour chaque échantillon.

L'activité antioxydante (A%) est calculée selon cette formule :

$$I (\%) = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{éch.}}) / A_{\text{blanc}}] \times 100$$

Avec :

- $A_{\text{blanc}}$  : Représente l'absorbance du DPPH' au temps zéro avant l'addition de l'échantillon (huile essentielle ou extrait non volatil ou témoin) à une concentration donnée ;
- $A_{\text{éch}}$  : Absorbance de l'échantillon testé (échantillon + DPPH) après 30min.

### 6.1.3 Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC<sub>50</sub>)

Elle est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants (HE, extraits ou toute autre substance antioxydante) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. Elle est obtenue à partir de l'équation de la courbe de l'activité antioxydante (%) en fonction de la concentration de l'antioxydant.

## 6.2 Mesure du pouvoir réducteur

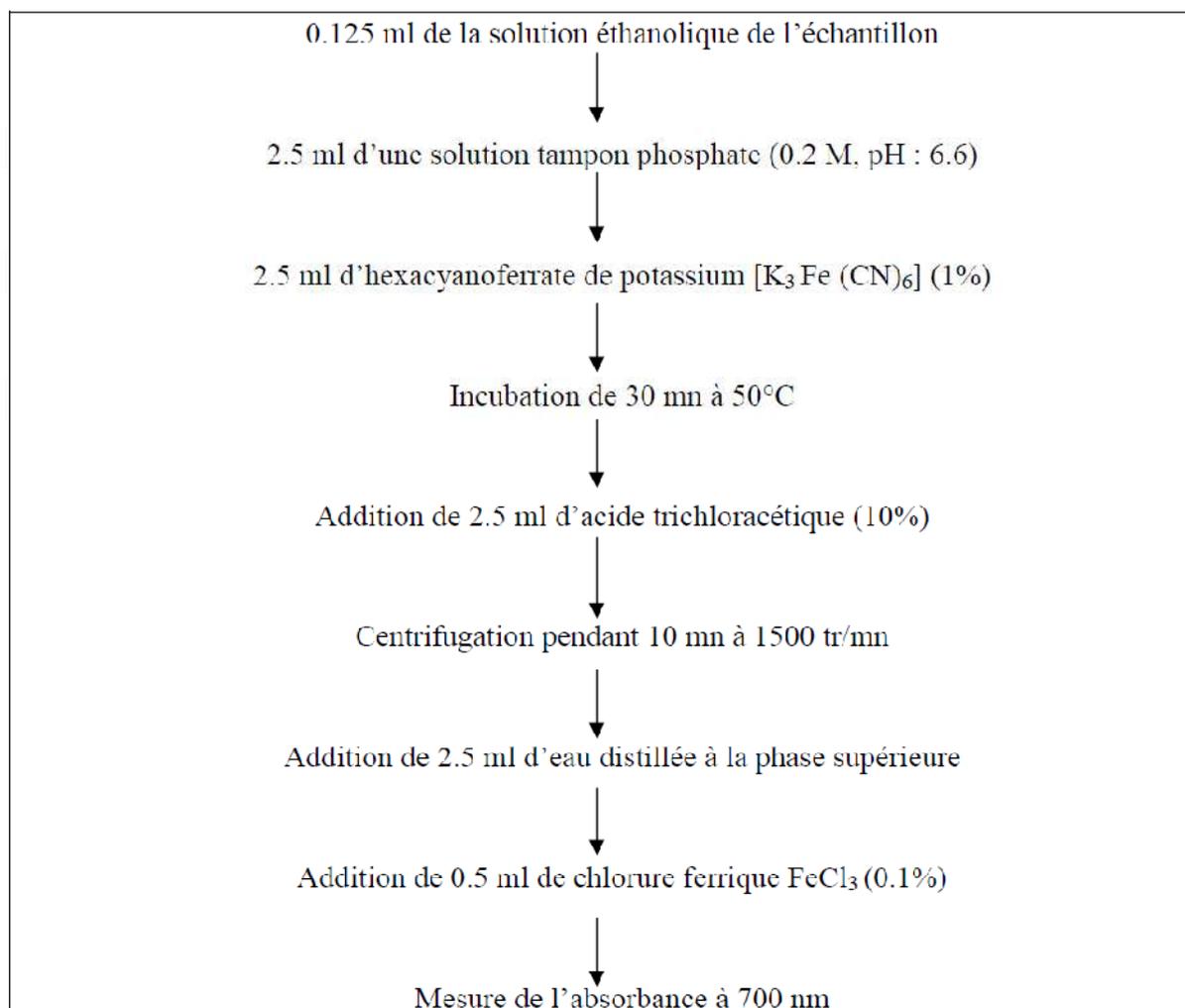
### 6.2.1 Principe

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles et d'extraits représente l'aptitude de ces composés à réduire le fer ferrique en fer ferreux. Cette aptitude est évaluée par la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**.

### 6.2.2 Mode opératoire

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés (HE, extraits, BHT, acide ascorbique et Trolox) est obtenue selon le protocole expérimental illustré dans la figure 20.

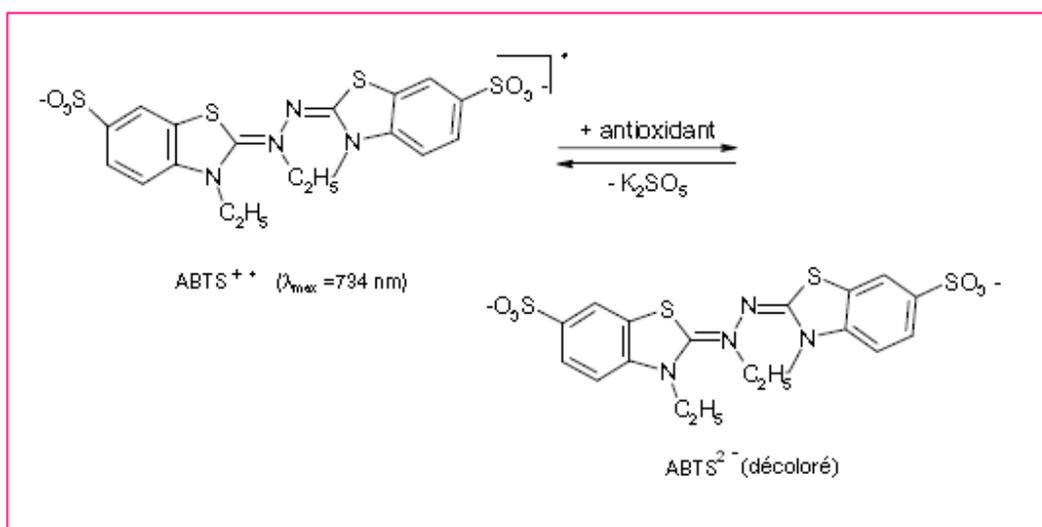
L'augmentation de l'absorbance indiquera une augmentation du pouvoir réducteur. Le test a été répété 3 fois pour chaque concentration de chaque échantillon étudié.



**Figure 20: Schéma du protocole expérimental de l'évaluation du pouvoir réducteur.**

### 6.3 Inhibition du radical positif ABTS<sup>•+</sup> ou 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

La méthode est basée sur l'évaluation du degré de la réduction du radical cation d'ABTS (vert) obtenu par oxydation avec du persulfate de potassium pendant 12-16 h à 4° C à l'abri de la lumière comme l'illustre la figure 21.



**Figure 21: Réaction du radical ABTS<sup>•+</sup> en présence d'un antioxydant**

L'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> est effectuée selon la méthode décrite par **Sacan et Yanardag (2010)**. La solution préparée est 7.4 mM ABTS et 2.6 mM persulfate de potassium. Cette solution est préparée en mélangeant les deux réactifs en quantités égales et en les laissant réagir pendant 12 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. La solution sera ensuite diluée en mélangeant 1 ml ABTS avec 60 ml de méthanol de manière à obtenir une absorbance au spectrophotomètre de  $1,1 \pm 0,02$  unités à 734 nm. Une solution ABTS fraîche doit être préparée au moment de l'expérience. Un mélange de 1 ml ABTS et 25 µl de la dilution de l'échantillon à tester est laissé incubé pendant 7 min à température ambiante avant de mesurer son absorbance à 734 nm. L'expérience est répétée 3 fois et le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) qui est l'équivalent synthétique de la vitamine E a été utilisé comme témoin positif.

L'activité d'inhibition du radical ABTS est calculée selon la formule suivante :

$$A(\%) = (1 - A_1/A_0) \times 100$$

Avec:

- $A_0$ : Absorbance de l'ABTS (seul)
- $A_1$  Absorbance de l'ABTS + échantillon à tester.

La concentration inhibitrice de 50% des radicaux ABTS ( $IC_{50}$ ) est calculée de la même manière que celle effectuée pour le radical DPPH.

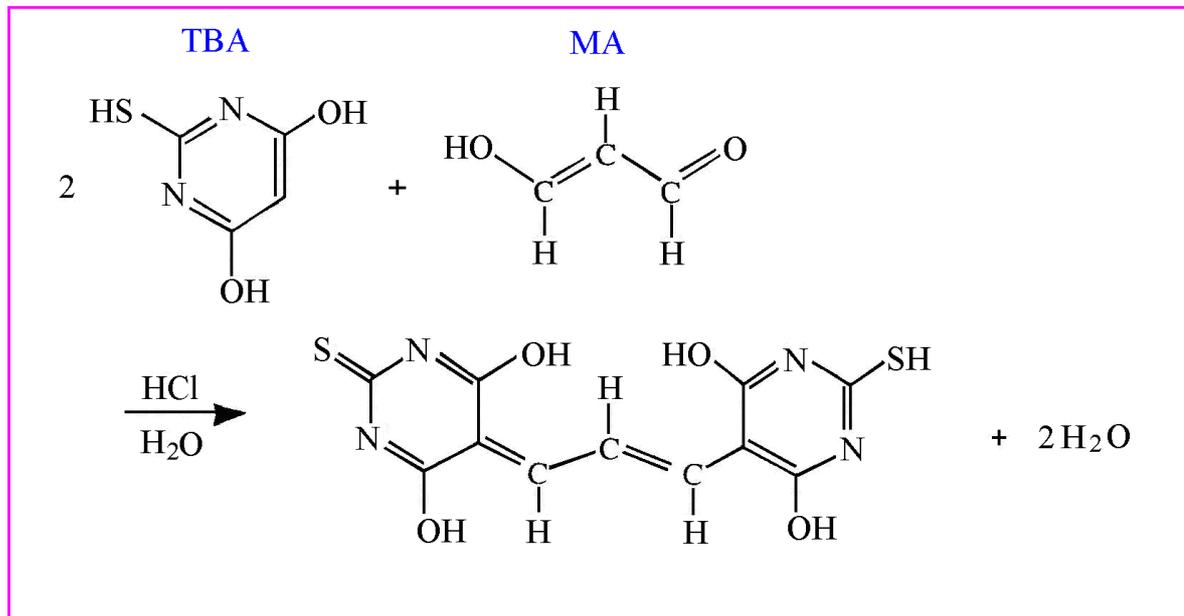
## 6.4 Inhibition de la peroxydation lipidique par le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

### 6.4.1 Principe

Dans ce test une molécule de malonaldéhyde (**MA**) réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (**TBA**) pour former un complexe de couleur rose à rouge absorbant à 532 nm (figure 22). Il est à noter que l'expression souvent employée dans la littérature de « *malondialdéhyde* » (**MDA**) est incorrecte, puisqu'il s'agit d'un monoénol/monoaldéhyde (**Berset et Cuvellier, 1996**).

Le **MA** se formerait uniquement à partir des acides gras comportant au moins trois doubles liaisons. De ce fait, le test au TBA ne prend pas en compte les dérivés du linoléate ou de l'oléate (**Perrin, 1992**). Mais, MA n'est pas le seul produit d'oxydation à réagir avec le TBA : les 4-hydroxyalkénals, les 2-4-alkadiénals, les 2-alkénals forment également un chromogène (**Hoyland et Taylor, 1991**). C'est la raison pour laquelle on préfère parler de « **substances réactives au TBA** » (**SRTBA**) ou **TBARS** (Thiobarbituric Acid Reactive Substances).

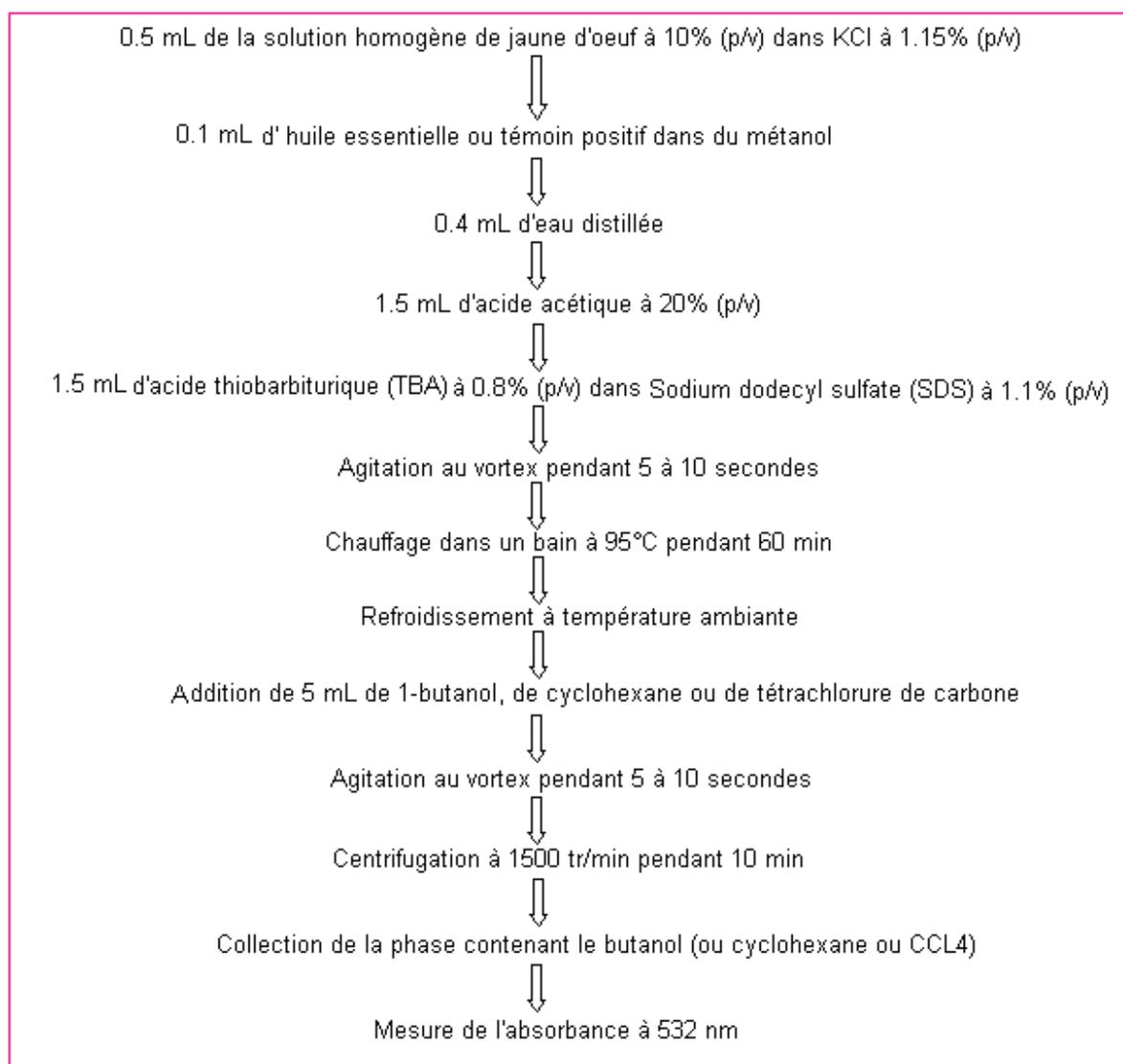
La réaction a lieu en milieu acide et à haute température (95-100°C) pour accélérer la vitesse et augmenter la sensibilité (**Hazzit, 2008**).



**Figure 22: Réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec le malonaldéhyde (MA) pour former un chromogène rose.**

#### 6.4.2 Mode opératoire

Ce test est réalisé selon la méthode décrite par **Benchabane et al. (2012)** (fig.23) où le jaune d'œuf est utilisé comme substrat riche en lipides. Le test a été répété 3 fois pour chaque concentration.



**Figure 23: Schéma du protocole expérimental du test(TBARS).**

La capacité d'inhibition de la peroxydation lipidique (A%) est calculée selon la même formule citée précédemment pour l'inhibition du radical DPPH et ABTS•+ avec :

$A_0$  = absorbance du témoin négatif et  $A_1$  = Absorbance de l'échantillon à une concentration donnée.

Le mélange réactionnel relatif au témoin négatif est constitué de tous les réactifs à l'exception de l'échantillon tandis que celui du témoin positif contient la substance choisie comme référence de comparaison (BHT) à la place de l'huile essentielle.

## 7. Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE

Cette partie consiste à mettre en évidence le pouvoir antimicrobien de nos échantillons d'huiles essentielles et d'extraits par deux méthodes : qualitative et quantitative.

### 7.1 Etude qualitative de l'effet antimicrobien

La technique que nous avons utilisée pour cette étude est l'aromatogramme ou la méthode de diffusion en milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose. C'est la méthode utilisée par certains auteurs (**Deans et Ritchie, 1987 ; Smith-Palmer et al., 1998; Lis-Balchin et Hart, 2000 ; Burt et Reinders, 2003 ; Kaboucheet al., 2005**).

Le principe de la méthode a été tiré à partir du titrage des ATB « Pharmacopée Européenne, 2002 ».

#### 7.1.1 Aromatogramme

- **Principe**

La méthode des aromatogrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose de 6 mm de diamètre imprégné de l'HE ou de solution méthanolique d'extrait à 1/5(m/m), sur la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme testé. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire indemne de colonies autour du disque absorbant, appelée : zone d'inhibition.

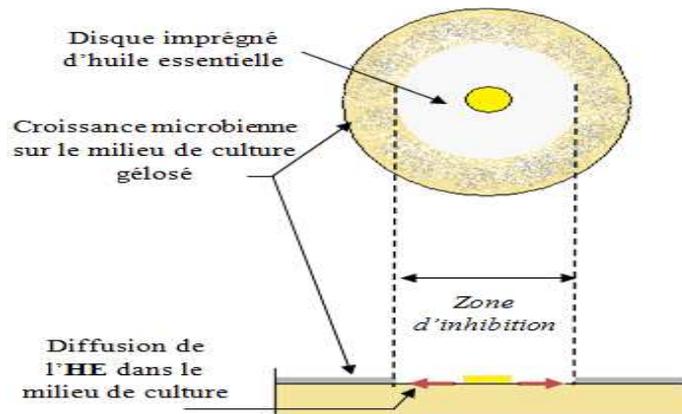


Figure 24: Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de pétri

### 7.1.2 Souches microbiennes testées

Toutes les souches microbiennes sont pures et issues de la collection du CRD-SAIDAL.

Tableau 6: Liste et caractéristiques des souches microbiennes testées

Souches	N° ATCC	Gram	Famille	Principales infections causés
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae	-Gastro-entérites ; -Infections urinaires ; -L'ostéomyélite et l'arthrite.
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	Enterococcaceae	-Douleurs abdominales. -Diarrhées aiguës.
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacillaceae	-Gastro-entérites.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	-Crampes abdominales ; -Troubles digestifs.
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae	-Diarrhées dysentériques; -Gastro-entérites.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	Enterobacteriaceae	-Vasodilatation ; -Troubles neurologiques et gastro-intestinaux ; -Risque d'abcès pulmonaire.

<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	Alcaligenaceae	-Infections des voies respiratoires supérieures ; -Bronchites, pneumonies.
<i>Candida albicans</i>	24433		Cryptococcaceae	-Lésions cutanées ; -Infections oesophagiennes ; -Infections génitales.
<i>Saccharomyces cereviceae</i>	2601		Saccharomycetaceae	Souche non pathogène.

### 7.1.3 Protocole expérimental

#### a) Préparation de l'inoculum

- **Pour les bactéries**

A partir d'une culture jeune de 18h, on réalise des suspensions en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques, et les mettre dans 5 ml d'eau physiologique stérile, puis on agite au vortex pendant quelques secondes.

Pour la lecture de la transmittance, on utilise un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. La transmittance doit être entre 22% et 32%, ce qui correspond à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml.

- **Pour les levures**

La préparation de l'inoculum pour les levures est la même que celle pour les bactéries sauf que, pour les levures, la culture doit être jeune de 48h et que la transmittance doit être entre 2% et 3%, ce qui correspond toujours à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml.

#### b) Examen de l'échantillon

- **Préparation des milieux de culture**

La préparation des milieux de culture utilisés a été réalisée selon **Guiraud, 2003**.

✓ **Milieu Mueller-Hinton pour les bactéries**

Le milieu de Mueller-Hinton est un milieu solide utilisé notamment pour la recherche de la sensibilité des bactéries aux HE. Pour préparer 1L de ce milieu il faut : l'extrait de viande (2g), hydrolysate acide de caséine (17,5g), amidon (1,5g) et de la gélose (10g).

On mélange les différents ingrédients puis on autoclave pendant 15 min à 115°C. Par la suite, on répartit le milieu qui doit être de pH 7,4 dans des flacons de 250 ml.

✓ **Milieu Sabouraud gélosé pour les levures**

C'est un milieu Sabouraud-glucose constitué lui-même d'un bouillon gélosé à 2%. Avant d'ajouter la gélose, on doit préparer le Sabouraud-glucose qui a comme ingrédients : peptone de viande (5g), peptone de caséine (5g) et du glucose (20g).

Le milieu Sabouraud-glucose qui doit être de pH 6.3, est réparti en tubes à essais de 9 à 10 ml, ces derniers sont par la suite autoclavés pendant 20 min à 120°C.

• **Préparation de la première couche du milieu**

On fait fondre le milieu gélosé Muller-Hinton et le Sabouraud dans un bain marie à 95°C, puis on verse aseptiquement une première couche dans les boîtes de Pétri à raison de 15ml par boîte avec 3 répétitions par souche. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse.

• **Préparation de la deuxième couche du milieu**

On fait fondre le milieu gélosé Muller-Hinton et le Sabouraud dans un bain marie à 95°C puis on baisse la température jusqu'à 45°C et on les remplit dans des flacons de 50 ml. On ensemence les milieux avec 200 µl de chaque suspension et on agite manuellement ; puis on transvase rapidement 4 ml de chaque milieu inoculé sur la surface de la première couche (couche support) de gélose solidifiée. On étale immédiatement la couche en faisant pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et on laisse solidifier sur la paillasse.

• **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, on prélève un disque de cellulose stérile, on l'imbibe avec l'HE ou de solution d'extrait à tester en mettant seulement en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque.

On dépose le disque sur la surface de la gélose, puis on laisse diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. On incube à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

## **7.2. Etude quantitative de l'effet antimicrobien**

Cette étude nous permettra de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), et les concentrations minimales bactéricides (CMB) et/ ou fongicides (CMF) des souches les plus sensibles aux échantillons les plus actifs.

### **7.2.1 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

- **Principe**

Cette méthode a comme principe d'effectuer des dilutions de l'huile essentielle et d'extraits testés dans le milieu gélosé solide Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures, puis inoculer ce milieu avec les souches testées ; grâce à ces dilutions on pourra définir la plus faible concentration qui inhibera la croissance microbienne.

- **Protocole expérimental**

- **Préparation de l'inoculum**

A partir de jeunes cultures (18h à 24h pour les bactéries et 48h pour les levures), on réalise des suspensions de  $10^8$  germes/ml, à partir de cette suspension on prépare une série de dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$  germes/ml.

- **Préparation de la gamme de dilutions des huiles essentielles**

On procède suivant ces étapes :

- Liquéfaction de 200 ml du milieu à 95°C dans un bain marie ; en lui additionnant 1 ml de Tween 80.

- Préparation d'une dilution de 2% d'HE à tester en diluant 1 ml de notre HE dans 49 ml du milieu (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures).

- Bien homogénéiser le 1<sup>er</sup> flacon puis verser 25 ml de son contenu dans un autre flacon puis ajuster à 50 ml de milieu pour avoir la dilution de 1%, continuer ainsi jusqu'à l'obtention de la dilution 0.03%.

➤ A partir de chaque dilution préparée, on verse 20 ml dans chaque boîte de pétri et on les laisse solidifier.

➤ Ensemencer une partie de boîtes par spotage à l'aide d'une microseringue de 3µl des suspensions microbiennes de la dilution  $10^{-4}$  germes/ml, et déposer les disques imbibés avec 3µl de suspension microbienne dans l'autre partie.

➤ Laisser diffuser sur la paillasse pendant 30 minutes. On incube à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

Nous parlerons de CMI là où aucune croissance visible n'est constatée au niveau des spots tout en sachant que la présence d'une ou deux colonies n'est pas prise en considération.

### 7.2.2 Détermination de CMB /CMF

Après repérage des disques où aucune croissance n'est présente lors de la détermination des CMI, l'expérience se poursuit en vue de la détermination des CMB et CMF. Le protocole expérimental consiste à liquéfier les milieux MH pour les bactéries et SAB pour la levure dans un bain marie, couler les boîtes de pétri et laisser solidifier. Nous prélevons aseptiquement avec une pince stérile les disques correspondant aux concentrations en HE, où aucune croissance n'est observée pour chacune souche lors de la détermination des CMI, les disques sont remplacés dans des boîtes de pétri déjà préparées, nous incubons à  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 h pour les bactéries et  $25\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 48 h pour la levure.

Nous effectuons des lectures à l'œil nu, la CMB et CMF sera là où aucune croissance d'une souche donnée n'est constatée après incubation.

## 8 Evaluation de l'Activité anti-inflammatoire des HE

Le potentiel anti-inflammatoire des huiles essentielles d'origan et de germandrée provenant de Lakhdaria et de Boussaâda respectivement a été évalué par la mesure de l'inhibition de 5-lipoxygénase selon le protocole décrit par **Frumet Viljoen (2006)**.

Pour chaque espèce ; l'échantillon à analyser est composé de : 12.5 µL d'huile essentielle dissoute dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), au quel a été rajouté 50 µL d'acide linoléique est ajusté à 1 ml avec tampon phosphate (0.1 M) et Tween 20 (0.0005%). La réaction est initiée par l'ajout de 1.5 µl de 5-lipoxygénase de Soja (0.054 g/ml).

Nous avons suivi en continu l'apparition du produit de la réaction par spectrométrie UV à 234 nm et nous avons comparé la vitesse initiale de la réaction enzymatique sans et avec ajout de quantités croissantes d'huiles essentielles à évaluer. Le pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique est calculé en comparaison avec le control négatif :

$$\% = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100$$

où :  $A_0$  est l'absorbance du control sans huile essentielle

$A_1$  est l'absorbance de l'échantillon.

La concentration qui correspond à une inhibition de 50% de la vitesse de la réaction enzymatique ( $IC_{50}$ ) est déterminée en  $\mu\text{g/ml}$ . Le NDGA (acide nordihydroguaiarétique) est utilisé comme produit de référence. Les tests ont été répétés trois fois.

## 9 L'irradiation de l'espèce d'origan

Afin d'étudier l'effet de l'irradiation sur le rendement et la composition chimique de l'HE, les feuilles d'*origanum floribundum* provenant de Kadiria ont été divisé en 5 lots et irradiées à des doses de 0 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 20 kGy et 30 kGy par des rayonnements gamma à l'aide du cobalt-60 avec un débit de 9.48 Gy/min. Les échantillons irradiés ont subi une hydrodistillation et les huiles extraites ont été analysé par une CG et CG-SM avec les mêmes conditions opératoires cités précédemment.

## 10 Analyse statistique

Les résultats obtenus lors de l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des HE et des extraits testés ont fait l'objet d'une étude statistique par l'analyse de la variance à une variable (ANOVA 1) et l'analyse par le test de *Tuckey*, en utilisant le logiciel SPSS 22.

Tous les graphes et les histogrammes obtenus ont été réalisés en utilisant les deux logiciels : Excel (de Microsoft Office 2010) et Statistica 12.0.

## Résultats et discussion

### 1 Rendement et composition chimique des huiles essentielles

#### 1.1. *Teucrium polium* subsp. *capitatum*

Les rendements d'extraction en HE de germandrée de différentes régions exprimés en pourcentage du volume (mL) par rapport au poids de la matière végétale sèche (g), sont regroupés dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Les rendements d'extraction en huiles essentielles de germandrée**

Régions	<i>Teucrium</i> Tablat	<i>Teucrium</i> Boussaâda	<i>Teucrium</i> Kadiria
Rendements %(v/m)	0.31	0.30	0.33

Les rendements en huile essentielle de *T. polium* sont similaires pour les trois régions. Ces rendements sont plus faibles que celui rapporté par **Aburjai et al. (2006)** lors d'une étude réalisée sur la même espèce provenant de la Jordanie. Ce dernier a enregistré un rendement de 0.8%.

Les résultats de l'identification semi-quantitative des composés chimiques par CPG et CG/SM des huiles essentielles de *Teucrium polium* subsp. *capitatum* provenant des 03 régions (Boussaâda, Kadiria et Tablat) sont représentés dans le tableau 8 et les chromatogrammes sont illustrés dans les figures (25 à 28).

**Tableau 8: Composition (%) des huiles essentielles de *Teucrium polium* de trois régions (Tablat, Boussaâda et Kadiria)**

N°	Composés	Indices de rétention		<i>Teucrium polium</i>			Identification
		HP5MS	PEG	Tablat	Boussaâda	Kadiria	
1	2-Ethyl furan	705	953	-	-	t	IR-SM
2	n-Octane	800	800	-	-	t	IR-SM-Et
3	Butanoic acid	808	1624	-	-	t	IR-SM
4	(E)-2-Hexenal	853	1215	-	-	t	IR-SM

5	Tricyclene	923	1017	t	-	t	IR-SM
6	$\alpha$ -Thujene	925	1029	0.6	0.1	2.3	IR-SM-Et
7	$\alpha$ -Pinene	935	1026	<b>7.2</b>	<b>4.1</b>	<b>6.2</b>	IR-SM-Et
8	2,4(10)-thujadien	945	-	t	T	0.1	IR-SM
9	Camphene	948	1072	0.4	0.2	0.2	IR-SM-Et
10	Verbenene	963	1124		t	t	IR-SM
11	Sabinene	972	1121	t	t	0.4	IR-SM-Et
12	$\beta$ -Pinene	976	1119	<b>15.4</b>	<b>10.5</b>	<b>17.0</b>	IR-SM-Et
13	1-Octen-3-ol	986	1462	0.1	0.2	0.1	IR-SM
14	$\beta$ -Myrcene	992	1173	<b>4.5</b>	<b>1.6</b>	<b>4.7</b>	IR-SM-Et
15	$\alpha$ -Phellandrene	1005	1177	0.1	0.1	0.1	IR-SM-Et
16	$\delta$ -3-Carene	1009	1163	t	-	t	IR-SM-Et
17	$\alpha$ -Terpinene	1017	1192	0.3	0.2	0.2	IR-SM-Et
18	p-Cymene	1026	1290	0.7	0.8	0.7	IR-SM-Et
19	Limonene	1029	1212	<b>7.0</b>	<b>3.1</b>	<b>5.1</b>	IR-SM-Et
20	1,8-Cineole	1033	1223	-	0.1	-	IR-SM-Et
21	cis- $\beta$ -Ocimene	1042	1233	0.2	0.1	0.2	IR-SM
22	trans- $\beta$ -Ocimene	1048	1272	0.9	0.2	0.8	IR-SM
23	$\gamma$ -Terpinene	1061	1261	0.4	0.7	0.4	IR-SM-Et
24	cis-Sabinene hydrate	1075	1567	t	-	t	IR-SM
25	Terpinolene	1093	1300	0.2	0.2	0.3	IR-SM-Et
26	p-Cymenene	1095	1452	t	-	t	IR-SM
27	trans-Sabinene hydrate	1101	1482	t	-	-	IR-SM
28	Linalol	1104	1558	0.3	0.5	0.5	IR-SM-Et
29	Nonanal	1105	1391	0.1	-	0.1	IR-SM-Et
30	$\beta$ -Thujone	1106	1426	0.1	0.1	0.1	IR-SM
31	cis-p-2-Menthen-1-ol	1107	-	-	0.1	-	IR-SM
32	Chrysanthenone	1110	1489	-	0.1	-	IR-SM
33	Campholaldehyde	1113	1401	-	0.2	0.2	IR-SM-Et
34	4-Acetyl-1-methyl cyclohexene	1117	-	-	0.2	-	IR-SM
35	Nopinone	1119	1550	0.1	0.1	-	IR-SM
36	trans-Pinocarveol	1126	1629	0.4	0.1	0.4	IR-SM
37	Camphor	1144	1556	-	0.3	-	IR-SM-Et
38	Verbenol	1146	1683	0.1	0.3	-	IR-SM
39	Pinocarvone	1162	1586	0.4	0.5	0.3	IR-SM
40	Borneol	1167	1732	0.1	0.2	0.1	IR-SM-Et
41	Pinocamphone	1172	1530	-	0.1	-	IR-SM
42	4-Terpineol	1177	1613	0.5	0.4	0.6	IR-SM-Et
43	p-Cymen-8-ol	1187	1864	-	0.1	-	IR-SM

44	$\alpha$ -Terpineol	1194	1723	-	0.1	0.2	IR-SM-Et
45	Myrtenal	1196	1649	0.8	0.9	0.5	IR-SM
46	Myrtenol	1198	1804	0.3	0.8	0.3	IR-SM
48	Verbenone	1203	1730	-	0.1	-	IR-SM
49	trans-Carveol	1205	1805	t	0.1	-	IR-SM
50	Cuminaldehyde	1215	1748	0.2	0.1	0.2	IR-MS-Et
51	Carvone	1218	1704	0.1	0.1	-	IR-MS-Et
52	Bornyl acetate	1285	1608	0.2	0.1	0.3	IR-MS-Et
53	$\alpha$ -Fenchyl acetate	1293	1690	-	0.1	-	IR-SM
54	Thymol	1302	2212	-	0.3	0.4	IR-SM-Et
55	Carvacrol	1318	2238	1.1	<b>5.5</b>	0.4	IR-SM-Et
56	1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	1337	-	0.8	0.2	0.2	IR-SM
57	$\alpha$ -Cubebene	1348	1457	t	0.2	0.1	IR-SM
58	Eugenol	1353	2172	-	0.1	-	IR-SM-Et
59	$\alpha$ -Copaene	1372	1509	0.4	1.0	0.5	IR-SM
60	$\beta$ -Bourbonene	1380	1536	2.0	0.8	1.4	IR-SM
61	$\beta$ -Cubebene	1390	1549	-	0.2	0.1	IR-SM
62	$\beta$ -Elemene	1394	1600	0.7	0.2	0.2	IR-SM
63	$\alpha$ -Gurjunene	1403	1549	T	0.2	0.1	IR-SM
64	$\beta$ -Caryophyllene	1415	1612	2.4	0.6	0.8	IR-SM-Et
65	$\beta$ -Gurjunene	1432	1532	0.4	0.2	0.3	IR-SM
66	$\alpha$ -Bergamotene	1434	1563	-	0.2	-	IR-SM
67	$\alpha$ -Amorphene	1441	-	-	0.1	-	IR-SM
68	$\gamma$ -Elemene	1442	1639	0.7	-	0.4	IR-SM
69	Aromadendrene	1443	1620	0.3	-	0.2	IR-SM
70	$\alpha$ -Humulene	1452	1687	0.2	0.2	0.4	IR-SM
71	Allo-aromadendrene	1457	1663	-	0.4	0.9	IR-SM
72	Germacrene D	1477	1726	<b>18.5</b>	<b>15.3</b>	<b>20.4</b>	IR-SM
73	Bicyclosesquiphellandrene	1488	-	-	0.4	-	IR-SM
74	$\beta$ -Selinene	1489	1717	0.3	-	0.3	IR-SM
75	Bicyclogermacrene	1492	1766	<b>4.9</b>	<b>5.5</b>	<b>6.2</b>	IR-SM
76	Eremophylene	1493	-	0.3	-	0.2	IR-SM
77	Valencene	1494	1727	-	-	0.3	IR-SM
78	$\gamma$ -Cadinene	1511	1776	0.4	1.6	0.5	IR-SM
79	$\delta$ -Cadinene	1518	1772	1.7	2.9	2.4	IR-SM
80	Cadina-1,4-diene	1527	1799	-	0.3	0.1	IR-SM
81	$\alpha$ -Cadinene	1529	1785	-	0.1	-	IR-SM
82	$\alpha$ -Calacorene	1530	1895	0.1	0.2	0.2	IR-SM
83	Germacrene B	1558	-	1.3	0.6	0.9	IR-SM

84	Germacrene D-4-ol	1568	-	0.2	0.2	0.4	IR-SM
85	Spathulenol	1570	2154	3.5	2.3	3.0	IR-SM
86	Globulol	1574	2098	0.4	0.5	0.2	IR-SM
87	Caryophyllene oxide	1578	2014	0.5	-	t	IR-SM
88	Viridiflorol	1587	2104	0.4	1.9	0.5	IR-SM
89	Caryophyalldienol	1628	-	-	0.4	-	IR-SM
90	t-Cadinol	1639	2198	<b>2.2</b>	<b>18.3</b>	<b>2.6</b>	IR-SM
91	$\beta$ -Eudesmol	1649		-	-	0.5	IR-SM
92	$\alpha$ -Cadinol	1650	2259	1.5	1.9	2.4	IR-SM
93	Allo-aromadendrene oxide	1661	-	0.1	-	0.1	IR-SM
94	Nootkatone	1774	2250	0.1	0.1	0.1	IR-SM
95	Hexahydrofarnesyl acetone	1849	2131	0.6	0.2	0.3	IR-SM
96	Hexadecanoic acid (palmitic acid)	1982	-	0.4	0.1	0.3	IR-SM-Et
97	Phytol	2121	-	0.1	t	0.1	IR-SM
98	Pentacosane	2500	2500	0.1	t	0.1	IR-SM-Et
	Total (%)			90.6	92.0	91.1	
	Monoterpènes			37.9	22	38.7	
	Monoterpènes oxygénés			7.2	12.4	4.6	
	Sesquiterpènes			34.6	31.2	37.8	
	Sesquiterpènes oxygénés			9.6	25.5	10.2	
	Autres			1.3	0.9	t	

IR : Indices de retentions relatifs au n-alcanes C<sub>7</sub>-C<sub>25</sub> calculés sur des colonnes capillaires polaire (PEG) et non polaire (HP5MS). SM : Comparaison avec les spectres de masses fournis par la librairie du spectromètre de masse. t= trace: Concentration inférieure à 0,1%.

Les analyses chromatographiques ont permis l'identification de 98 constituants représentant respectivement 90.6, 92.0 et 91.1% de la composition chimique des HE des espèces de germandrée étudiées. Les huiles essentielles des trois régions sont caractérisées par la dominance des hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques avec des teneurs de 53.2 à 75.8%.

Le t-Cadinol (18,3%) est le principal composé de l'huile essentielle de Boussaâda suivi de près par le Germacrene D (15,3%) et le  $\beta$ -Pinene (10,5%); tandis que ces derniers sont majoritairement présents dans l'HE de Kadiria et de Tablat avec des teneurs de 20.4% et 18.5% pour le Germacrene D ; 17% et 15.4% pour le  $\beta$ -Pinene respectivement.

D'une manière générale, les huiles essentielles de germandrée des trois régions ont une composition qui diffère uniquement par la teneur de leurs constituants.

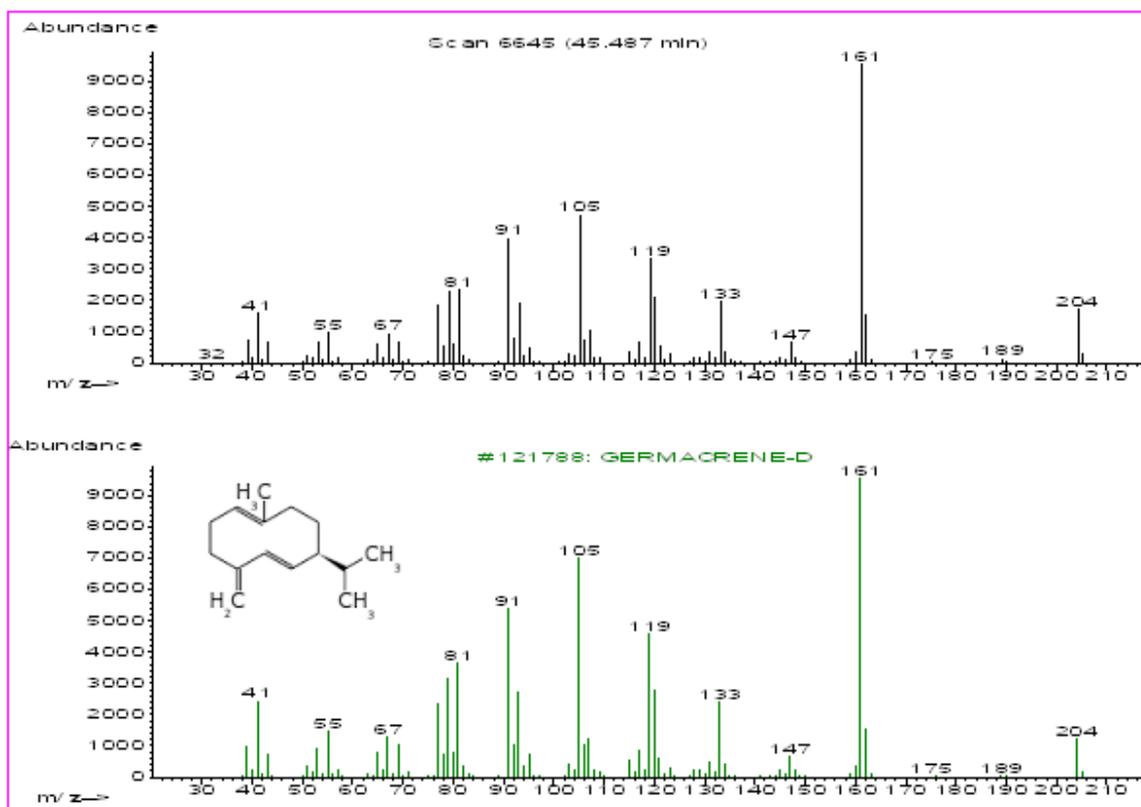


Figure 25: Spectre de masse du germacrene D. En haut le spectre de masse du composé de l'huile et en bas le spectre de masse de la banque de données (Wiley 7N).

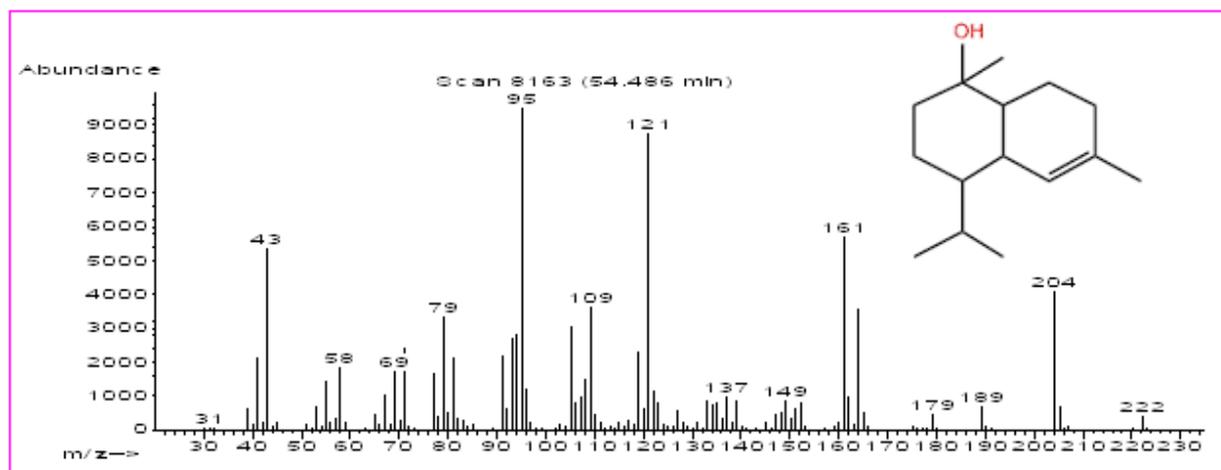
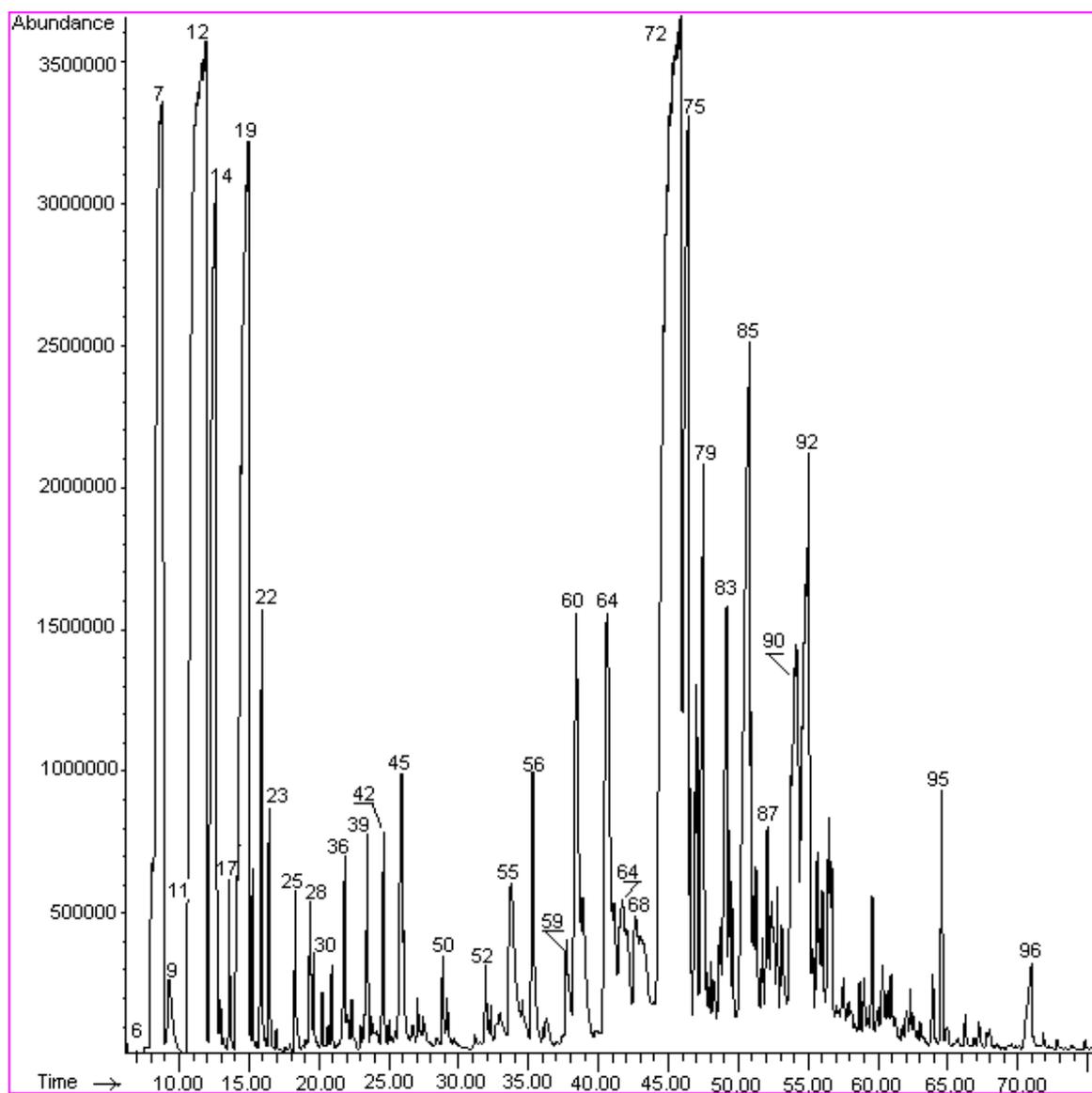
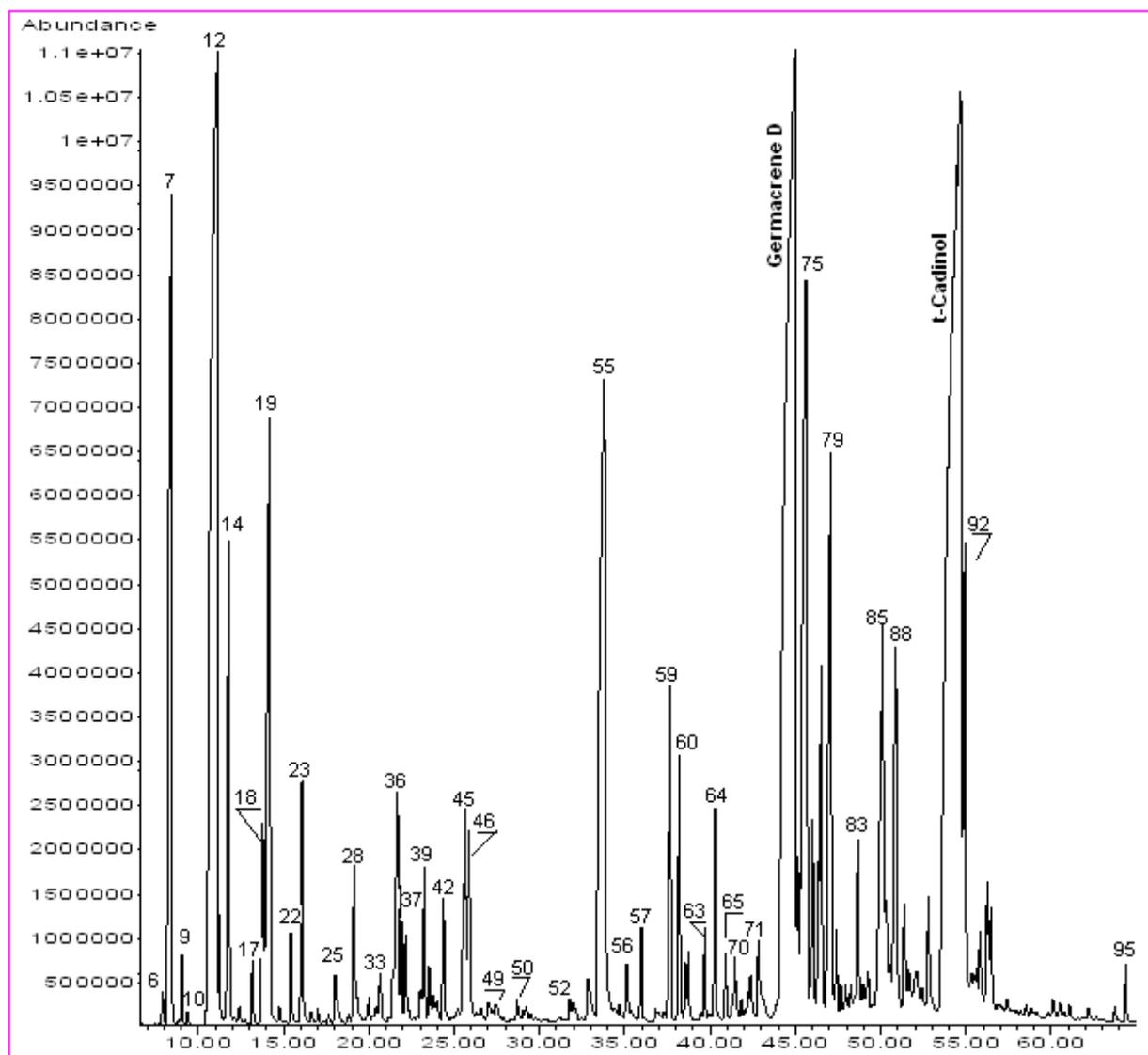


Figure 26: Spectre de masse du t-Cadinol.



Les nombres sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau 11.

**Figure 27: Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de *T. polium* de Tablat.**



Les nombres sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau 11.

**Figure 28: Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de *T. polium* de Boussaâda.**

Nous avons comparé la composition chimique des HE des trois espèces de germandrée avec ceux des travaux antérieurs et les principaux résultats sont représentés dans le tableau 9 .

**Tableau 9: Principaux composés des huiles essentielles de *Teucrium polium* subsp. *capitatum* de différents pays**

Origine	Principaux composés (%)	Références
Grèce	Carvacrol (10.1%), $\beta$ -caryophyllene, germacrene D (3.1%), torreyol (7.6%), $\alpha$ -cadinol (4.5%)	<b>Menchini et al., (2009)</b>
Portugal (5 échantillons)	$\alpha$ -Pinene (0.7-7.7%), sabinene (1.1-11.2%), $\beta$ -pinene (1.3-10.3%), isomenthone (0.0-7.7%), $\beta$ -caryophyllene (3.8-5.4%), $\delta$ -cadinene (3.0-9.9%), t-cadinol (3.0-24.1%), $\alpha$ -cadinol (1.6-9.8%),	<b>Antunes et al., (2004)</b>
Serbie	Germacrene D (31.8%), $\beta$ -caryophyllene (8.8%), bicyclogermacrene (6.2%), linalol (14.0%), $\beta$ -pinene (10.7%)	<b>Mitić et al., (2012)</b>
Bulgarie	$\beta$ -pinene (26.8%), $\alpha$ -pinene (9.3%), limonene (6.4%), germacrene D (17.7%)	<b>Mitić et al., (2012)</b>
Iran	Caryophyllene oxide (25.9%), epi- $\alpha$ -Muurolol (8.1%), $\alpha$ -cadinol (46.2%)	<b>Khani et Heydarian (2014)</b>
Jordanie	Sabinene (5.2%), $\beta$ -caryophyllene (8.7%), germacrene D (6.8%), 8-cedren-13-ol (24.8%)	<b>Aburjai et al., (2006)</b>
France	$\alpha$ -pinene (28.8%), $\beta$ -pinene (7.2%), p-cymene (7.0%)	<b>Cozzani et al., (2005)</b>
Arabie Saoudite	$\gamma$ -muurolene (8.72%), $\alpha$ -cadinol (5.93%), $\delta$ -cadinene (5.08%), $\beta$ -pinene (4.58 %), $\beta$ -gurjurene (4.43 %), $\alpha$ -limonene (4.29 %), $\alpha$ -Pinene (3.79 %).	<b>Guetat et Al-Ghamdi (2014)</b>

Nous remarquons que les résultats trouvés par **Mitić et al., (2012)** sont proches de nos résultats où le Germacrene D et  $\beta$ -pinene sont majoritairement présents pour l'huile essentielle de *Teucrium polium* provenant de Serbie et de Bulgarie. Tandis que ceux rapportés par **Khani et Heydarian (2014)** ; **Guetat et Al-Ghamdi (2014)** ; **Menchini et al., (2009)** ; **Antunes et al., (2004)** ; **Aburjai et al., (2006)** et **Cozzani et al., (2005)** sont différents des notret et diffèrent entre eux.

Ce polymorphisme au sein de la même espèce peut être dû à la variabilité génétique de la plante, à la période de récolte, aux facteurs édapho-climatiques ou bien aux conditions d'extractions (**Pereira et al., 2000** ; **Hudaib et al., 2002** ; **De Feo et al., 2003**).

## 1.2. *Calamintha nepeta*

Les rendements d'extraction en huiles essentielles de sarriette des deux régions sont regroupés dans le tableau 10.

**Tableau 10: Rendements d'extraction en huiles essentielles de Sarriette de deux régions**

Régions	Sarriette EL-Affroun	Sarriette Hammam Melouane
Rendements %	1.4	1.2

Les rendements en huiles essentielles de *Calamintha nepeta* sont de l'ordre de 1,2% et 1,4%. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par **Satrani et al., (2001)** qui en travaillant sur la même espèce provenant du Maroc enregistra un rendement de 1,6%.

L'analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles des deux échantillons de sarriette est représentée dans le tableau 11.

**Tableau 11 : Composition (%) des huiles essentielles de *Calamintha nepeta* des deux régions (El-Affroun, H. Melouane).**

N°	Composés	IR	<i>Calamintha nepeta</i>		Identification
		HP5MS	El-Affroune	H.Melouane	
1	Tricyclene	923	T	T	IR-SM
2	$\alpha$ -Thujene	925	T	0.1	IR-SM-Et
3	$\alpha$ -Pinene	939	0.2	0.2	IR-SM-Et
4	Camphene	948	0.1	T	IR-SM-Et
5	Sabinene	973	t	2.0	IR-SM-Et
6	$\beta$ -Pinene	978	0.1	0.6	IR-SM-Et
7	$\beta$ -Myrcene	992	t	0.8	IR-SM-Et
8	3-Octanol	1001	0.1	-	IR-SM
9	$\alpha$ -Phellandrene	1005	-	0.2	IR-SM-Et
10	$\delta$ -3-Carene	1009	-	0.2	IR-SM-Et
11	$\alpha$ -Terpinene	1017	t	T	IR-SM-Et
12	p-Cymene	1026	t	-	IR-SM-Et
13	Limonene	1044	0.1	<b>6.2</b>	IR-SM-Et
14	Eucalyptol	1046	2.8	2.3	IR-SM
15	cis- $\beta$ -Ocimene	1048	-	T	IR-SM
16	$\gamma$ -Terpinene	1061	-	0.1	IR-SM-Et
17	cis -Sabinene hydrate	1075	t	0.1	IR-SM

18	Terpinolene	1093	-	0.1	IR-SM-Et
19	Menthone	1155	0.2	1.0	IR-SM
20	Citronellal	1159	t	-	IR-SM
21	Isomenthone	1163	<b>19.6</b>	<b>3.2</b>	IR-SM
22	neo-Menthol	1170	<b>33.0</b>	<b>18.1</b>	IR-SM
23	Neoisomenthol	1171	0.1	-	IR-SM
24	Pulegone	1237	<b>39.5</b>	<b>45.9</b>	IR-SM
25	cis-Piperitone	1254	-	0.2	IR-SM
26	Piperitone oxide	1262	1.5	0.3	IR-SM
27	Isopiperitenone	1281	t	-	IR-SM
28	Carvacrol	1317	0.2	-	IR-SM-Et
29	Piperitenone	1341	0.1	0.5	IR-SM
30	Piperitenone oxide	1363	0.4	1.0	IR-SM
31	$\alpha$ -Copaene	1372	t	0.1	IR-SM
32	$\beta$ -Bourbonene	1380	t	0.1	IR-SM
33	Geranyl acetone	1385	t	-	IR-SM
34	$\beta$ -Cubebene	1390	-	0.1	IR-SM
35	$\beta$ -Elemene	1394	-	0.2	IR-SM
36	$\beta$ -Caryophyllene	1415	0.2	1.9	IR-SM
37	Aromadendrene	1443	-	T	IR-SM
38	$\alpha$ -Humulene	1452	t	0.2	IR-SM
39	Allo-aromadendrene	1457	-	0.1	IR-SM
40	Germacrene D	1481	0.2		IR-SM
41	$\beta$ -Selinene	1489	-	0.1	IR-SM
42	$\alpha$ -Farnesene (Z E)	1490	-	0.3	IR-SM
43	Bicyclogermacrene	1494	0.1	3.6	IR-SM
44	$\gamma$ -Cadinene	1513	-	T	IR-SM
45	$\delta$ -Cadinene	1523	-	0.1	IR-SM
46	Palustrol	1558	0.1	-	IR-SM
47	Spathulenol	1571	0.1	0.7	IR-SM
48	Caryophyllene oxide	1578	0.1	0.2	IR-SM
49	Viridiflorol	1591	-	0.1	IR-SM
50	Isospathulenol	1634	-	0.3	IR-SM
51	$\alpha$ -Cadinol	1653	-	0.1	IR-SM
	Total (%)		98.8	91.3	
	Monoterpènes		0.5	10.5	
	Monoterpènes oxygénés		94.7	70.3	

---

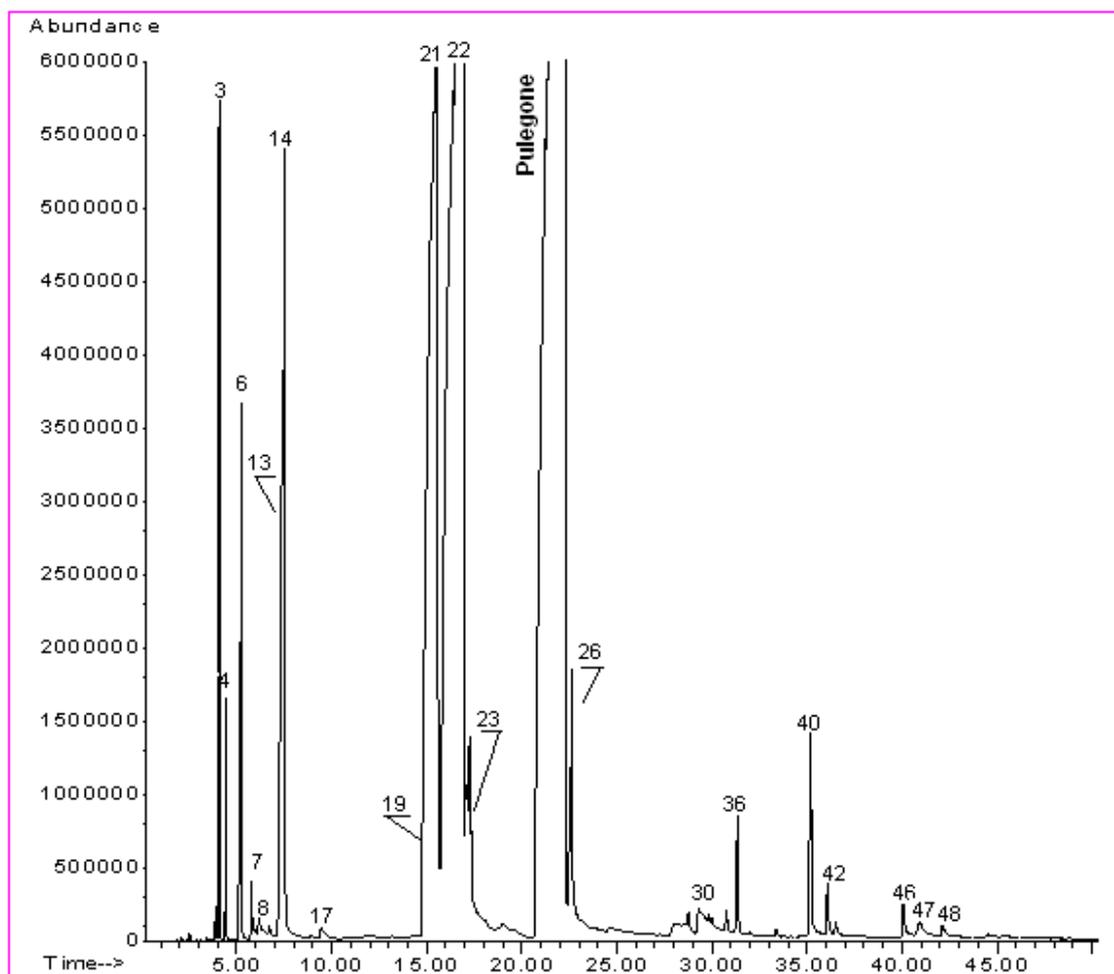
Sesquiterpènes	0.5	6.8
Sesquiterpènes oxygénés	0.3	1.4
Autres	2.8	2.3

---

IR : Indices de retentions relatifs au n-alcanes C<sub>9</sub>-C<sub>16</sub> calculés sur des colonnes non polaire (HP5MS). SM : Comparaison avec les spectres de masses fournis par la librairie du spectromètre de masse. Et : comparaison à un étalon. t : Concentration inférieure à 0,1%.

L'analyse par CG et CG/SM de l'huile essentielle de *Calamintha nepeta* provenant des deux régions a permis l'identification de 51 composés correspondant à des teneurs de 98,8% et 91.3% pour l'huile essentielle d'El Affroun et de Hammam Melouane respectivement. Les monoterpènes oxygénés constituent la quasi-totalité des HE des deux échantillons. Les deux composés majoritairement présents dans les deux huiles sont la pulegone (39,5%- 45.9%) et le neo-menthol (33% -18.10%) pour celle d'El Affroun et de H. Melouane respectivement.

Nous remarquons aussi que l'isomenthone est fortement présent dans l'huile essentielle d'El Affroun avec une concentration de 19.6% contre 3.2% pour celle de H. Melouane ; alors que le limonène qui est presque absent dans l'huile d'El Affroun (0.1%) et présent dans l'huile de H.Melouane avec une teneur de 6.2% (Fig. 29).



Les nombres sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau 14.

**Figure 29 : Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de Sarriette.**

Nous avons comparé les principaux composés des HE des sarriettes étudiées avec celles provenant de Corse, de France, de Turquie et de Serbie (tableau 12).

**Tableau 12: Principaux composés des huiles essentielles de *Calamintha nepeta* de différents pays**

Origine	Principaux composés (%)	Références
Serbie	Pulegone (75.5%), piperitone oxide (6.0%), menthone (5.3%), menthol (4.3%)	<b>Kitic et al., (2005)</b>
Turquie (3 échantillons)	Pulegone (25.6-54.1%), menthol (5.2-28.3%), menthone (2.2-7.9%), menthyl acetate (0.6-11.2%).	<b>Kürkçüoğlu et al.,(2007)</b>

Grèce (3 échantillons)	Cis-piperitone oxide (48.9-59.2%), $\beta$ -caryophyllene (5.0-7.5%), germacrene D (2.0-7.3)	<b>Dukic et al., (2004)</b>
France	Isomenthone (34.07%), pulegone (19.83%), isomenthol (19.54%), neomenthol (7.65%)	<b>Dobravaliskyte et al. (2012)</b>
Maroc	<i>p-cymène</i> (20,9 %), de <i><math>\gamma</math>-terpinène</i> (18,7 %), <i>thymol</i> (34,9 %)	<b>Satrani et al., (2001)</b>
Corse	Pulegone (49%), menthone (21,5%), l'isomenthone (8,3%).	<b>Rossi et al., (2007)</b>

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés par **Rossi et al., (2007)** ; **Dobravaliskyte et al., (2012)** ; **Kürkçüoğlu et al., (2007)** et **Kitic et al., (2005)** où la pulegone, la menthone et l'isomenthone sont présents en fortes concentrations tandis que les résultats rapportés par **Satrani et al., (2001)** et **Dukic et al. (2004)** sont largement différents des résultats précédents. Cette différence qualitative et quantitative dans la composition chimique de l'HE au sein de l'espèce *calamintha* est le fait de nombreux facteurs environnementaux : la région géographique, température, durée d'ensoleillement, nutrition végétale, etc. et aussi physiologiques : le stade de végétation et la partie de la plante sont considérés primordiaux pour la détermination du chémotype de l'huile essentielle.

### 1.3. *Visnaga daucoïdes*

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle de khella de la région de Boufarik comparé à celui de la même espèce provenant de trois régions du Maroc sont représentés dans le tableau 13.

**Tableau 13: Rendement d'extraction de l'huile essentielle *Visnaga daucoïdes***

Régions	Khella Boufarik	Khella Maroc <sup>a</sup>	Khella Quazzane <sup>b</sup>	Khella Meknès <sup>c</sup>
Rendements %	0.4	0.27	0.4 – 1%	0.13

**a :Satrani et al., (2004) ; b :Zrira et al., (2002) c : Soro et al., (2015)**

Nous remarquons que le rendement en HE de notre échantillon est similaire à celui trouvé par **Zrira et al (2002)** qui ont travaillé sur la même espèce provenant de la région de Quazzane (Maroc). Cependant, **Soro et al., (2015)** et **Satrani et al., (2004)** ont enregistré des rendements inférieurs au notre pour le khella provenant de Meknès et de Quazzane respectivement.

L'analyse par CPG et CG/SM de l'huile essentielle de *Visnaga daucoïdes* nous a permis d'identifier un total de 33 composés.

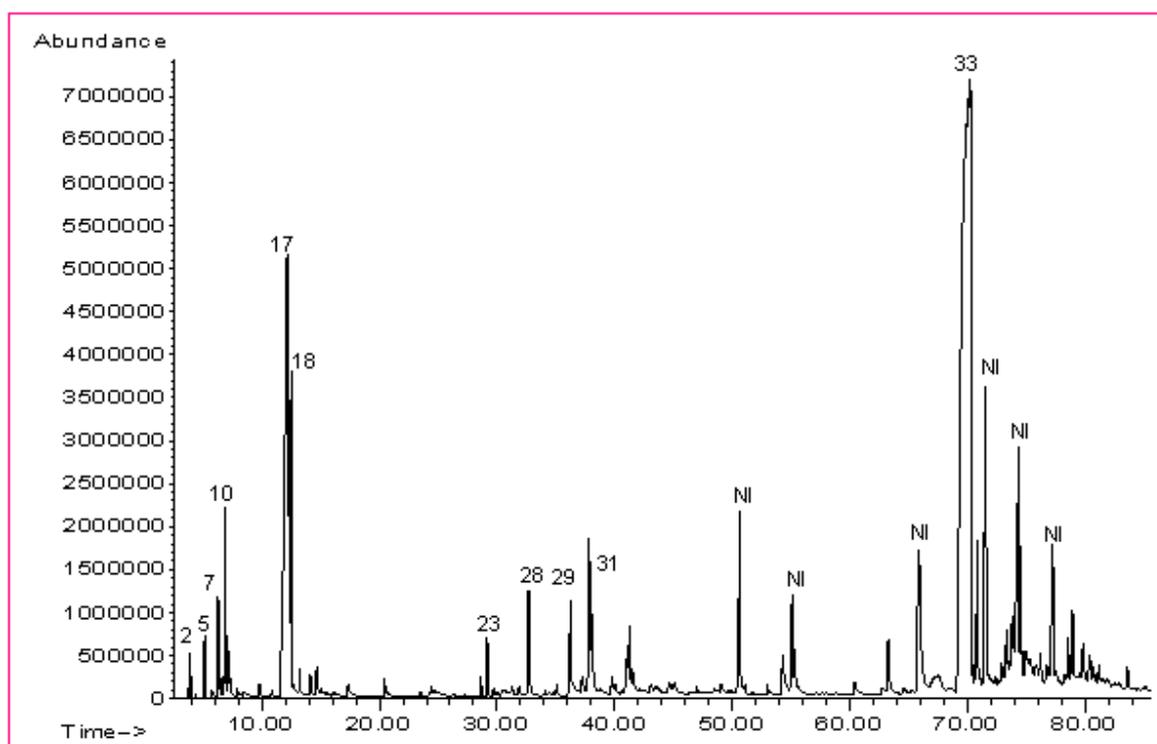
**Tableau 14: Composition (%) des huiles essentielles d'*Visnaga daucoïdes***

N°	Composés	IR HP5MS	Concentration%	Identification
1	Isobutylisobutyrate	908	t	IR-SM
2	$\alpha$ -Thujene	925	0.1	IR-SM-Et
3	$\alpha$ -Pinene	935	0.1	IR-SM-Et
4	Camphene	948	t	IR-SM-Et
5	Sabinene	972	0.3	IR-SM-Et
6	$\beta$ -Myrcene	992	0.1	IR-SM-Et
7	2-Methylpropyl 3-methylbutanoate	1009	0.6	IR-SM
8	Isobutylisovalerate	1018	0.2	IR-SM
9	Isoamyl butyrate	1021	0.1	IR-SM
10	Butanoicacid pentyl ester	-	1.4	SM
11	Limonene	1044	0.4	IR-SM-Et
12	1,8-Cineole	1046	0.1	IR-SM-Et
13	cis- $\beta$ -Ocimene	1047	0.1	IR-SM
14	trans- $\beta$ -Ocimene	1052	0.1	IR-SM
15	cis-Linalooloxide	1075	0.1	IR-SM-Et
16	trans-Linalooloxide	1083	0.1	IR-SM-Et
17	Linalol	1099	<b>14.0</b>	IR-SM-Et
18	Isopentylisovalerate	1104	2.4	IR-SM
19	Camphor	1126	0.1	IR-SM-Et
20	$\alpha$ -Terpineol	1194	0.1	IR-SM-Et
21	Bornylacetate	1285	t	IR-SM-Et
22	$\alpha$ -Copaene	1372	0.2	IR-SM
23	$\beta$ -Bourbonene	1380	0.5	IR-SM
24	(E)- $\beta$ -Damascenone	1384	0.1	IR-SM
25	$\beta$ -Cubebene	1390	0.1	IR-SM-Et
26	$\beta$ -Caryophyllene	1415	0.1	IR-SM-Et
27	$\beta$ -Gurjunene	1426	0.1	IR-SM
28	Geranylpropanoate	-	1.1	SM
29	Citronellylbutanoate	1529	0.9	IR-SM
30	$\alpha$ -Bisabolene	1537	0.1	IR-SM
31	Geranylbutanoate	1563	1.0	IR-SM

32	Palmiticacid	1982	0.1	IR-SM
33	Cembrene C	2023	<b>57.0</b>	IR-SM
Total (%)			81.7	
Monoterpènes			1.3	
Monoterpènes oxygénés			14.4	
Sesquiterpènes			4.2	
Diterpènes			57	
Autres			4.8	

IR : Indices de retentions relatifs au n-alcanes C<sub>7</sub>-C<sub>25</sub> calculés sur des colonnes non polaire (HP5MS). SM : Comparaison avec les spectres de masses fournis par la librairie du spectromètre de masse. t : Concentration inférieure à 0,1%.

Les chromatogrammes et le spectre de masse sont illustrés dans les figures (30 et 31).



Les nombres sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau 17.

**Figure 30: Chromatogramme CG-SM de l'huile essentielle de Khella.**

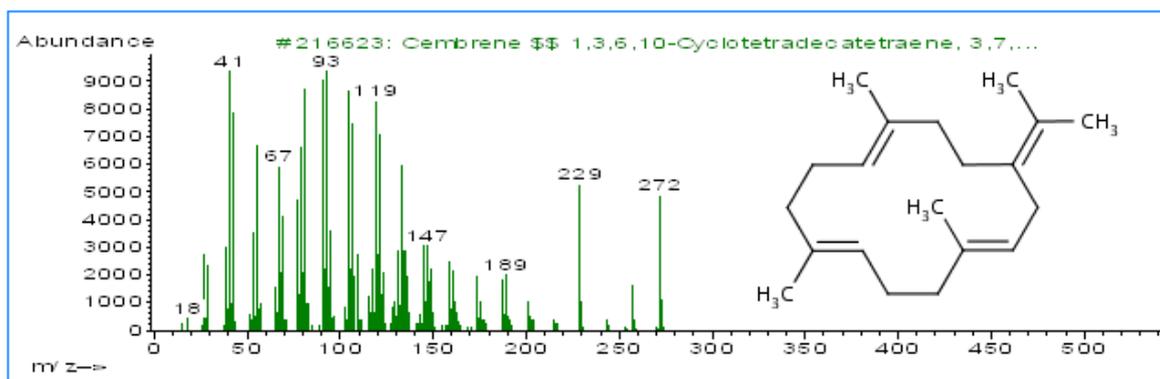


Figure 31: Spectre de masse du cembrene C

L'huile essentielle de l'espèce de *Visnaga* de la région de Boufarik est caractérisée par la dominance du Cembrene C enregistrant une teneur de 57.0% suivi par le linalol (14.0%) et l'isopentyl isovalerate (2,4 %). Le reste de l'huile est constitué par un grand nombre de composés dont le pourcentage reste inférieur ou égale à 1.4 %.

Ces résultats sont différents de ceux enregistrés pour les huiles extraites de *Khella* provenant du Maroc. En effet **Zrira et al., (2002)** et **Satrani et al. (2004)** signalent que les huiles essentielles analysées sont caractérisées par la présence de 2-méthylbutyle2-méthylbutyrate (27,7 %) ; le linalol (22,7 %) ; le 2-méthylbutyleisobutyrate (16,6 %) et le d'isoamyleisovalérate (9,98 %).

**Soro et al., (2015)** signalent que l'abiétadiène est le chémotype de l'HE de *khella* de Meknès avec un pourcentage de 53.42% ; cependant le linalol présente une teneur de 22%.

Les travaux réalisés par **Khalfallah et al., (2011)** ont montré que l'HE de *Visnaga daucoïdes* provenant de Constantine est principalement caractérisée par la présence de l'isobutyrate d'isobutyle, linalol, l'acide 2,2-diméthylbutanoïque, thymol, acétate de bornyl et le coroweacin.

#### 1.4. *Origanum floribundum*

Les rendements d'extraction des HE d'origan de Lakhdaria et de Maala sont représentés dans le tableau 15.

**Tableau 15: Rendement d'extraction des HE d'*Origanum floribundum***

Régions	Origan Lakhdoria	Origan de Maala
<b>Rendements (après 3h) %</b>	1.70	5.10

Nous remarquons que le rendement d'extraction en HE de l'origan de Maala est largement supérieur à celui de Lakhdoria.

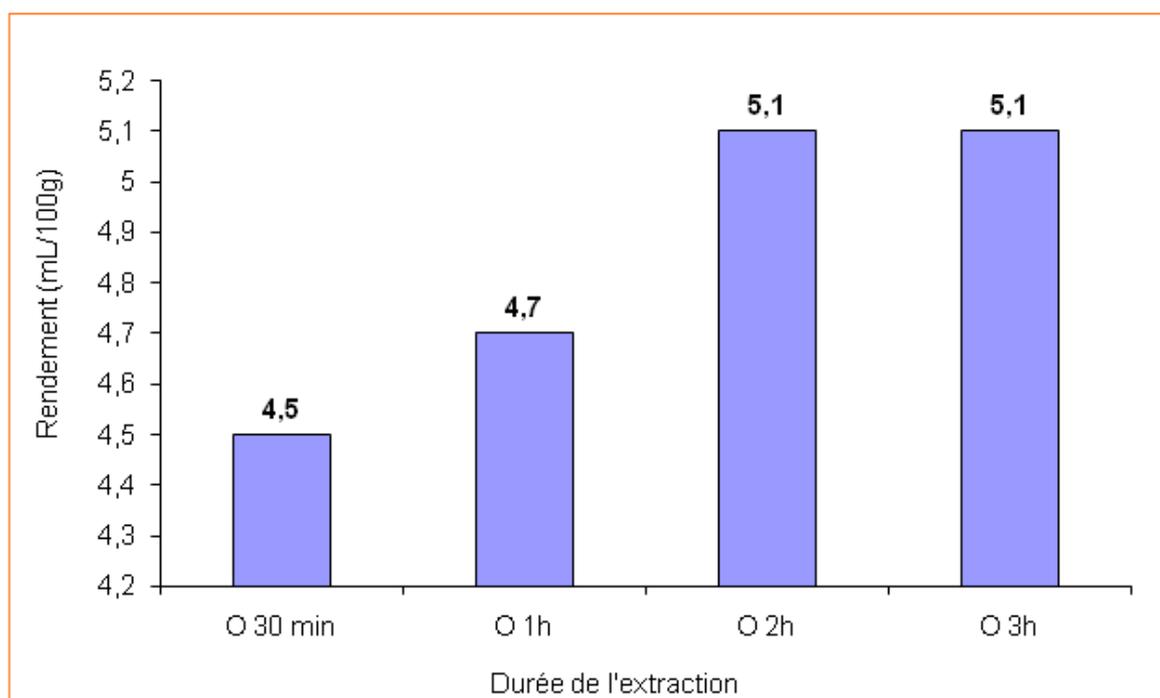
Le rendement enregistré pour l'échantillon de Maala est presque similaire à celui trouvé par **Hazzit et Baaliouamer (2009)** qui ont travaillé sur *O. floribundum* de Kadiria (5.4%). Alors que celui enregistré pour l'échantillon de Lakhdoria reste faible par rapport à ce dernier mais il est très proche à celui trouvé par **Brada et al., (2012)** en travaillant sur la même espèce qui provenait de la région de Khemiss-Miliana (1.6%).

#### 1.4.1 Influence de la durée d'extraction sur le rendement en HE

L'échantillon d'*O. floribundum* de Maala a été soumis à des extractions indépendantes d'huiles essentielles pour des durées de 30 minutes, 1, 2 et 3 heures. Les huiles ainsi extraites ont été analysées par GC et GC-MS et testées pour leurs activités antioxydante et antimicrobienne.

Dans la bibliographie, les extraits volatils des plantes sont généralement extraits pour une durée moyenne de **3 heures** et expérimentés pour une ou d'éventuelles activités biologiques. **Le choix de cette durée est-il le plus judicieux pour tous les matériaux biologiques ?** Dans cette partie de notre travail, nous essayerons de répondre à cette question.

L'extraction par hydrodistillation a fourni des rendements variant entre 4,5 et 5,1 ml/100g de matière végétale sèche (Fig. 32). La quasi-totalité de l'huile est extraite au bout de 2 heures tandis que 88% et 92% de cette huile sont obtenus après 30 minutes et 1 heure, respectivement.



**Figure 32: Rendement de l'extraction (ml/100g) des huiles essentielles d'*O. floribundum* en fonction de la durée d'extraction (30 min, 1, 2 et 3 heures).**

#### 1.4.2 Influence de la durée d'extraction sur la composition chimique

Les résultats de l'identification semi-quantitative par CG/SM des composés chimiques des huiles essentielles d'*Origanum floribundum* de Lakhdaria et de Maala sont représentés dans le tableau 16.

**Tableau 16: Composition (%) des huiles essentielles d'*Origanum floribundum* extraites pour différentes durées (30 min, 1, 2 et 3 heures).**

N°	Composés	IR	<i>Origan Maala</i>				<i>Origan Lakhdaria</i>	Identification
			30 min	1H	2H	3H	3H	
1	Ethyl n-valerate	848	-	-	-	-	T	IR-MS
2	E-2-Hexenal	853	t	t	t	t	T	IR-MS
3	3-Hexen-1-ol	862	-	-	-	-	T	IR-MS
4	3-Heptanone	890	0.1	0.1	0.1	0.1	T	IR-MS
5	Tricyclene	923	-	-	-	-	T	IR-MS
6	$\alpha$ -Thujene	928	0.8	1.2	0.4	0.3	2.8	IR-MS
7	$\alpha$ -Pinene	936	0.5	0.7	0.3	0.2	1.8	IR-MS-Et

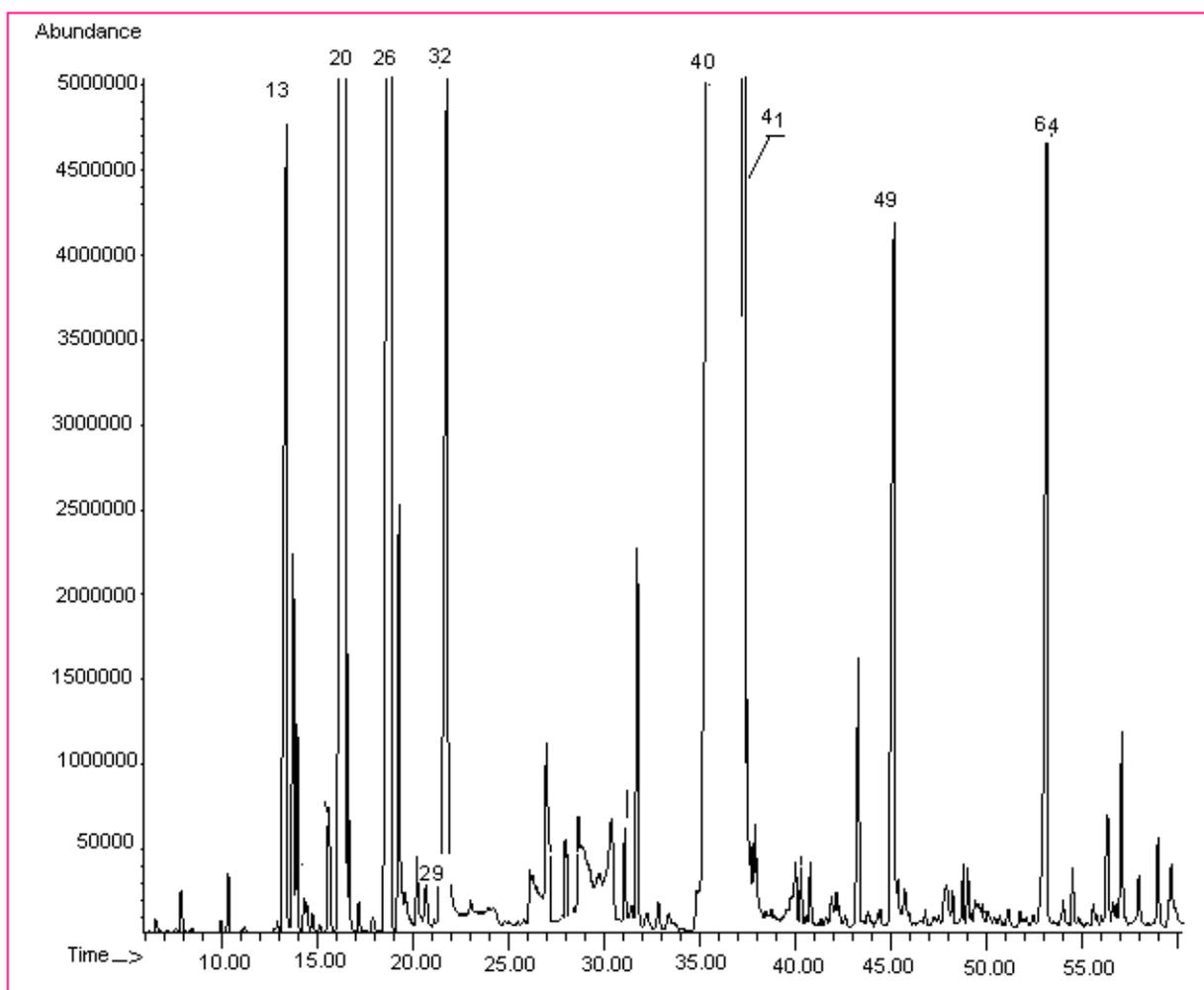
8	2.4(10)-thujadiene	945	-	-	-	-	T	IR-MS
9	Camphene	951	t	t	-	-	0.1	IR-MS-Et
10	Verbenene	953	-	-	-	-	T	
11	Sabinene	973	t	t	t	t	0.2	IR-MS
12	$\beta$ -pinene	978	0.1	0.1	t	-	0.4	IR-MS-Et
13	1-Octen-3-ol	981	1.4	1.4	1.5	1.4	0.9	IR-MS
14	3-Octanone	985	0.4	0.5	0.3	0.4	T	IR-MS
15	$\beta$ -Myrcene	990	0.1	0.2	t	t	3.6	IR-MS-Et
16	3-Octanol	993	0.1	0.1	t	0.1	T	IR-MS
17	$\alpha$ -Phellandrene	1004	t	t	t	t	0.5	IR-MS-Et
18	$\delta$ -3-carene	1011	t	t	-	-	T	IR-MS-Et
19	$\alpha$ -Terpinene	1017	0.1	0.2	0.1	0.1	4.8	IR-MS-Et
20	p-Cymene	1024	<b>22.7</b>	<b>23.1</b>	<b>17.3</b>	<b>16.8</b>	<b>15.5</b>	IR-MS
21	Limonene	1029	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	IR-MS-Et
22	B-Phellandrene	1030	-	-	-	-	0.7	IR-MS
23	1,8-Cineole	1032	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	IR-MS-Et
24	cis- $\beta$ -Ocimene	1038	t	t	-	t	0.1	IR-MS
25	trans- $\beta$ -Ocimene	1048	-	-	-	-	0.2	IR-MS
26	$\gamma$ -Terpinene	1060	<b>25.9</b>	<b>28.7</b>	<b>24.1</b>	<b>21.6</b>	<b>19.9</b>	IR-MS-Et
27	cis-Sabinene hydrate	1067	0.3	0.3	0.4	0.4	0.6	IR-MS
28	1-Nonen-3-ol	1087	t	t	t	t	0.1	IR-MS
29	Terpinolene	1089	t	t	t	t	0.1	IR-MS-Et
30	p-Cymenyl	1090	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	IR-MS
31	trans-Sabinene hydrate	1098	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	IR-MS
32	Linalool	1100	1.0	1.0	1.2	1.3	1.7	IR-MS-Et
33	Borneol	1167	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	IR-MS-Et
34	4-Terpineol	1177	0.4	0.4	0.5	0.5	0.2	IR-MS-Et
35	p-Cymen 8-ol	1184	0.1	0.1	0.1	0.1	-	IR-MS
36	$\alpha$ -Terpineol	1190	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	IR-MS-Et
37	Thymol methyl ether	1234	0.3	0.3	0.3	0.4	T	IR-MS
38	Carvacrol methyl ether	1243	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	IR-MS
39	Thymoquinone	1260	0.1	t	t	t	T	IR-MS
40	Thymol	1290	<b>32.7</b>	<b>34.9</b>	<b>43.7</b>	<b>45.0</b>	<b>33.6</b>	IR-MS-Et
41	Carvacrol	1300	<b>2.6</b>	<b>2.3</b>	<b>3.2</b>	<b>3.2</b>	<b>8.5</b>	IR-MS-Et
42	$\alpha$ -Copaene	1376	t	t	t	t	-	IR-MS
43	Geranyl acetate	1380	0.2	t	0.1	0.2	-	IR-MS-Et
44	cis-Jasmone	1396	-	t	t	t	-	IR-MS
45	Methyleugenol	1403	-	t	t	0.1	-	IR-MS
46	$\beta$ -Caryophyllene	1420	0.5	0.5	0.6	0.9	0.8	IR-MS
47	trans- $\alpha$ -Bergamotene	1435	t	t	t	t	-	IR-MS
48	Aromadendrene	1441	t	t	t	t	-	IR-MS
49	1,6,6-Trimethylbicyclo[3.3.0]octan-3-one	1454	0.1	0.1	0.1	0.1	-	MS

50	$\alpha$ -Humulene	1453	t	t	t	0.1	T	IR-MS
51	allo-Aromadendrene	1460	-	-	t	0.1	T	IR-MS
52	$\gamma$ -Muuroolene	1476	-	t	t	t	-	IR-MS
53	Germacrene D	1477	-	-	-	-	0.1	IR-MS
54	$\beta$ -Selinene	1486	-	t	t	0.1	-	IR-MS
55	Bicyclogermacrene	1492	-	-	-	-	T	IR-MS
56	$\alpha$ -Selinene	1494	-	-	t	0.2	-	IR-MS
57	$\alpha$ -Muuroolene	1499	-	t	0.1	0.1	-	IR-MS
58	$\beta$ -Bisabolene	1508	0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	IR-MS
59	$\gamma$ -Cadinene	1514	0.1	0.1	0.1	0.1	T	IR-MS
60	$\delta$ -Cadinene	1523	0.1	0.1	0.1	0.1	T	IR-MS
61	$\alpha$ -Calacorene	1541	-	t	t	t	-	IR-MS
62	Germacrene D-4-ol	1568	-	-	-	-	T	IR-MS
63	Spathulenol	1575	-	t	t	t	0.1	IR-MS
64	Caryophyllene oxide	1581	1.3	1.3	1.4	1.5	0.2	IR-MS
65	Viridiflorol	1591	0.1	t	t	t	-	IR-MS
66	Caryophylla- 4(12).8(13)-dien- 5.beta.ol	1635	-	t	t	t	-	IR-MS
67	t-Cadinol	1639	-	0.1	0.1	0.1	T	IR-MS
68	$\beta$ -Eudesmol	1650	-	t	t	0.1	-	IR-MS
69	$\alpha$ -Cadinol	1652	-	t	t	0.1	t	IR-MS
70	Palmitic acid	1982	-	t	t	0.1	-	IR-MS
71	Phytol	2121	-	-	t	0.1	-	IR-MS
<b>Nombre de composés</b>		<b>46</b>	<b>58</b>	<b>58</b>	<b>58</b>	<b>55</b>		
Total (%)		<b>95.5</b>	<b>99.1</b>	<b>97.1</b>	<b>97.8</b>	<b>98.4</b>		
Monoterpènes		50.6	54.5	42.4	39.1	51.8		
Monoterpènes oxygénés		38.3	39.9	50.2	52.2	45.2		
Sesquiterpènes		0.9	0.9	1.1	2.3	1.0		
Sesquiterpènes oxygénés		1.4	1.4	1.5	2.0	0.3		
Autres		4.3	2.4	1.9	2.2	1.0		

Composés classés par ordre d'élution par rapport à la colonne HP 5MS ; IR= indices de rétentions relatifs à la série de n-alcanes C<sub>7</sub>-C<sub>25</sub> ; t=trace (<0.1%) ; Identification : IR : par comparaison des indices de rétention calculés par rapport à ceux de la bibliographie, MS : comparaison des spectres de masses par rapport à ceux de la bibliographie et à ceux fournis par la banque de spectres informatisée (Wiley 7 et NIST 2005). Quantification des teneurs relatives (%) des composés en GC-FID.

L'analyse par GC et GC-MS des différents échantillons dont un exemple du profil chromatographique est représenté par la figure 33 a abouti à l'identification d'un total de 71 composés (Tableau 19) dont les principaux sont le p-cymène (15.5-23.1%), le  $\gamma$ -terpinene (19.9-28.7%) et le thymol (32.7-45%). Cette composition est dans son ensemble qualitativement similaire à celles d'autres échantillons de Hammam Mélouane et Kadiria rapportées par **Hazzit et al., (2006)** et **Hazzit et al., (2009)**.

En ce qui concerne les différentes extractions de l'HE d'*O. floribundum* de Maala, nous remarquons que la totalité des composés identifiés (58) est extraite au bout d'une heure (Tableau 19). Mais certains composés, particulièrement les sesquiterpènes qui sont moins volatils, ne sont extraits quantitativement que pour les longues durées (2 ou 3 heures) ce qui suggère qu'une extraction prolongée est non seulement nécessaire pour l'extraction de la totalité des constituants d'une huile mais aussi pour les obtenir en leur quantité totale.



Les nombres sur les pics correspondent aux numéros d'ordre des composés du tableau 19.

**Figure 33: Chromatogramme GC-MS sur colonne HP5MS de l'huile essentielle d'*O. floribundum*. (30min).**

Il y a lieu de noter que les extraits de 30 min et 1h sont les plus riches en p-cymène et  $\gamma$ -terpinène et les moins riches en thymol tandis que l'inverse se produit pour ceux de 2 h et 3 h. Il

est établi que le monoterpène phénolique (thymol) est considéré comme principal composé responsable de l'activité biologique des huiles essentielles qui le contiennent. Sur la base de cette remarque on pourrait s'attendre donc à une activité biologique plus intense avec les huiles essentielles extraites pour des durées de 2 et 3 heures.

## 2 Rendement et teneurs en composés phénoliques des extraits non volatils

Après addition du réactif de Folin-Ciocalteu et du carbonate de sodium, une couleur bleue a été constatée dans le milieu réactionnel, dont l'intensité varie en fonction de la concentration en polyphénols totaux de l'extrait.

La teneur en polyphénols a été déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (Annexe 1). La quantité correspondante, déterminée par l'équation de la courbe de type «  $y = a(x) + b$  » a été rapportée en mg équivalent de l'étalon utilisé par g de matière sèche (MS).

La teneur en flavonoïdes des extraits éthanoliques élaborés est déterminée suivant la méthode modifiée au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ). Après addition de ce dernier, une coloration jaune verdâtre est obtenue, dont l'intensité varie en fonction de la concentration en flavonoïdes de l'extrait dosé. La quantité correspondante, déterminée par l'équation de la courbe d'étalonnage obtenue avec la quercétine (Annexe 2).

Les rendements d'extraction en extraits éthanoliques des espèces étudiées exprimés en pourcentage, poids par rapport à la matière végétale sèche ainsi que les teneurs en flavonoïdes et phénols totaux sont regroupés dans le tableau 17.

**Tableau 17: Rendements et Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des extraits**

Echantillons	Origan		Germandrée			Sarriette		Khella
	Lakhdaria	Boussaâda	Tablat	Kadiria	El Affroun	H.Melouane	Boufarik	
Rendement <sup>a</sup>	18.4	21.0	15.4	18.13	22.7	21.45	15.7	
Phénols totaux <sup>b</sup>	250±3.7	175±1.4	166.03±1.2	160.5±1.8	210,5±2.5	145.5±1.8	94±1.2	
Flavonoïdes <sup>c</sup>	180±0.9	29.3±0.7	27.0±0.9	28.7±0.7	17,91±0.9	44±0.5	34,75±0.5	

(a) % (g/g) ; (b) mg EAG/g d'extrait ; (c) mg EQ/g d'extrait

D'une manière générale, les fortes teneurs en polyphénols ont été enregistrées avec l'extrait d'origan. En se référant à la littérature, les résultats enregistrés pour cette espèce sont supérieurs à ceux rapportés par **Skerget et al. (2005)** qui ont travaillé sur l'espèce d'*Origanum vulgare* de Droga (Slovenia). La teneur en polyphénols totaux rapportée par ces auteurs est de 186 g EAG /kg MS.

Pour les trois échantillons de l'espèce de germandrée nous avons remarqué une légère différence de teneurs en phénols totaux et flavonoïdes. Les teneurs les plus élevées sont enregistré pour l'échantillon de Boussaâda.

Une différence de teneurs en phénols totaux et flavonoïdes est enregistrée pour les deux échantillons de sarriettes. Les phénols totaux sont majoritairement présents dans la sarriette d'El Affroun avec une teneur de 210 mgGAE/g MS contre 145.5 mgGAE/g MS pour l'échantillon de Hammam Melouane. Alors que ce dernier est plus riche en flavonoïdes (44mg EQ/g) que celui d'El Affroun (17.91 mg EQ/g).

L'extrait éthanolique de khella renferme des teneurs relativement élevées en composés phénoliques si on les compare à celles de **Miguel et al., (2014)** qui ont signalé des teneurs de 15.10 mg/g et 2.70 mg/g de matières sèche en polyphénols et en flavonoïdes respectivement.

Les études menées par de nombreux auteurs sur les plantes médicinales indiquent l'influence de l'origine géographique, la saison de la récolte, l'organe végétal utilisé, la méthode d'extraction et la nature du solvant sur la composition chimique, la teneur et les activités fonctionnelles des composés phénoliques (**Hayouni et al.,2007**).

D'après **Bouterfas et al. (2013)**, la distribution des métabolites secondaires peut varier durant les stades de développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques extrêmes (température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité, etc.). Ces paramètres stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les flavonoïdes.

### **3 Evaluation de l'activité antioxydante des HE et des extraits non volatils**

L'objectif de la présente partie est de comparer l'activité antioxydante des huiles essentielles des quatre plantes étudiées ainsi que de leurs extraits éthanoliques par deux méthodes de référence à savoir :

- **Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

La méthode de mesure de l'activité antioxydante par le test du piégeage du radical DPPH est largement utilisée pour sa fiabilité et répétabilité (Thaipong *et al.*, 2006 ;Siddhuraju, 2007). Les résultats de ce test sont hautement reproductibles et comparables à d'autres méthodes de piégeage des radicaux libres (Gil *et al.*, 2000).

- **Mesure du pouvoir réducteur ferrique**

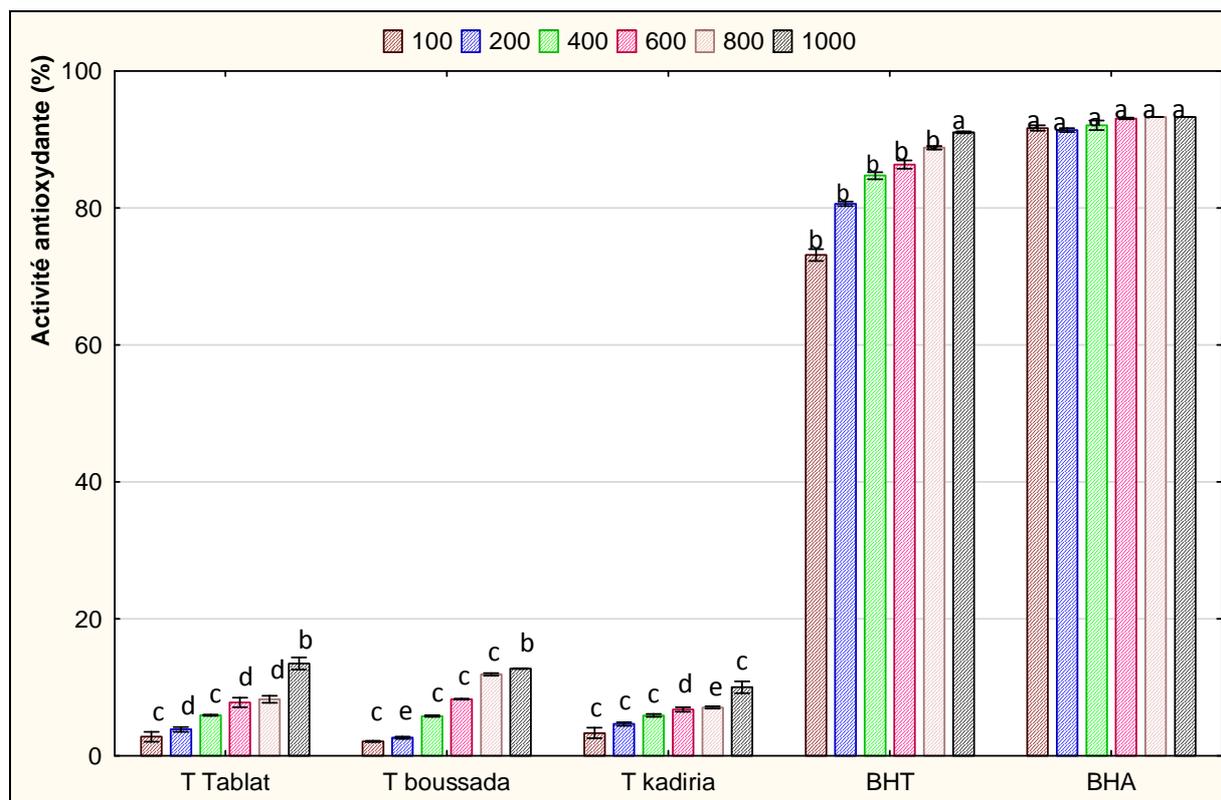
Le pouvoir réducteur mesure la capacité de réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), donc la mesure de l'aptitude d'une huile essentielle ou d'un extrait à interagir avec les espèces chimiques réactives en tant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables.

### **3.1. *Teucrium polium* subsp. *capitatum***

#### **3.1.1 Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)**

- ✓ **Cas des huiles essentielles**

Les résultats obtenus lors du test de mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH par les HE extraites à partir des échantillons de germandrée provenant des régions de Tablat, Kadiria et Boussaâda, comparés au BHT et BHA, sont illustrés dans la figure 34.



**Figure 34: Activité de piégeage du radical DPPH des HE de *Teucrium polium* subsp. *capitatum* comparée à celles du BHT et BHA.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

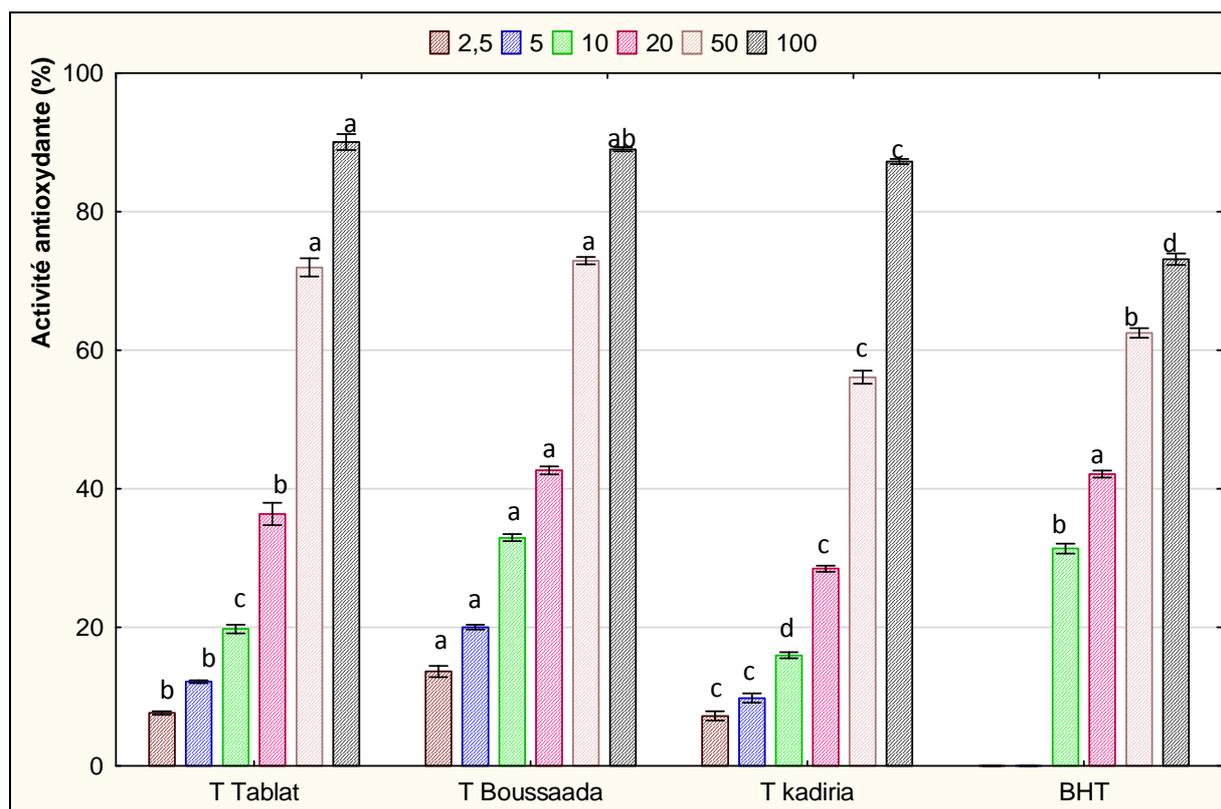
D'une façon générale, l'activité antioxydante des HE de germandrée, du BHA et BHT augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration. Les antioxydants de synthèse présentent une forte activité de piégeage même à de faibles doses. En effet pour une concentration de 100 mg/l, les valeurs enregistrées sont de l'ordre de 73,15 et 91,7 % respectivement pour le BHT et le BHA. Alors que pour une concentration de 1000 mg/l de l'huile essentielle, l'activité de piégeage est de 13,48%, 12,74% et 10,00% respectivement pour *Teucrium polium* de Tablat, Boussaâda et Kadiria. Nous remarquons que les huiles de Tablat et Boussaâda sont légèrement plus actives que celle de Kadiria et ceci peut être expliqué par le fait que cette dernière a la plus faible teneur en composés oxygénés (14,8%).

L'activité des huiles de germandrée des trois régions reste largement inférieure à celle des deux antioxydants de synthèse. Cette faible activité de piégeage du radical DPPH peut être

expliquée par leurs contenus bas en composés phénoliques. Ces derniers sont réputés pour leurs rôles importants comme agents antioxydants (Delaquis *et al.*, 2002 ; Kulisic *et al.*, 2004).

#### ✓ Cas des extraits

Les valeurs d'activités de piégeage du radical DPPH obtenues pour les extraits de germandrée des trois régions étudiées, comparées à celles du BHT sont illustrés la figure 35.



**Figure 35: Activité de piégeage du radical DPPH des extraits de *Teucrium polium* comparée à celles du BHT.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

D'après les résultats représentés dans la figure 35, une augmentation proportionnelle des activités de piégeage du radical DPPH en fonction des concentrations en extraits et en BHT est observée. L'effet antiradicalaire est beaucoup plus important que celui des HE. En effet, même à de faibles doses les extraits présentent une action considérable vis-à-vis des radicaux libres. Cette action est éventuellement due à leurs compositions chimiques plus ou moins complexes et variées.

A une concentration de 100 mg/l les trois échantillons d'extrait présentent des activités supérieures à celle du BHT et qui sont de l'ordre de 89% pour les extraits provenant de Tablat et Boussaâda et 87% pour celui de Kadiria contre 73 % pour le BHT.

Cependant nous remarquons que les extraits de Tablat et Boussaâda sont légèrement plus actifs que celui de Kadiria et ceci est confirmé par les résultats obtenus lors du calcul des concentrations inhibitrices médianes IC<sub>50</sub> (Tableau 18).

**Tableau 18: Valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits et du BHT**

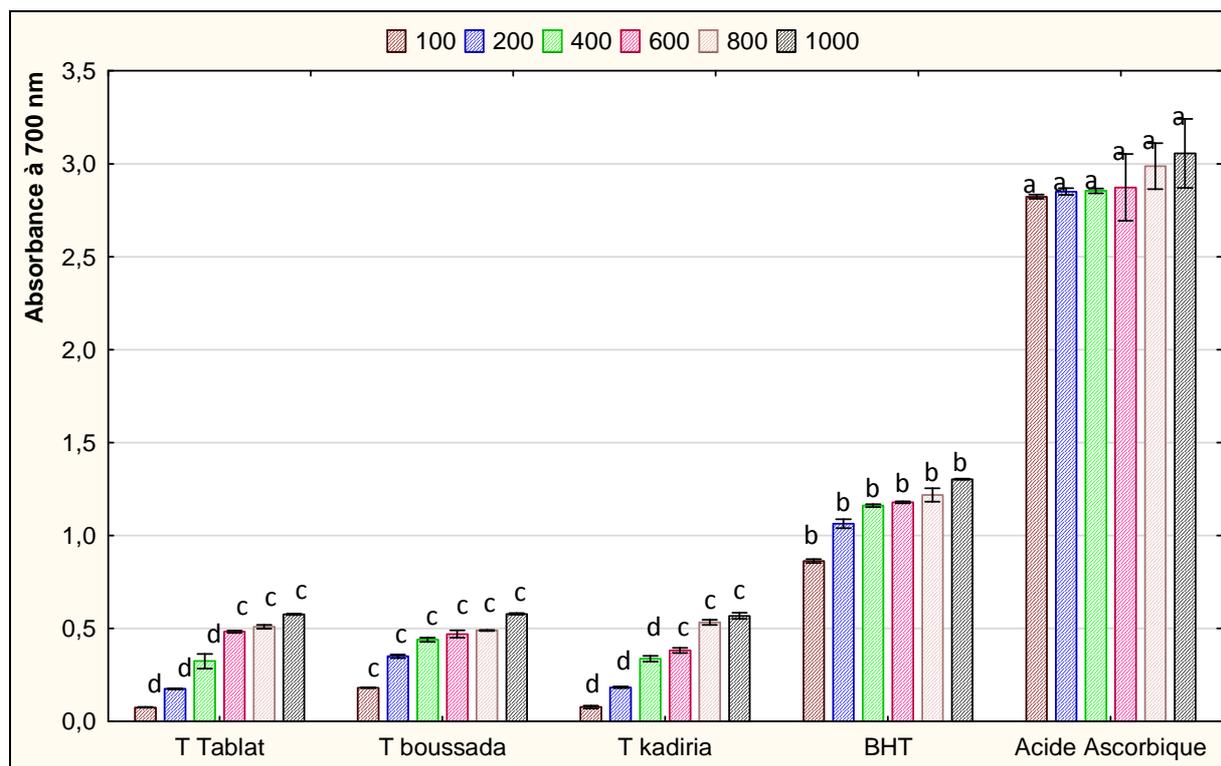
Echantillon	Extraits/substance	*IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	<i>Tablat</i>	31.56±0.74
<i>Teucrium polium subsp. capitatum</i>	<i>Boussaâda</i>	27.40±0.2
	Kadiria	43.88±0.68
	BHT	27.80±0.3

\* : Concentration pour 50 % d'inhibition exprimées en (moyenne ± écart type).

### 3.1.2 Mesure du pouvoir réducteur ferrique des espèces de germandrée

#### ➤ Cas des huiles essentielles

Les résultats du pouvoir réducteur ferrique obtenus avec les HE de germandrée provenant de Tablat, Kadiria et Boussaâda, comparés à celles du BHT et d'acide ascorbique sont illustrés dans la figure 36.



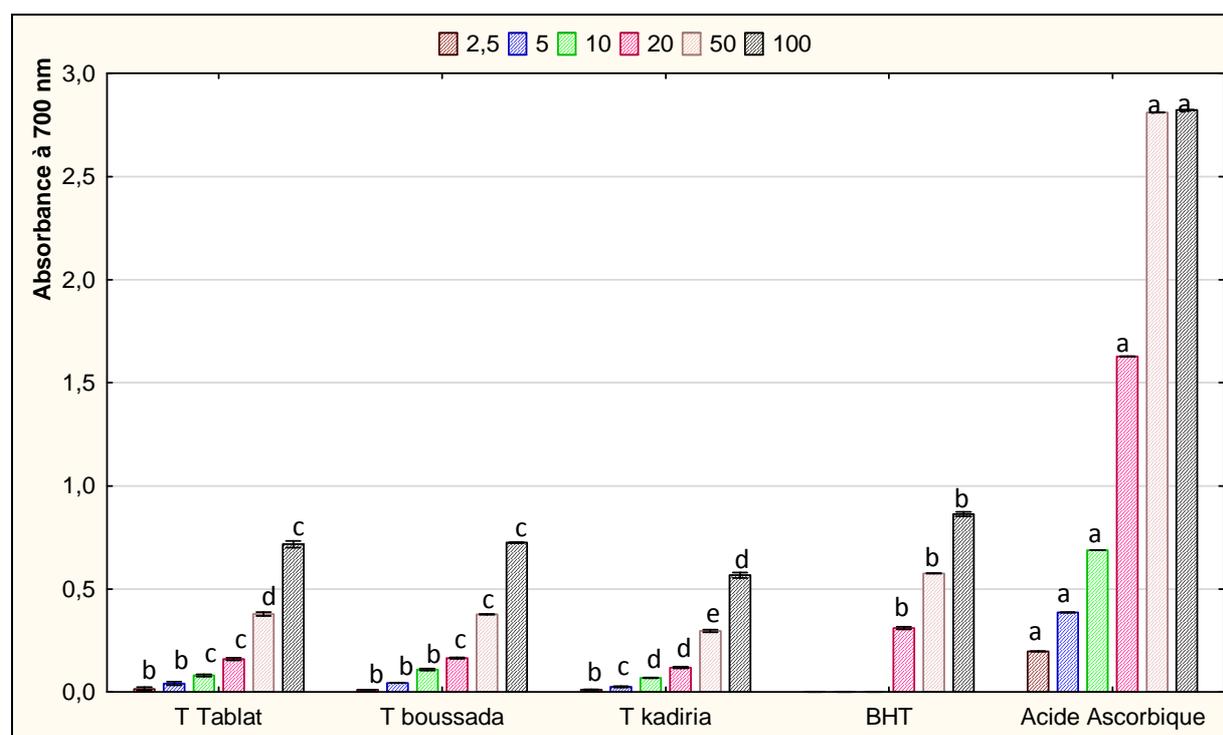
**Figure 36: Pouvoir réducteur des HE de *Teucrium polium*, du BHT et de l'acide ascorbique.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles des échantillons du *Teucrium* du BHT et d'acide ascorbique augmente proportionnellement avec la concentration. Les capacités réductrices des HE de germandrée sont nettement inférieures à celles enregistrées avec les antioxydants de synthèse.

En comparant le pouvoir réducteur des HE des trois régions, nous remarquons que les trois échantillons possèdent pratiquement la même capacité réductrice qui est de l'ordre de 0.568 à 0.578 pour une concentration de 1000mg/l. Cette capacité reste faible par rapport aux BHT et l'acide ascorbique et ceci confirme les résultats enregistrés pour l'activité de piégeage du radical DPPH.

### ✓ Cas des extraits

Les résultats du pouvoir réducteur ferrique obtenus avec les extraits de germandrée provenant de Tablat, Kadiria et Boussaâda, comparés à celles du BHT et d'acide ascorbique sont illustrés dans la figure 37.



**Figure 37: Pouvoir réducteur des extraits de *Teucrium polium*, du BHT et de l'acide ascorbique.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

D'après la figure 37, nous remarquons qu'aux faibles concentrations ; les extraits de germandrée des trois régions présentent un très faible pouvoir mais au fur et à mesure que les concentrations des extraits augmentent leurs pouvoirs réducteurs se rapprochent de celui de l'antioxydant de synthèse (BHT).

Parmi les trois échantillons de germandrée, celui de Boussaâda a montré la plus forte capacité réductrice suivi de près par celui provenant de Tablat alors que la plus faible valeur est signalée avec l'échantillon de Kadiria, ce qui est en accord avec les résultats cités auparavant pour le test de piégeage du radical DPPH.

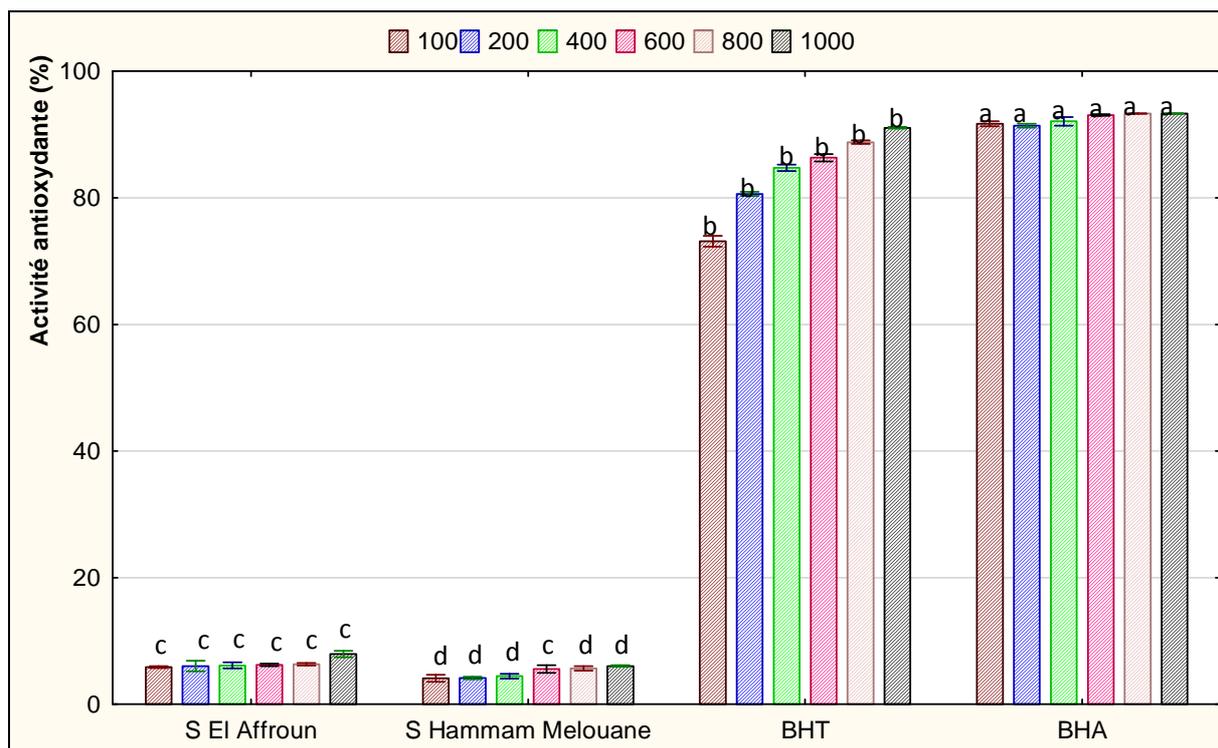
De plus, l'intensité réductrice des extraits étudiés est en corrélation avec leurs teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux. On constate donc que l'activité antioxydante des extraits serait attribuée à leurs teneurs en flavonoïdes et en phénols totaux. Ceci rejoint les résultats obtenus par **Djeridane et al., 2006** qui ont travaillé sur 11 extraits de plantes algériennes.

### 3.2. *Calamintha nepeta*

#### 3.2.1 Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

##### ✓ Cas des huiles essentielles

Les valeurs d'activités de piégeage du radical DPPH obtenues pour les HE de sarriette provenant des deux régions, comparées à celles du BHT et BHA sont illustrés sur la figure 38.



**Figure 38: Activité de piégeage du radical DPPH des HE de *Calamintha nepeta*, comparée à celles du BHT et BHA.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH par les HE de sarriette existe puisqu'ils sont capables de réduire la forme stable de ce radical vers le diphenylpicrylhydrazine.

Cette activité de piégeage est faiblement corrélée avec la progression des concentrations en HE. En effet de la plus faible concentration (100mg/l) à la plus forte (1000mg/l) la neutralisation du radical DPPH n'augmente que de 2%, atteignant la valeur maximale de 7.93% pour la sarriette d'El Affroun et 6% pour celle provenant de Hammam Melouane. Tandis que les antioxydants de synthèse, manifestent une forte activité même à de faibles concentrations.

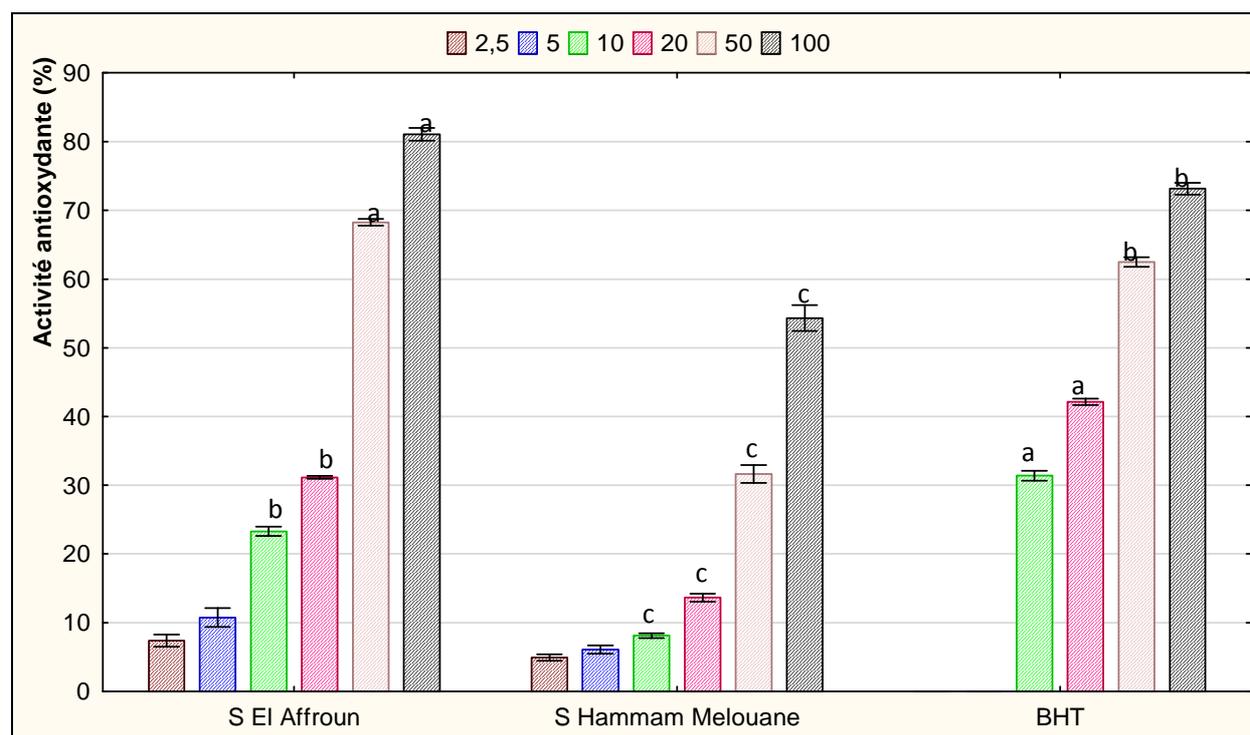
Les concentrations inhibitrices médianes ( $IC_{50}$ ) de ces huiles n'ont pas été déterminées car aucune d'elles n'a pu atteindre un seuil d'inhibition de 50% des radicaux.

Des études ont montré qu'une forte teneur en composés monoterpéniques, réduit l'activité de piégeage des radicaux libres par les HE, et un effet inverse est observé en présence des composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol (**Aidi Wannas et al., 2010**).

En effet, si nous essayons de corréler l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Calamintha nepeta* à leurs compositions chimiques, nous remarquons que ces huiles sont majoritairement constituées de composé monoterpéniques qui sont de l'ordre de 95.2% et 80.8% respectivement pour la sarriette d'El Affroun et de Hammam Melouane.

#### ✓ Cas des extraits

Les différentes activités de piégeage obtenues pour les extraits de sarriette des deux régions étudiées, comparées à celles du BHT sont illustrées dans la figure 39.



**Figure 39: Activité de piégeage du radical DPPH des extraits de Sarriette comparée à celles du BHT.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

D'après la figure 39, nous remarquons que l'activité du piégeage est corrélée avec l'augmentation des concentrations en extrait éthanolique. Cette activité est très importante comparativement à celle de l'huile essentielle ; en effet elle atteint 81.07% et 54.32% pour 100mg/l d'extrait contre 7,93 % et 6.05 % pour 1000mg/l d'huile pour la sarriette d'El Affroun et celle de Hammam Melouane respectivement.

Cependant nous remarquons que parmi les deux extraits étudiés celui d'El Affroun est le plus actif et ceci du fait de sa forte teneur (210,5 mg EAG/g de MS) en composés phénoliques. Cette différence d'activité est confirmée par les valeurs enregistrées pour l'IC<sub>50</sub> (Tableau 19).

**Tableau 19: Valeurs d'IC<sub>50</sub> des extraits de sarriette et du BHT**

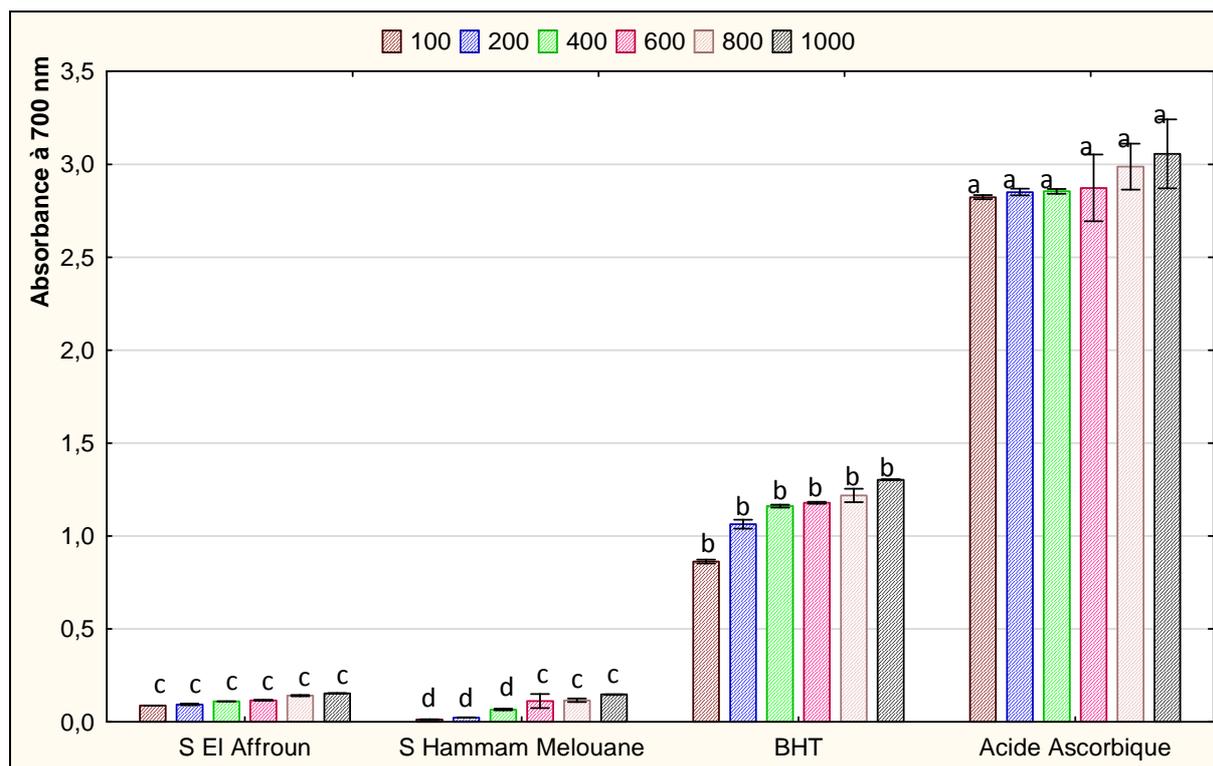
Echantillon	Extraits/substance	*IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<i>Calamintha nepeta</i>	El-Affroun	34.11 ± 0.94
	Hammam Melouane	89.90 ± 0.62
	BHT	27.80 ± 0.3

\* : Concentration pour 50 % d'inhibition exprimées en (moyenne ± écart type).

### 3.2.2 Mesure du pouvoir réducteur ferrique des espèces de sarriettes

#### ➤ Cas des huiles essentielles

Les résultats du pouvoir réducteur des huiles essentielles étudiées, du BHT et de l'acide ascorbique, exprimé par l'absorbance à 700 nm, sont illustrés sur la figure 40.



**Figure 40: Pouvoir réducteur des HE de *Calamintha nepeta*, du BHT et de l'acide ascorbique.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

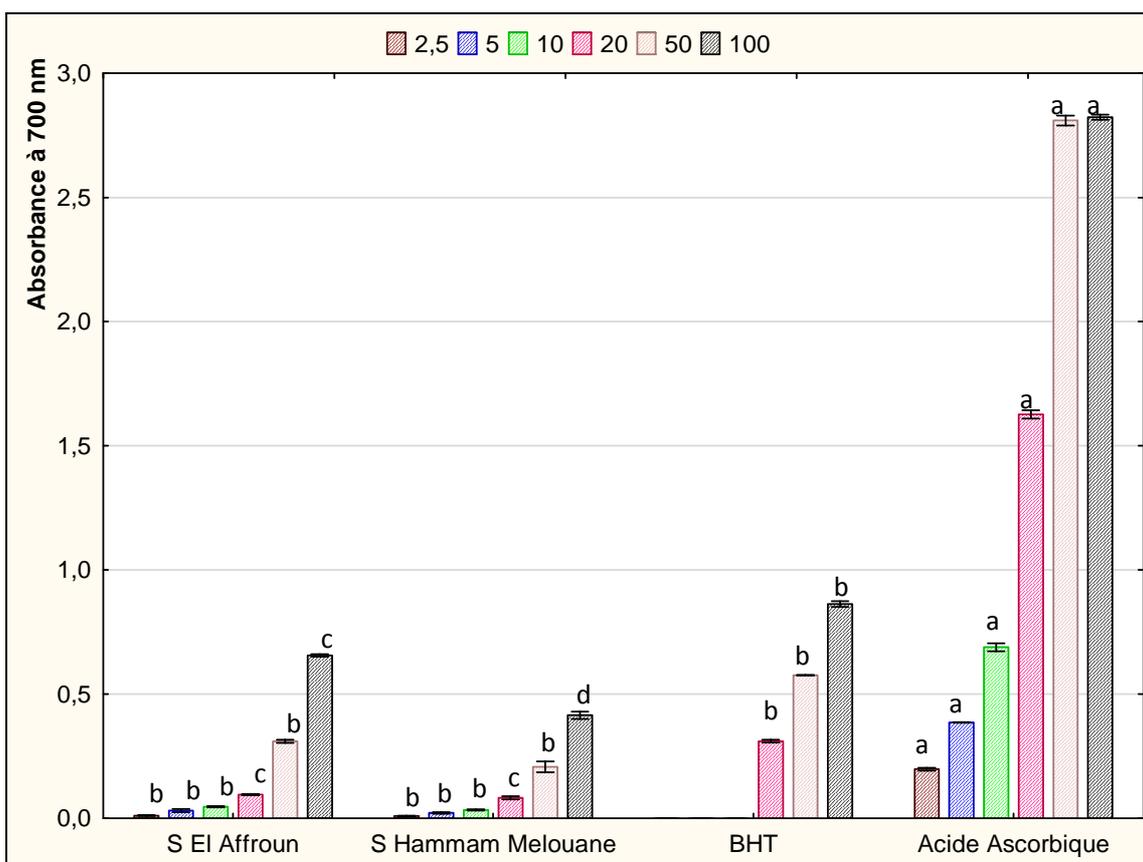
Le pouvoir réducteur des HE de sarriette et celui du BHT et d'acide ascorbique augmente en fonction de leurs concentrations.

Parmi les antioxydants de synthèse, la valeur maximale est significativement enregistrée pour l'acide ascorbique (3,05) pour une dose de 1000 mg/L. Alors que, pour les HE de sarriette, la capacité à réduire le fer ferrique pour la même concentration est de 0.153 et 0.147 pour les échantillons provenant d'El Affroun et de Hammam Melouane respectivement. Ces résultats confirment les faibles valeurs obtenus lors du test DPPH.

D'une façon générale, les HE des deux échantillons de sarriette étudiée montrent un faible pouvoir réducteur. L'absence ou la faible teneur en composés phénoliques peut partiellement expliquer cette faible capacité réductrice.

#### ➤ Cas des extraits

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits de sarriette, du BHT et de l'acide ascorbique exprimés par l'absorbance à 700 nm, sont présentés dans la figure 41.



**Figure 41: Pouvoir réducteur des extraits de *Calamintha nepeta*, du BHT et d'acide ascorbique.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

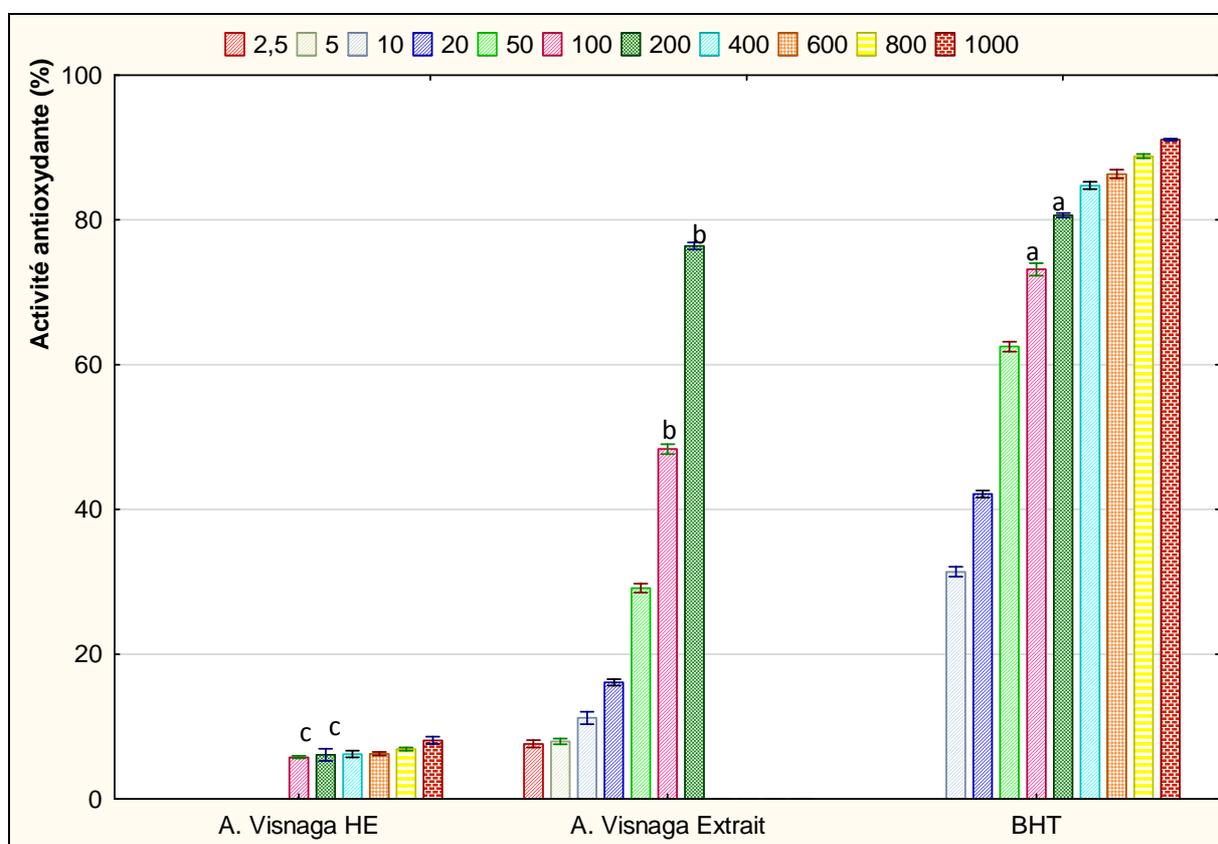
Nous remarquons que les deux extraits de sarriette montrent un pouvoir réducteur supérieur à ce celui des HE. L'extrait de sarriette provenant d'El Affroun montre un pouvoir réducteur meilleur que celui provenant de Hammam Melouane (0.656 et 0.415) respectivement pour une concentration de 100 mg/l. Ceci a été clairement constaté avec les valeurs précédemment enregistrés pour l'IC<sub>50</sub>. Cependant les antioxydants de synthèse montrent une

activité réductrice beaucoup plus importante surtout dans le cas d'acide ascorbique. Ce dernier a une absorbance de 2.823 à la concentration de 100 mg/l.

### 3.3. *Visnaga daucoides*

#### 3.2.1 Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Les valeurs de l'activité de piégeage obtenues pour l'huile essentielle et l'extrait de *Khella* comparées à celles du BHT sont reportées dans la figure 42.



**Figure 42: Activité de piégeage du radical DPPH de l'HE et de l'extrait de *Visnaga daucoides*, comparée à celle du BHT.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

L'activité du piégeage du radical DPPH de l'extrait est largement plus forte de celle de l'huile essentielle où pour une concentration de 100mg/l elle montre un pouvoir de piégeage de 5.22% contre 48.77% pour l'extrait.

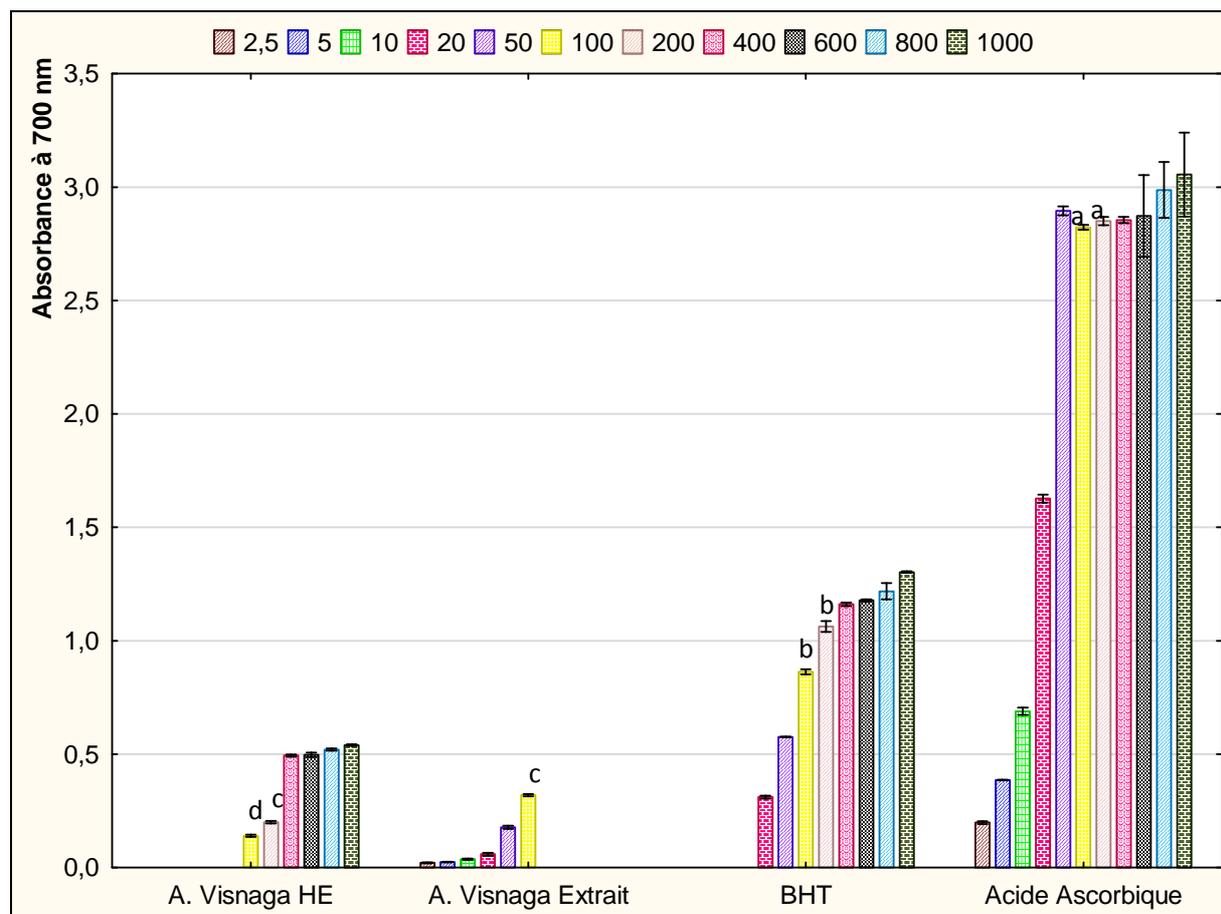
L'activité antioxydante de l'HE de khella reste faible même à de fortes concentrations (8.1 % pour 1000 mg/l) et ceci peut être expliqué par le fait que cette dernière est pauvre en monoterpènes oxygénés qui sont connus pour leur fort pouvoir antioxydant. **Soro et al. (2015)** ont signalé une activité biologique assez modérée pour l'HE de khella provenant du Maroc (Meknèse).

Pour une concentration de 200 mg/l les capacités antioxydantes de l'extrait se rapprochent de celles du BHT (77.13% contre 80.63% pour le BHT). Ce résultat est très proche de celui de **Kabouche et Jay (2011)** qui ont signalé une réduction du radical libre de 78.7% pour une concentration de 200µg/ml de l'extrait butanolique de khella.

Cependant l'activité de piégeage du radical DPPH de l'extrait éthanolique de khella reste relativement faible ( $IC_{50} = 111,2 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$ ) en la comparant à celle enregistré par **Amin et al., (2015)** qui ont travaillé sur l'extrait méthanolique de la même espèce ( $IC_{50} = 6 \mu\text{g/ml}$ ).

### 3.2.2 Mesure du pouvoir réducteur ferrique de Khella

Les résultats du pouvoir réducteur de l'huile essentielle et d'extrait de *Visnaga*, du BHT et d'acide ascorbique, exprimé par l'absorbance à 700 nm, sont illustrés sur la figure 43.



**Figure 43: Pouvoir réducteur de l'HE et d'extrait de *Visnaga daucoides*, du BHT et d'acide ascorbique.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

Le pouvoir réducteur de l'HE et d'extrait de l'espèce de *Visnaga daucoides* ainsi que celui du BHT et d'acide ascorbique augmente en fonction de leurs concentrations.

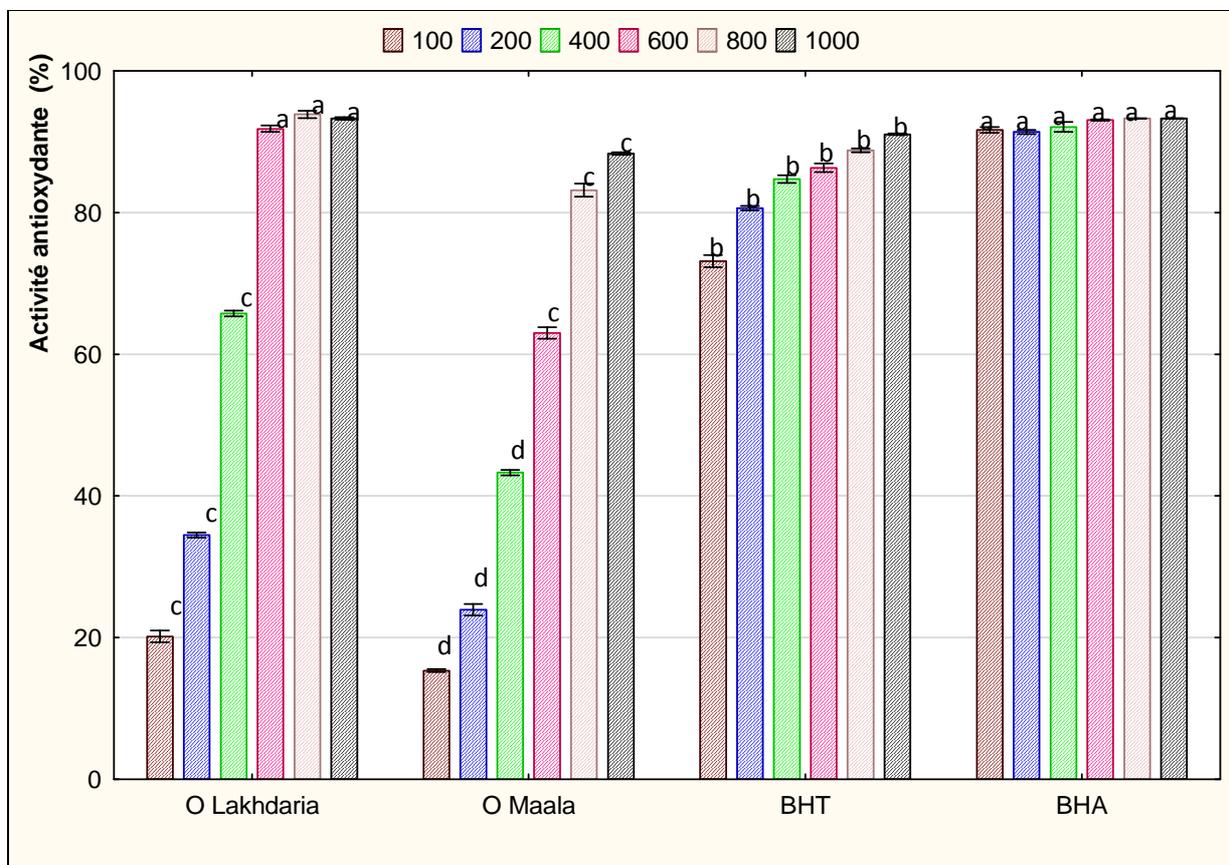
Nous remarquons, que le pouvoir réducteur de l'extrait de khella est supérieur à celui de son huile essentielle où pour une concentration de 100 mg/l d'extrait, ce dernier est de 0.320 alors qu'il ne dépasse pas 0.140 pour l'huile essentielle. Cependant la capacité réductrice de cet extrait reste relativement faible par rapport aux extraits des autres espèces étudiées et ceci peut être expliqué par le fait que ce dernier possède la plus faible teneur en polyphénols.

### 3.4. *Origanum floribundum*

#### 3.4.1 Activité de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

##### ➤ Cas des huiles essentielles

Les résultats de l'activité du piégeage du radical DPPH des HE d'origan comparés à celles du BHT et BHA sont illustrés dans la figure 44.



**Figure 44: Activité de piégeage du radical DPPH des HE d'origan et celle du BHA et BHT.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

D'après la figure 44, nous remarquons que les deux échantillons d'origan ont une forte activité de piégeage du radical DPPH et qui est comparable à celle du BHT et BHA et ceci pour les concentrations allant de 600-1000 mg/l.

Les fortes valeurs enregistrées pour ces deux échantillons nous ont permis de déterminer la concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres.

**Tableau 20: Valeurs d'IC<sub>50</sub> des HE d'origan et du BHT**

Echantillon	HE/substance	*IC <sub>50</sub> (µg/ml)
	Lakhdaria	250 ±1.5
<i>Origanum floribundum</i>	Maala	461.5±0.7
	BHT	27.80±0.3

\* : Concentration pour 50 % d'inhibition exprimées en (moyenne ± écart type).

L'échantillon provenant de la région de Lakhdaria s'est montré plus actif que celui de Maala et ceci pour toutes les concentrations. Ce constat est confirmé par les valeurs enregistrées pour l'IC<sub>50</sub>.

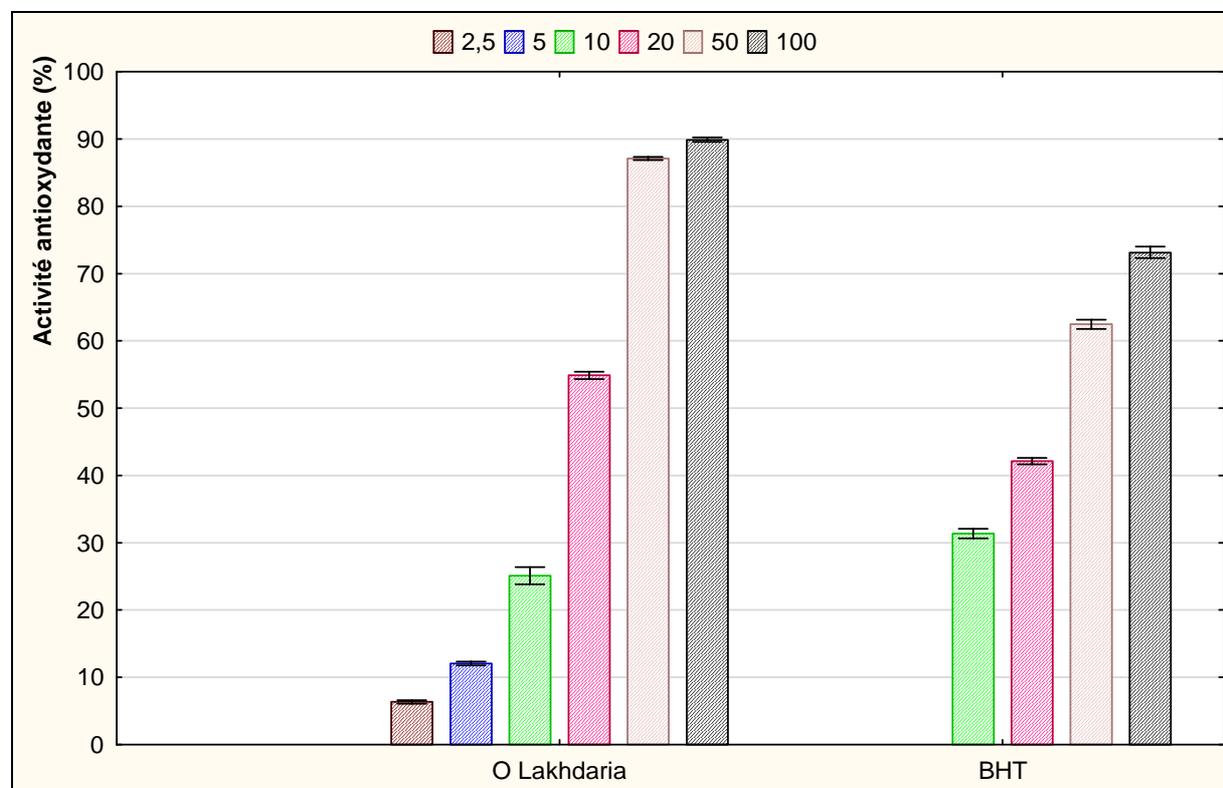
En se référant à la littérature, la valeur de l'IC<sub>50</sub> d'*Origanum floribundum* de Lakhdaria est supérieure à celle rapportée par **Hazzit et al. (2006)** qui ont travaillé sur la même espèce provenant de Hammam Mélouane et de Cherea. Les concentrations inhibitrices signalées par ces auteurs sont respectivement  $521.1 \pm 18.0$  et  $477.3 \pm 18.0$  mg/l.

**Oke et al. (2009)** attribuent les différences d'intensité de piégeage des radicaux libres par les HE à la composition chimique de ces dernières. De ce fait la forte activité de piégeage du radical DPPH de l'HE d'origan peut être expliquée par sa forte teneur en thymol qui est supposé jouer avec le carvacrol un rôle important dans l'activité biologique d'une HE (**Morteza-Semnani et Rostami (2006)** ; **Suhaj (2006)**; **Tepe et al., (2007)**).

Selon **Gabriel et al. (2013)**, l'activité antioxydante des HE dépend de plusieurs paramètres à savoir : la structure des molécules en relation avec leurs propriétés d'oxydoréduction et la présence des composés phénoliques comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol.

#### ➤ Cas de l'extrait

Les valeurs d'activités de piégeage du radical DPPH obtenues pour l'extrait d'origan de Lakhdaria et le BHT sont illustrées sur la figure 45.



**Figure 45: Activité de piégeage du radical DPPH d'extrait d'origan comparée à celle du BHT**

Nous remarquons que l'activité de piégeage du radical DPPH de l'extrait d'origan de Lakhdaria est supérieure à celle du BHT et ceci pour les concentrations allant de 20 à 100 mg/l. Ces résultats sont confirmés par les valeurs enregistrées pour l'IC<sub>50</sub>(Tableau 21).

**Tableau 21: Valeurs d'IC<sub>50</sub> d'extrait d'origan et du BHT**

Echantillon	Extrait /substance	*IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<i>Origanum floribundum</i>	Lakhdaria	18.5±0.2
	BHT	27.80±0.3

\* : Concentration pour 50 % d'inhibition exprimées en (moyenne ± écart type).

La forte activité antioxydante de l'extrait d'origan peut être expliquée par sa forte teneur en composés phénoliques. En effet ces derniers sont considérés comme d'excellents antioxydants

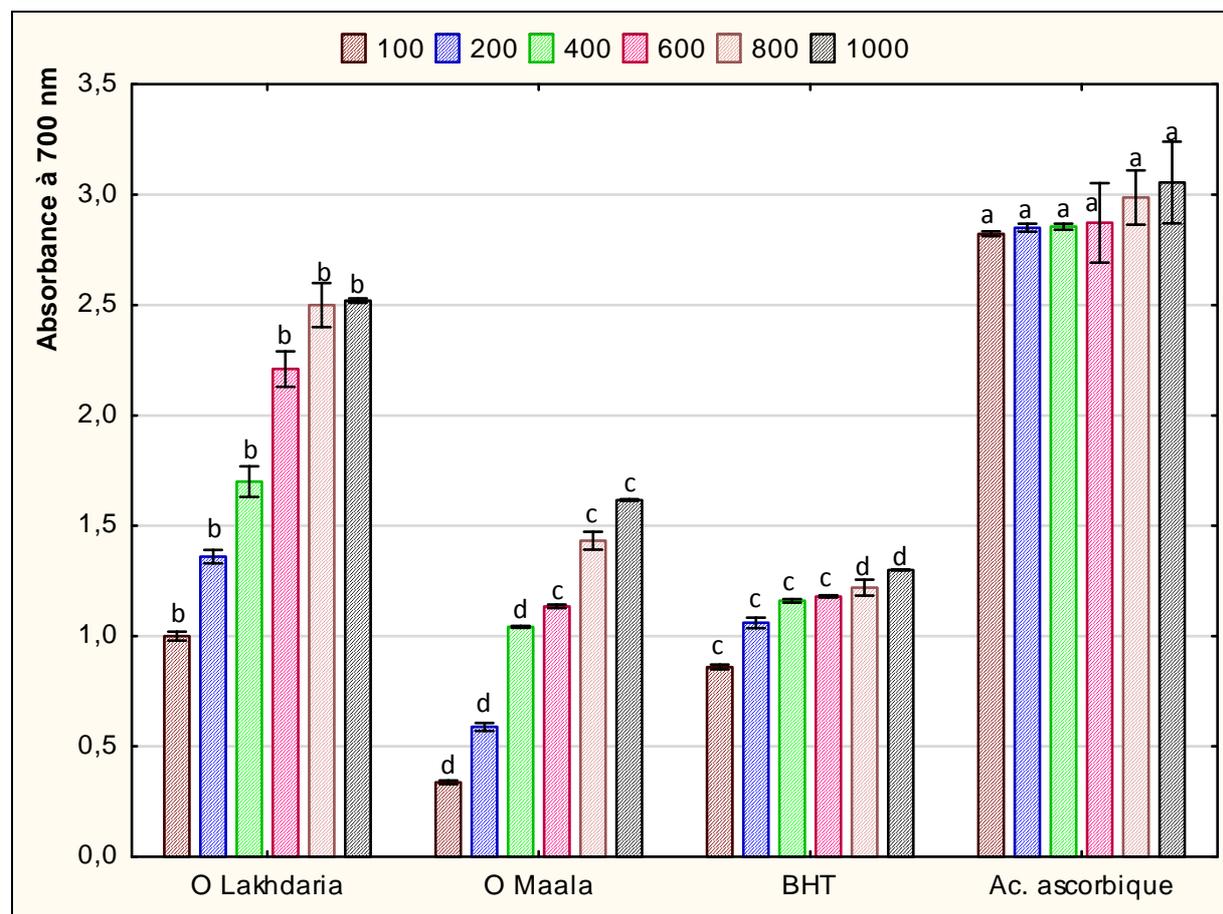
leurs permettent d'agir comme des agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et inhibiteurs de l'oxygène singulier et triplet (Pietta, 2000).

La capacité des flavonoïdes ainsi que des phénols totaux à piéger les radicaux libres s'explique par leurs structures chimiques comportant un nombre important d'atomes d'hydrogène, des groupements hydroxylés, des noyaux phényles qui seraient capables de capter les radicaux libres en démobilisant leurs électrons célibataires (Calliste *et al.*, 2001).

### 3.4.2 Mesure du pouvoir réducteur ferrique des espèces d'origan

#### ➤ Cas des huiles essentielles

Les résultats du pouvoir réducteur ferrique obtenus avec les HE d'origan comparés à celles du BHT et d'acide ascorbique sont illustrés dans la figure 46.



**Figure 46: Pouvoir réducteur des HE d'origan, du BHT et d'acide ascorbique.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

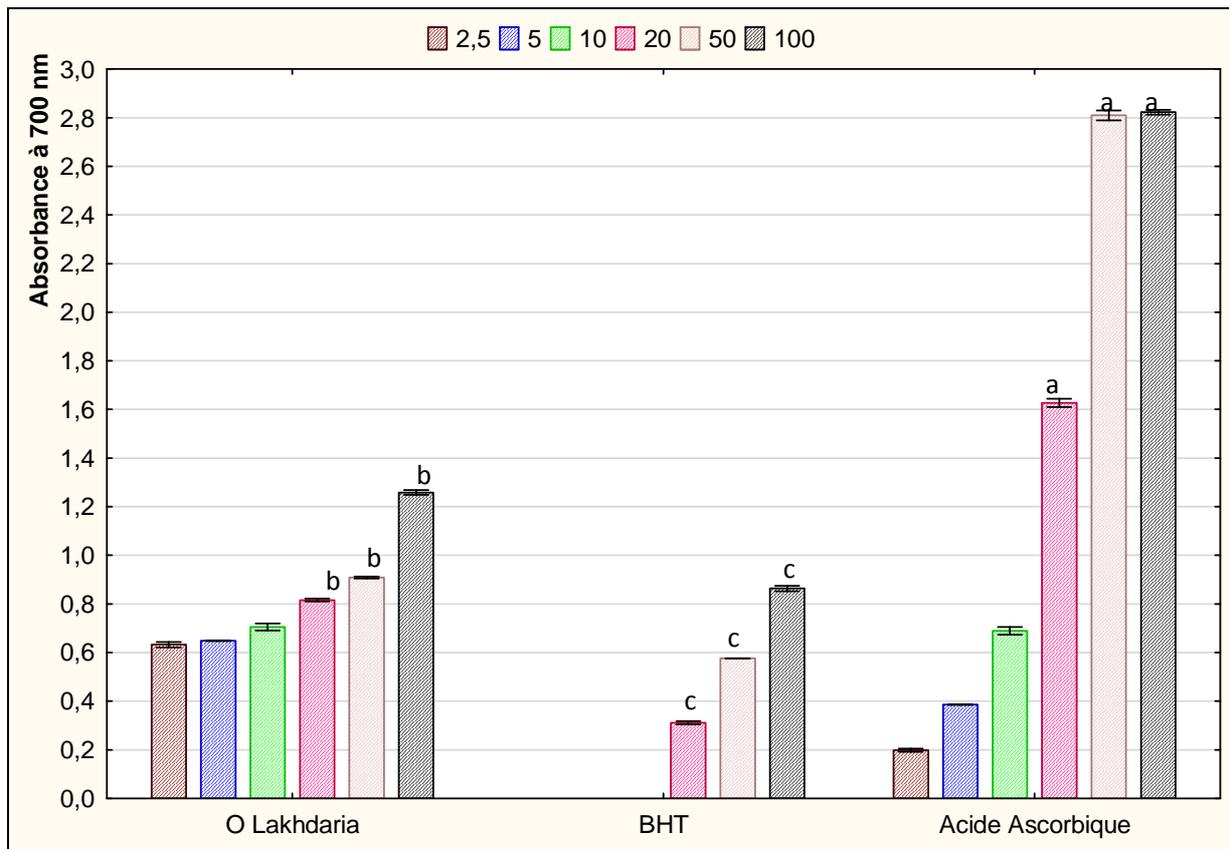
Parmi les deux espèces d'origan étudiées, celui de Lakhdaria enregistre le plus grand pouvoir réducteur. Ce résultat a été précédemment constaté avec les résultats du test DPPH et les valeurs enregistrés pour l'IC50.

La capacité réductrice la plus élevée est enregistrée pour l'acide ascorbique suivi par l'HE d'origan de Lakhdaria lui-même suivi par celui de Maala.

D'une manière générale, les deux échantillons d'origan montrent un fort pouvoir réducteur (2.52) et (1.61) à une concentration de 1000mg/l pour l'origan de Lakhdaria et de Maala respectivement. Ce dernier est supérieur à celui du BHT (1.30) à la même concentration. Ceci peut être expliqué par la forte teneur en composés phénoliques. Ces composés connus pour leur pouvoir réducteur sont appelés reductones. Ils sont capables de réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ), céder des électrons et transformer les radicaux libres actifs en des produits stables (**Dorman et al., 2004, Singh et al., 2006**).

#### ➤ Cas d'extrait

Les résultats du pouvoir réducteur obtenus pour l'extrait d'origan de Lakhdaria comparés à celles du BHT et d'acide ascorbique sont représentés dans la figure 47.



**Figure 47: Pouvoir réducteur d'extrait d'origan, du BHT et d'acide ascorbique.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

D'après la figure 47, nous remarquons que l'extrait d'origan provenant de la région de Lakhdaria a un pouvoir réducteur largement supérieur à celui du BHT pour toutes les concentrations. Cependant ce dernier reste inférieur à la capacité réductrice de l'acide ascorbique. Ce résultat confirme les valeurs trouvées pour l' $IC_{50}$ , où nous avons enregistré des  $IC_{50}$  de 18.5  $\mu\text{g/ml}$  pour l'extrait d'origan et 27.8  $\mu\text{g/ml}$  pour le BHT.

#### 4 Influence de la durée d'extraction sur l'activité antioxydante des huiles essentielles

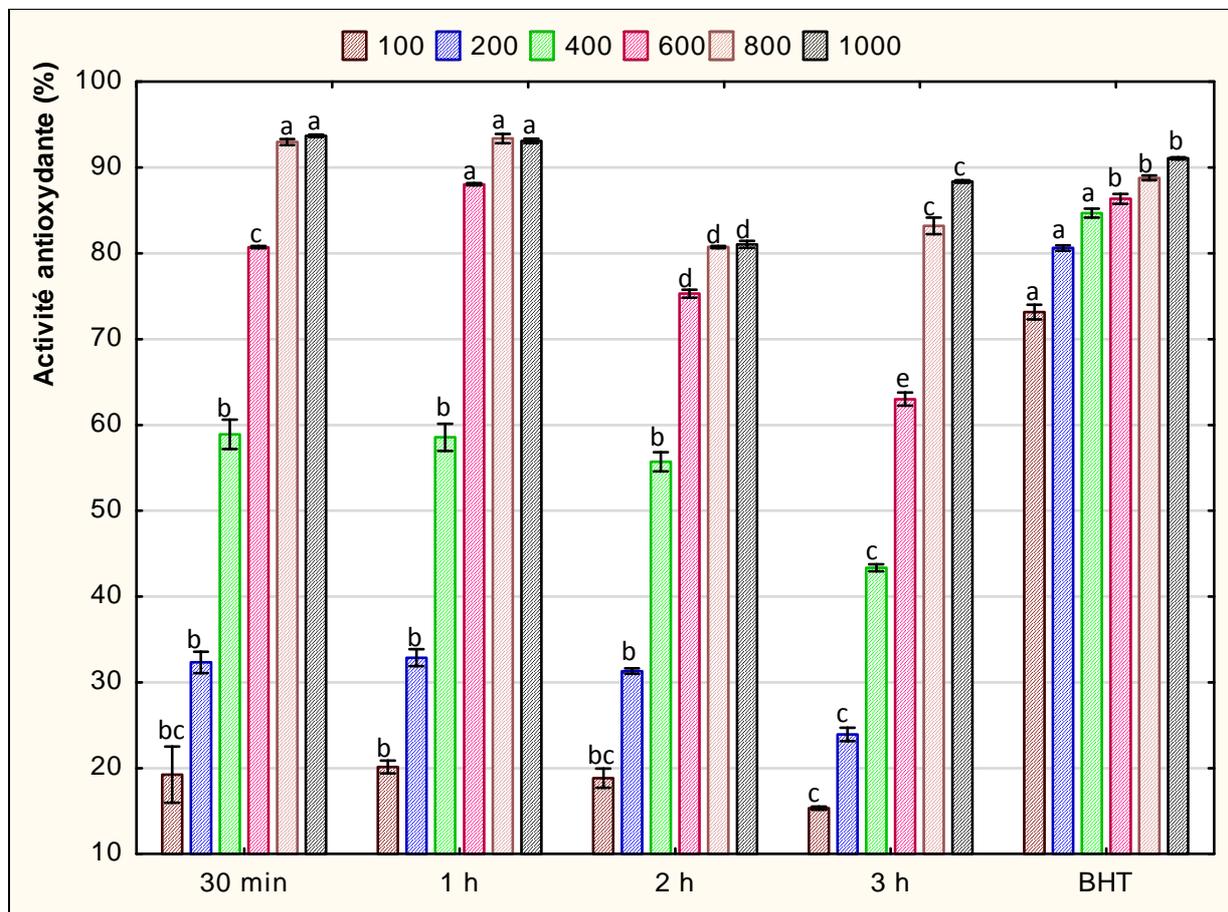
L'activité antioxydante des huiles essentielles d'origan de Maala extraites à différentes durées a été testée par les quatre tests suivant :

- ✓ Mesure du pouvoir de piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ;
- ✓ Activité d'inhibition du radical positif  $ABTS^{*+}$  ;

- ✓ Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique par le test TBAR ;
- ✓ Mesure du pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux.

#### 4.1. Activité d'inhibition du radical DPPH\*

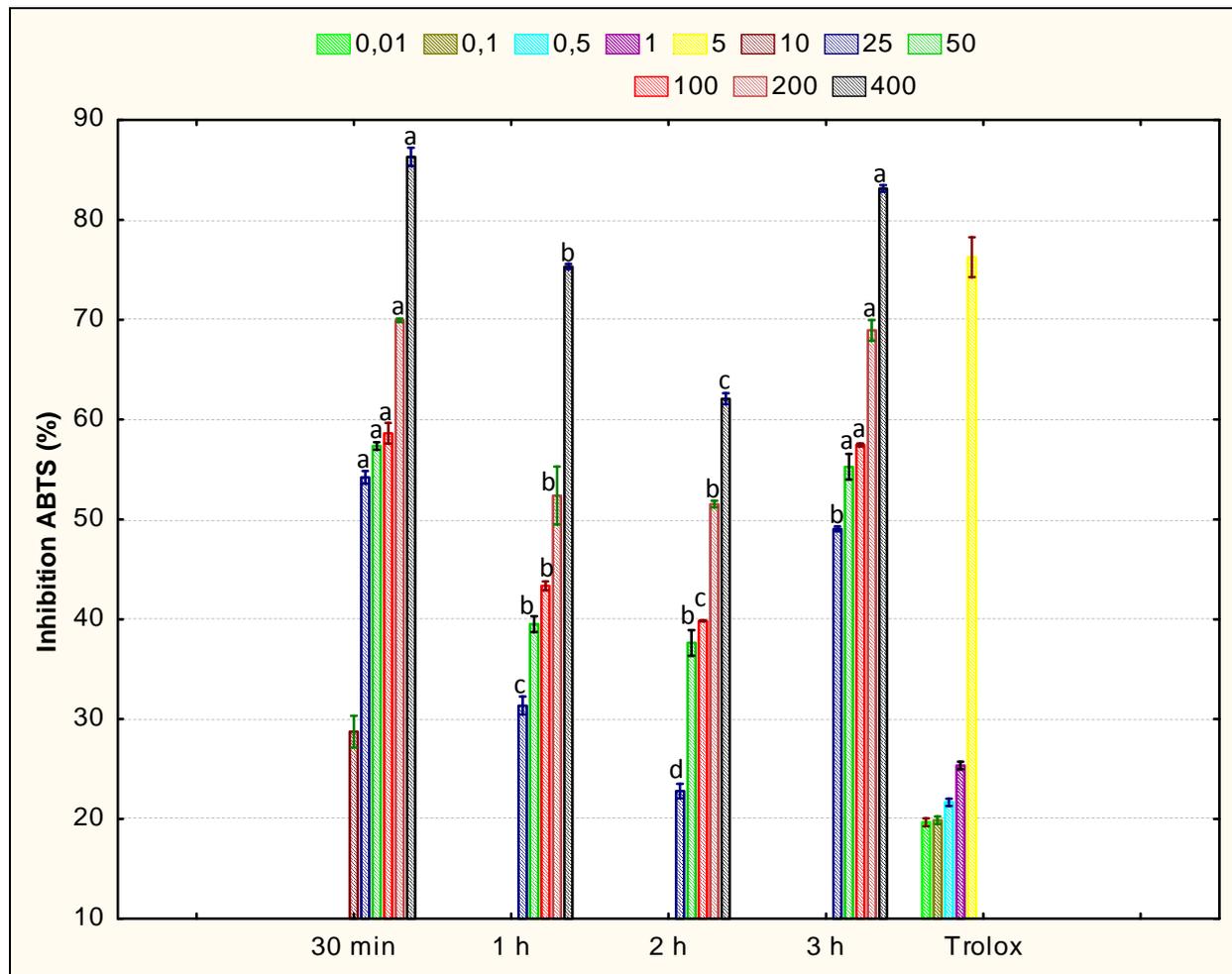
Les résultats du pouvoir d'inhibition (%) du radical DPPH\* par les différents échantillons d'huiles extraites pour différentes durées (Fig. 48) montrent que pour les concentrations élevées (600-1000 mg/L), les HE obtenues pour des durées de 30 min et 1 heure sont les plus efficaces, même par rapport à l'antioxydant de synthèse (BHT). Par contre pour les autres concentrations (100-400 mg/L) c'est ce dernier qui est le plus actif. Ces résultats sont contraires à ce qu'on attendait. En effet, les échantillons les moins riches en thymol se sont avérés les plus actifs.



**Figure 48: Activité (%) d'inhibition du radical DPPH par le BHT et les HE extraites à différentes durées (30 min, 1, 2 et 3 heures).** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

## **4.2. Activité d'inhibition du radical positif ABTS<sup>•+</sup>**

Pour le radical ABTS, l'échantillon extrait pour 30 min, et à un degré moindre celui extrait pour 3 h, s'est avéré le plus efficace pour toutes les concentrations (Fig. 49). Donc, le précédent résultat obtenu avec le radical DPPH se confirme ici. Néanmoins pour ce test l'antioxydant de synthèse testé est le Trolox (équivalent synthétique de la vitamine E) qui est connu pour être un antioxydant énergétique. Le Trolox nous a obligé à le tester pour des concentrations très faibles (de 0.01 à 5 mg/L seulement). En effet, pour une concentration de 5 mg/L il fournit une activité de 76.3% égale à celle de 400 mg/L de l'échantillon de 1h et supérieure à celle de l'échantillon de 2 h. Par ailleurs, pour cette même concentration du Trolox l'activité est supérieure à celles de tous les échantillons testés pour des concentrations inférieures ou égales à 200 mg/L.

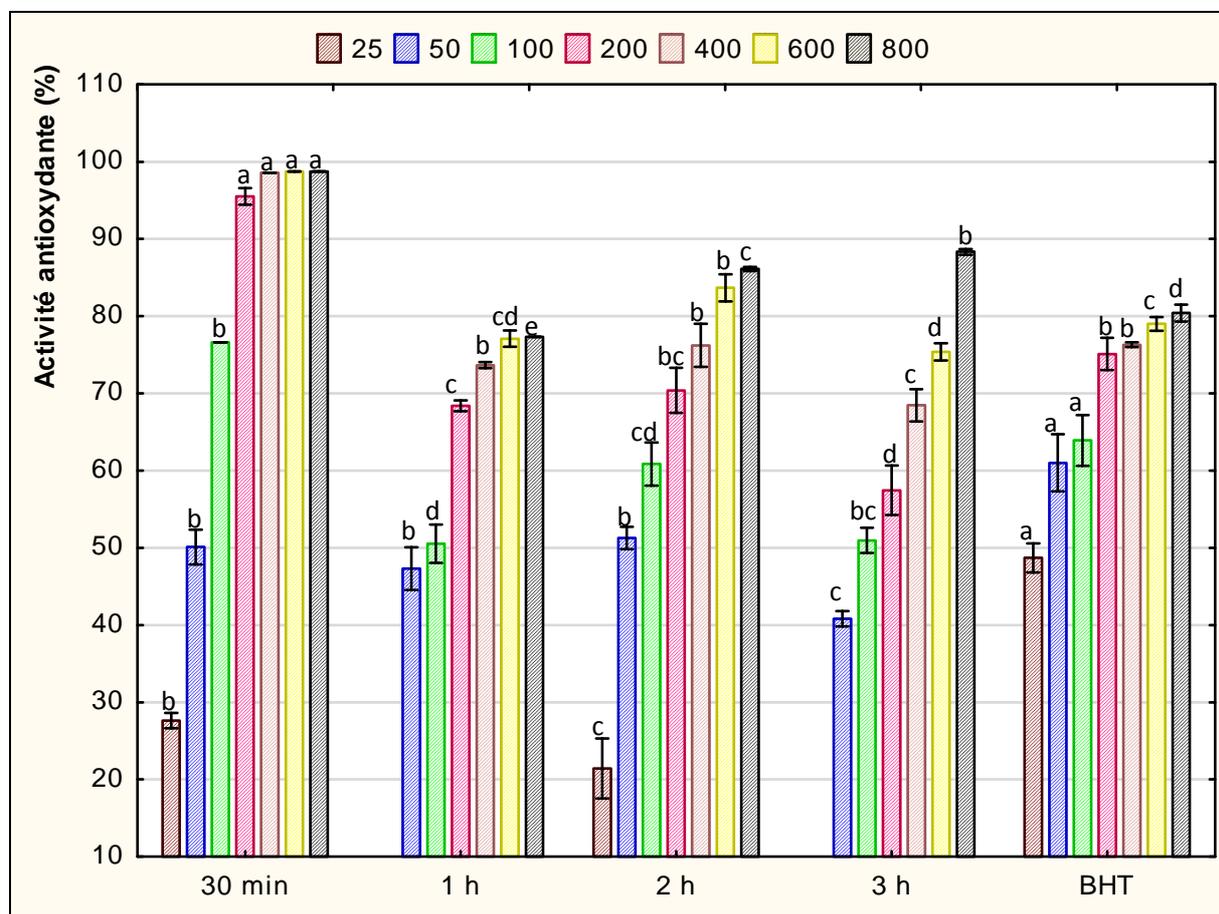


**Figure 49: Activité (%) d'inhibition du radical positif ABTS<sup>+</sup> par le Trolox et les huiles essentielles extraites pour différentes durées (30 min, 1,2 et 3 heures).** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

### 4.3. Activité d'inhibition de la peroxydation lipidique par le test TBARS

Le résultat du test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) (Fig. 50) montre que l'échantillon extrait pendant de 30 min est doué de la plus grande activité pour toutes les concentrations à l'exception des deux plus faibles (25 et 50 mg/L) où le BHT s'est montré plus actif. Ce résultat est quelque peu similaire à ceux obtenus avec les tests d'inhibition des

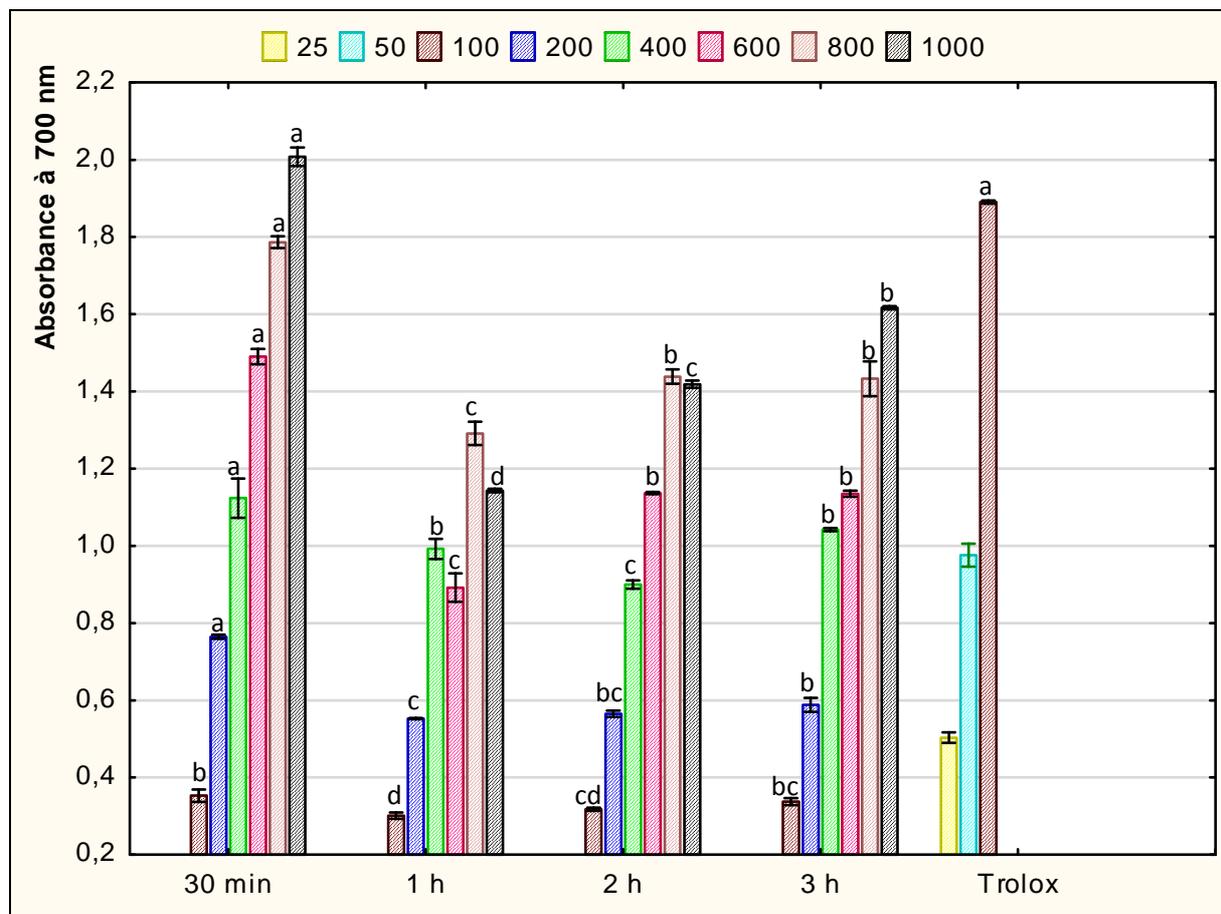
radicaux DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> où l'échantillon extrait pour une durée de 30 min a révélé l'activité la plus importante, particulièrement pour les concentrations relativement élevées.



**Figure 50: Activité (%) d'inhibition de la peroxydation lipidique par le BHT et les huiles essentielles extraites pour différentes durées.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.4. Pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux

A l'instar des autres tests, le pouvoir réducteur (Fig. 51) est dose-dépendant. Avec ce test les résultats précédents se confirment pour la durée de 30 minutes où le pouvoir réducteur est le plus important pour toutes les concentrations. Par ailleurs, l'échantillon extrait pendant 3 h a une activité appréciable. Le Trolox, utilisé comme témoin positif a montré une activité très importante, puisque pour une concentration de 100 mg/L, son activité est équivalente ou supérieure à celles de 1000 mg/L des échantillons des huiles essentielles.



**Figure 51: Pouvoir réducteur du fer ferrique en fer ferreux par le Trolox et les huiles essentielles extraites pour différentes durées.** Les valeurs dans la même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

#### 4.5. Concentrations inhibitrices de 50% des radicaux (IC<sub>50</sub>)

Les concentrations inhibitrices de 50% des radicaux des différents échantillons (Tableau 22) indiquent en général une meilleure activité de l'huile extraite pour une durée de 30 min, par rapport aux huiles extraites pour des durées plus longues. Cependant, les antioxydants de synthèse ont dans tous les cas montré une meilleure efficacité. Mais, l'IC<sub>50</sub> ne donne pas une idée complète sur l'efficacité d'un échantillon. En effet, comme nous l'avons relevé précédemment, pour des concentrations supérieures ou égales à 400 mg pour l'inhibition des TBARS et 600 mg/L pour le DPPH les huiles deviennent les plus actives et leur efficacité avoisine le 100%.

**Tableau 22: Concentrations inhibitrices (mg/L  $\pm$ écart type) de 50% des radicaux (IC<sub>50</sub>) du BHT, du Trolox et des huiles extraites pour différentes durées (30 min, 1h, 2 et 3h).**

Echantillons	30 min	1h	2h	3h	BHT	Trolox
DPPH	335 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	341 $\pm$ 2.3 <sup>c</sup>	358.9 $\pm$ 1.1 <sup>d</sup>	461.5 $\pm$ 0.7 <sup>e</sup>	27.8 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	ND
ABTS	23.06 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	190.91 $\pm$ 0.9 <sup>d</sup>	194.05 $\pm$ 0.6 <sup>e</sup>	33.98 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>	ND	2.82 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
TBARS	49.9 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	99 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	51.9 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	98.12 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	25.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	ND

Les valeurs dans la même ligne avec des lettres différentes sont significativement différentes ( $P < 0.05$ ).

## 5 Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE et des extraits

### 5.1. Activité antimicrobienne des HE des espèces étudiées

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des échantillons d'huiles et d'extraits testés a été faite sur des bactéries et des levures provenant de la collection du laboratoire de microbiologie du CRD-SAIDAL, ceci par la méthode des aromagrammes. Le pouvoir antimicrobien des substances testées est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par **Meena et Sethi(1994)** et **Ela et al., (1996)**. Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 4 classes :

- Fortement inhibitrice lorsque : diamètre de la zone d'inhibition  $\geq$  28 mm ;
- Modérément inhibitrice lorsque : 16 mm  $\leq$  diamètre de la zone d'inhibition < 28 mm;
- Légèrement inhibitrice lorsque : 10 mm  $\leq$  diamètre de la zone d'inhibition < 16 mm ;
- Non inhibitrice lorsque : diamètre de la zone d'inhibition < 10 mm.

Le tableau 23 représente les résultats du test d'antibiogramme des HE sur les souches testées.

**Tableau 23: Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) des HE d'origan, de sarriette et de germandrée**

<i>HE</i> <i>Souches</i>	<b>Origan Lakhdaria</b>	<b>Origan Maala</b>	<b>Sarriette El Affroun</b>	<b>Germandrée Boussaâda</b>	<b>Germandrée Kadiria</b>
<b><i>Bactéries Gram +</i></b>					
<i>Staphylococcus aureus</i>	79.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	45.05±1.71 <sup>b</sup>	40.66±0,57 <sup>c</sup>	35.3 ± 0.6 <sup>d</sup>	29.33±1.52 <sup>e</sup>
<i>Enterococcus faecium</i>	ND	ND	15.66±0.57 <sup>a</sup>	13.66±0.57 <sup>b</sup>	12±1 <sup>b</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	55.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	35.66±1.53 <sup>b</sup>	20±1 <sup>cd</sup>	22.0 ± 1.0 <sup>c</sup>	18±1 <sup>d</sup>
<b><i>Bactéries Gram-</i></b>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	22.17±1.2 <sup>b</sup>	10.33±0.57 <sup>c</sup>	R	R
<i>Escherichia coli</i>	34.7±1.7 <sup>a</sup>	29.79±2.26 <sup>b</sup>	16.33±0.57 <sup>c</sup>	14.66±0.57 <sup>c</sup>	13.33±1,15 <sup>c</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	42.2±0.7 <sup>b</sup>	19.66±1,52 <sup>c</sup>	14.7 ± 0.6 <sup>d</sup>	12.53±0.57 <sup>d</sup>
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	ND	ND	ND	13.66±0.57	11.66±1.15
<b><i>Levures</i></b>					
<i>Candida albicans</i>	52.7 ± 2.5 <sup>a</sup>	43.23±1.16 <sup>b</sup>	11.33±0.57 <sup>c</sup>	13.7 ± 0.6 <sup>c</sup>	R
<i>Saccharomyces cereviceae</i>	ND	ND	17.33±0.57 <sup>a</sup>	13.33±0.57 <sup>b</sup>	10.33±0.57 <sup>c</sup>

Les valeurs dans la même ligne avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

ND : non déterminé. R : Résistante

D'après les valeurs du tableau 26 et selon l'échelle citée par **Meena et Sethi (1994)** et **Ela et al., (1996)** les résultats obtenus peuvent s'interpréter comme suit :

➤ **Cas des bactéries Gram+**

Les HE *d'origanum floribundum* des deux régions ont montré des activités fortement inhibitrices sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*.

Les HE de *Calamintha nepeta* et de *Teucrium polium* ont manifesté des activités inhibitrices : fortes sur le *Staphylococcus aureus*, modérées sur *Bacillus subtilis* et légères sur *Enterococcus faecium*.

Parmi les bactéries gram+ testées, la souche *Staphylococcus aureus* s'est montrée la plus sensible envers les HE étudiées, tandis que *Enterococcus faecium* était la plus résistante.

Parmi les HE testées, celles de l'origan ont montrés les plus fortes activités inhibitrices envers l'ensemble des souches testées.

#### ➤ Cas des bactéries Gram-

L'HE d'*Origanum floribundum* de Lakhdaria a montré une forte activité inhibitrice sur l'ensemble des souches testées. Celle provenant de Maala a aussi une activité fortement inhibitrice sur la quasi-totalité des souches sauf pour *pseudomonas aeruginosa* où cette dernière était modérément inhibée.

L'HE de *Calamintha nepeta* s'est montré modérément inhibitrice sur *Escherichiacoliet Klebsiella pneumoniae* et légèrement inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Les HE de germandrée ont montré une activité légèrement inhibitrice sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bordetella bronchiseptica*, alors qu'elle n'a aucun effet sur *Pseudomonas aeruginosa*.

Parmi les bactéries Gram- testées, la souche *Klebsiella pneumoniae* s'est montrée la plus sensible envers les HE étudiées, alors que *Pseudomonas aeruginosa* était la plus résistante.

Les HE d'origan ont montrés les plus fortes activités inhibitrices sur l'ensemble des bactéries Gram- testées.

#### ➤ Cas des levures

Les HE d'*Origanum floribundum* ont une forte activité inhibitrice sur *Candida albicans*. L'HE de *Calamintha nepeta* a une activité modérément inhibitrice envers *Saccharomyces cereviceae* et légèrement inhibitrice sur *Candida albicans*.

L'HE de germandrée de Boussaâda a une activité légèrement inhibitrice sur les deux levures testées, alors que celle de Kadiria est sans effet inhibiteur sur *Candida albicans*.

D'après les résultats représentés dans le tableau 23, nous constatons que les HE d'origan ont les plus fortes activités antimicrobiennes, ceci peut s'expliquer par leurs richesse en phénols auquel on attribue généralement une forte action inhibitrice (Faleiro et al., 2005).

Le thymol qui est le composé majoritaire des deux espèces d'*Origanum floribundum* est considéré comme étant biocide, il provoque des perturbations au niveau de la membrane bactérienne et ceci s'accompagne de pertes d'ATP et d'ions potassium K<sup>+</sup> et enfin la mort de la

bactérie (Ultee et al., 1999 ; Knowles et al., 2005), cependant, il est probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique (Lahlou, 2004).

Rossi et al. (2007) ont testé l'effet antimicrobien de l'HE de *Calamintha nepeta* de Corse sur quatre souches bactériennes. Ils rapportent que *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus sensible à cette huile alors que *Pseudomonas aeruginosa* s'est montré la plus résistante, ce qui est en accord avec nos résultats.

Les travaux réalisés par Kabouche et al. (2005) montrent que *Bacillus subtilis* est résistante à l'HE de *Teucrium polium subsp. aurasiacum* alors que les bactéries Gram- montrent une grande sensibilité à cette huile ce qui n'est pas en accord avec nos résultats.

Selon Valero et Salmeron (2003) et Pibiri (2006), il est très difficile de faire une comparaison entre les résultats trouvés et ceux rapportés par la littérature et ceci en raison de : la nature du matériel végétal, son origine géographique, la saison de cueillette, le procédé d'extraction, la nature des souches testées, les méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne, les milieux de culture employés, la qualité des souches testées, etc. En effet la qualité des souches microbiennes est déterminante pour la valeur de l'essai, car celles-ci sont l'instrument de mesure dans la méthode de détermination de l'activité d'un produit antimicrobien (Fleurette et al., 1995).

D'une façon générale, ce que nous pouvons dire, c'est que les HE des trois espèces de lamiacées (Origan, Sarriette et Germandrée) possèdent une activité antimicrobienne à des degrés variables sur la majorité des espèces étudiées. Ceci est dû à leurs richesses en composés oxygénés. Cependant les HE d'origan qui sont riches en phénols sont les plus actifs. En effet les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools ( $\alpha$ -terpineol, 4-terpineol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les terpènes (Cosentino et al., 1999 ; Dorman et Deans, 2000).

Selon Chang et al. (2001) et Oussalah et al. (2007), le pouvoir antimicrobien des HE est en relation directe avec plusieurs paramètres à savoir : La nature des composés majoritaires, la concentration de ces composés, la nature et la structure des groupements fonctionnels et l'interaction probable entre les différents constituants (synergie).

*Staphylococcus aureus* s'est avérée la plus sensible des souches testées, cette sensibilité accrue est confirmée par les travaux de Özkan et al. (2003) ; Pibiri (2006) ; Kabouche et al. (2005).

*Pseudomonas aeruginosa* quant à elle s'est montrée la plus résistante des souches testées. Cette résistance est due à la capacité de celle-ci à former un biofilm. Ce dernier est une organisation complexe, composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se trouvent dans des états physiologiques spécifiques à leur situation. Ainsi, toute la population bactérienne n'est pas exposée simultanément et identiquement au produit (**Pibiri, 2006**).

Ainsi donc, et d'après les résultats trouvés on peut dire que les bactéries Gram+ sont plus sensibles que les Gram-, ce qui est en accord avec les travaux de **Cosentino et al. (1999)**; **De Billerbeck (2000)** ; **Hayouni et al. (2007)**. La faible sensibilité de ces dernières est à mettre en relation avec la présence d'une seconde membrane lipopolysaccharidique jouant un rôle de barrière vis-à-vis des HE (**Chao et al., 2000**). Tandis que les substances antimicrobiennes peuvent facilement détruire la membrane cytoplasmique des bactéries Gram+ et provoque ainsi la sortie du contenu cellulaire (**Shan et al., 2007**).

## 5.2. Comparaison de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'origan avec celle de son HE

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'origan provenant de Lakhdaria comparés à celles de son HE sont représentés dans le tableau 24.

**Tableau 24: Diamètre des zones d'inhibitions (en mm) de l'HE et d'extrait d'origan de Lakhdaria**

Souches microbiennes	<i>Origanum floribundum</i>	
	HE	Extrait
<i>Bacillus subtilis</i>	55,0 ± 1,0	23,0 ± 1,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	79,0 ± 1,0	34,7 ± 0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31,0 ± 1,0	22,3 ± 0,6
<i>Klebsiella pneumonia</i>	50,0 ± 2,0	11,7 ± 0,6
<i>Candida albicans</i>	52,7 ± 2,5	9,7 ± 1,1

D'après les valeurs représentés dans le tableau 24 et selon l'échelle citée par **Meena et Sethi (1994)** et **Ela et al., (1996)**, nous constatons que l'extrait d'*Origanum floribundum* de Lakhdaria a une activité fortement inhibitrice sur *Staphylococcus aureus*, modérément inhibitrice sur *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*, légèrement inhibitrice sur *Klebsiella pneumonia* et non inhibitrice sur *Candida albicans*.

Les HE d'origan se sont montrés plus actifs que les extraits éthanoliques, en effet la levure *Candida albicans* qui était très sensible à l'HE elle s'est montrée résistante à l'extrait. Cependant d'une façon générale l'extrait d'origan a un bon pouvoir antimicrobien envers la quasi-totalité des souches bactériennes. La bactérie Gram- *Pseudomonas aeruginosa* s'est montrée sensible à l'extrait d'origan ( $22,3 \pm 0,6$ ) alors que cette dernière a la réputation d'être très résistante à toute sorte d'agents antimicrobiens et antibiotiques (Pibiri, 2006) et le traitement de telles bactéries nécessite des concentrations considérables d'agents antimicrobiens (De Feo et al., 2003).

L'activité antibactérienne de l'extrait d'origan serait probablement attribuée à sa richesse en composés phénoliques ( $250 \pm 3.7$  de phénols totaux et  $180 \pm 0.9$  de flavonoïdes). Plusieurs auteurs ont rapportés que les composés phénoliques de certaines plantes inhibent la prolifération de plusieurs microorganismes pathogènes (Kim et al., 2005; Shan et al., 2007). Cette activité dépend essentiellement de la concentration en ces composés (Furneri et al., 2002). D'après Taguri et al. (2004) la sensibilité des bactéries aux polyphénols dépend de l'espèce bactérienne et de la structure des composés phénoliques.

## 6 Influence de la durée d'extraction sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Origan

Afin d'étudier l'influence de la durée d'extraction sur l'activité antimicrobienne des HE d'origan de Maala nous avons réalisé une étude qualitative et quantitative des échantillons d'HE extraites à différentes durées (30 min, 1h, 2h et 3h) sur une levure (*Candida albicans*), deux bactéries à Gram + (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) et une bactérie à Gram - (*Escherichia coli*).

### 6.1. Etude qualitative de l'activité antimicrobienne

Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibitions des HE d'origan extraites à différentes durées en utilisant le test de l'aromatogramme sont représentés dans le tableau 25.

**Tableau 25: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des HE d'Origan.**

Souches	30 min	1 h	2 h	3h
<i>Staph. Aureus</i>	49,79±2,8 <sup>a</sup>	42,14±2,57 <sup>b</sup>	39,28±1,84 <sup>b</sup>	45,05±1,71 <sup>ab</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	39,50±1,47 <sup>a</sup>	32,8±0,83 <sup>bc</sup>	31,64±0,34 <sup>c</sup>	35,66±1,53 <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i>	23,56±1,94 <sup>b</sup>	23,68±2,02 <sup>b</sup>	26,20±0,53 <sup>ab</sup>	29,79±2,26 <sup>a</sup>
<i>Candida albicans</i>	45,61±1,21 <sup>a</sup>	27,60±0,67 <sup>b</sup>	27,50±0,74 <sup>b</sup>	43,23±1,16 <sup>a</sup>

Les valeurs dans la même ligne avec des lettres différentes sont significativement différentes (P<0.05).

Le test d'aromatogrammes a révélé que sur l'ensemble des souches testées, la bactérie Gram- (*E.coli*) a été la moins sensible à toutes les huiles et, particulièrement à celles moins riches en thymol (30 min et 1 h). Pour toutes les autres bactéries, les huiles extraites pendant 30 min et 3 h, c'est-à-dire la moins riche et la plus riche en thymol, ont été les plus efficaces. Ce résultat suggère que l'efficacité n'est pas liée uniquement à la teneur de ce composé auquel on attribue, généralement, un rôle majeur dans l'activité biologique des huiles qui le contiennent.

## 6.2. Etude quantitative de l'activité antimicrobienne

Afin de confirmer les résultats trouvés précédemment dans l'étude qualitative, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides et fongicides (CMB/ CMF) des différents échantillons d'HE d'origan vis-à-vis des souches microbiennes sensibles.

Les valeurs des CMI, CMB/CMF sont représentées au tableau 26.

**Tableau 26: Concentrations minimales inhibitrices, bactéricides et fongicides des huiles extraites pour différentes durées.**

Souches	N° ATCC	Gram	30 min		1h		2h		3h	
			CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF	CMI	CMB/CMF
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	0,125	0.125	0,5	0.5	0,5	0.5	0,125	0.25
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	0,5	0.5	0,5	0.5	0,5	0.5	0,5	0.5
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	0,5	0.5	0,5	0.5	0,5	0.5	0,5	0.5
<i>Candida albicans</i>	24433		0,25	0.5	0,5	0.5	0,5	0.5	0,25	0.25

L'ensemble des souches testées ont subi une action bactériostatique et bactéricide ou fongicide à des concentrations différentes. Les valeurs de CMI et CMB/CMF se situent entre 0.125% et 0.5%. La concentration minimale bactéricide et /ou fongicide est souvent égale ou plus élevée que la CMI. Les résultats de la CMI font apparaître une meilleure efficacité des huiles de 30 min et 3 heures pour toutes les souches microbiennes. En effet les plus faibles valeurs de CMI sont enregistrées pour ces deux échantillons ce qui confirment les résultats trouvés pour le test d'aromatogramme.

La sensibilité de *Staphylococcus aureus* à tous les échantillons est confirmée avec les valeurs de CMB les plus faibles.

En conclusion, d'après les résultats d'activités antimicrobienne et antioxydante des HE d'origan extraites à différentes durées on peut dire que la distillation prolongée est nécessaire pour connaître la composition chimique tant qualitative que quantitative la plus complète que possible d'une plante. L'activité biologique d'une huile dépend beaucoup du temps d'extraction, de sa composition chimique, de la nature de la plante et du matériel biologique sur lequel elle sera appliquée. En effet, l'activité antioxydante de l'huile essentielle de sauge extraite durant 30 min, 1h, 2 et 3 h a donné des résultats différents des nôtres, puisqu'elle variait beaucoup d'une méthode d'évaluation à une autre (Miguel et al., 2011). Pour leur part, Zheljzkov et al., (2012) rapportent qu'il n'y a aucun changement significatif dans l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles d'origan extraites à différentes durées.

## 7 Activité anti-inflammatoire des HE d'origan et de germandrée

L'activité anti-inflammatoire évaluée par la méthode enzymatique montre que les huiles essentielles d'origan de Lakhdaria et de germandrée de Boussaâda possèdent des activités d'inhibition de la 5-lipoxygénase (Tableau 27). L'huile essentielle d'*Origanum floribundum* est plus active que celle d'*Origanum vulgare* ( $IC_{50} = 264.2 \mu\text{g/mL}$ ) (Albano et al., 2012). L'HE de cette dernière est différente de la nôtre dans sa composition; elle est moins riche en thymol(14%) et plus riche en  $\gamma$ -Terpinène (49%).Cependant notre huile reste moins active que l'acide nordihydroguaiaretique (NDGA) utilisé comme témoin positif.

Sosa et al., (2001) et Kang et al., (2008) ont signalé que les sesquiterpènes sont connus pour leurs activités anti-inflammatoires élevées.

**Tableau 27: L'activité anti-inflammatoire de NDGA et des HE exprimé en  $IC_{50}$**

HE/substance	* $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>T.polium</i> subsp. <i>capitaum</i> Boussaâda	482.52±0.73
<i>O.floribundum</i> Lakhdaria	125.7±7.3
NDGA	63.4±5.1

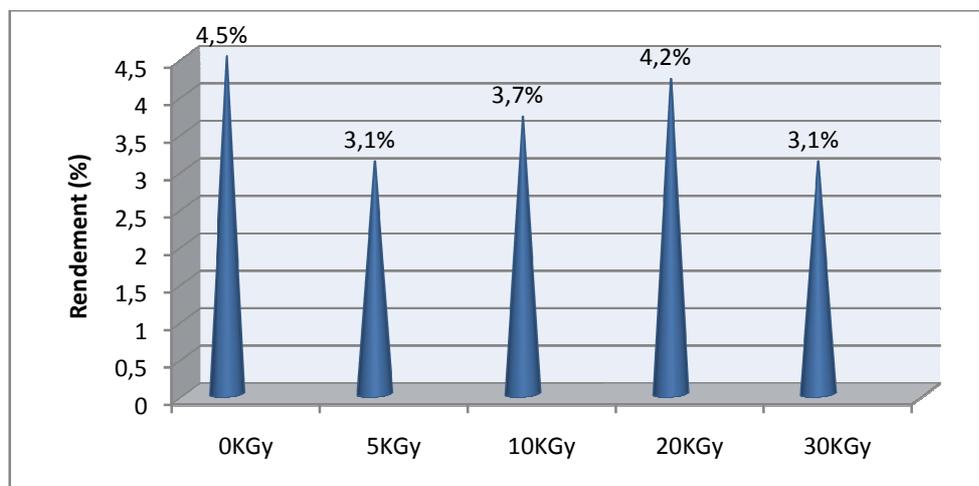
\* : Concentration pour 50 % d'inhibition exprimées en (moyenne ± écart type).

## 8 Etude de l'effet de l'irradiation sur les huiles essentielles d'*Origanum floribundum*

Dans le but d'étudier l'influence de l'irradiation par les rayonnements gamma sur le rendement et la composition chimique des HE d'origan nous avons irradié l'espèce avec les différentes doses (0 kGy, 5 kGy, 10 kGy, 20 kGy et 30 kGy).

### 8.1.Effet de l'irradiation sur le rendement en HE

Pour les différentes doses d'irradiation les rendements en HE d'*Origanum floribundum* sont représentés dans la figure 52.



**Figure 52: Rendements d'extraction en HE d'origan traité à différentes doses.**

Nous remarquons que le meilleur rendement a été enregistré pour l'HE d'origan non irradié (4.5 %) suivi de près par celle d'origan irradié à 20 kGy (4.2%).

Pour les autres doses de traitement (5 kGy, 10 kGy et 30 kGy) les quantités d'HE extraites sont inférieures à celle de l'origan non traitée. Les rayonnements gamma causent des modifications au niveau des membranes cellulaires des feuilles ce qui modifie la quantité d'huile extraite (Dhanya et al., 2011). Cependant les résultats trouvés ne rejoignent pas ceux de Thiago et al., (2013). Ces auteurs ont enregistré une quantité plus grande en HE de feuilles d'*Echinodorus macrophyllus* irradié par rapport à celle non-irradié.

Fatemi et al., (2015) quant à eux n'ont pas signalé une différence de rendement en HE de *Zataria multiflora* Boiss irradiée et non-irradiée.

## 8.2. Effet de l'irradiation sur la composition chimique

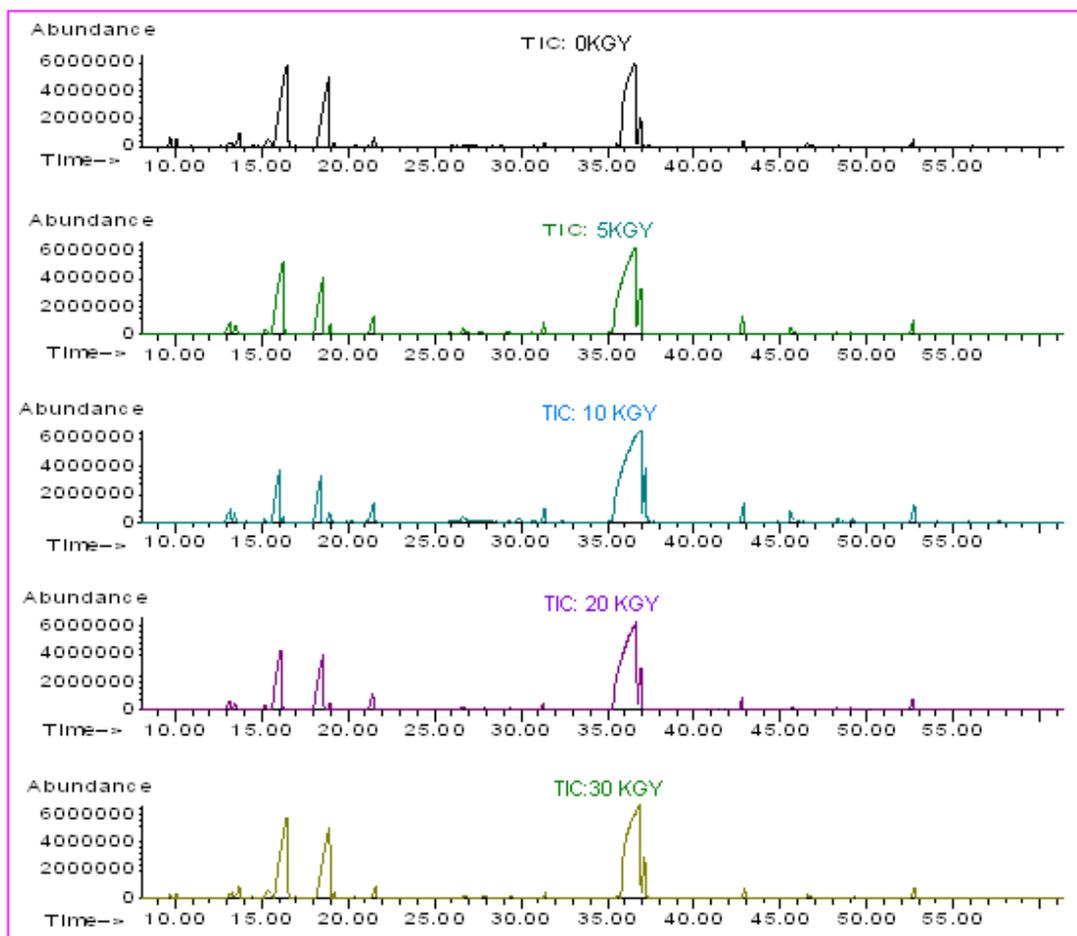
Les résultats de l'identification semi-quantitative par CG et CG/SM des composés chimiques des huiles essentielles d'*Origanum floribundum* irradiée à différentes doses sont représentés dans le tableau 28 et les chromatogrammes sont illustrés dans la figure 53.

**Tableau 28: Composition (%) des origans irradiés à différentes doses (0, 5, 10, 20 et 30 kGy)**

N°	Composés	IR	Origans irradiés				
			0 kGy	5kGy	10kGy	20kGy	30kGy
1	Isovaleric acid	827	t	-	-	-	t
2	(E)-2-Hexenal	853	t	-	-	-	t
3	3-Heptanone	890	t	t	t	t	t
4	Tricyclene	923	t	-	-	t	t
5	$\alpha$ -Thujene	928	0.8	t	t	t	0.3
6	$\alpha$ -Pinene	936	0.6	0.1	t	0.1	0.3
7	Camphene	951	0.1	t	t	t	t
8	Sabinene	973	t	-	-	-	t
9	$\beta$ -Pinene	978	0.2	t	t	t	0.1
10	1-Octen-3-ol	981	0.8	1.8	1.8	1.2	0.8
11	3-Octanone	985	0.1	0.1	0.1	0.6	0.3
12	$\beta$ -Myrcene	990	1.7	1.0	0.8	0.4	1.0
13	3-Octanol	993	t	0.1	0.1	t	0.1
14	$\alpha$ -Phellandrene	1004	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
15	$\delta$ -3-Carene	1011	0.1	t	t	t	0.1
16	$\alpha$ -Terpinene	1017	0.7	0.9	0.3	0.7	1.4
17	p-Cymene	1024	<b>25.2</b>	<b>17.2</b>	<b>8.0</b>	<b>12.6</b>	<b>19.6</b>
18	Limonene	1029	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2
19	$\beta$ -Phellandrene	1030	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
20	1,8-Cineole	1032	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1
21	cis- $\beta$ -Ocimene	1038	0.1	t	t	0.1	0.1
22	trans- $\beta$ -Ocimene	1048	t	t	t	0.1	0.1
23	$\gamma$ -Terpinene	1060	<b>20.6</b>	<b>11.6</b>	<b>7.3</b>	<b>13.4</b>	<b>17.8</b>
24	cis-Sabinene hydrate	1067	0.3	0.7	0.8	0.6	0.4
25	1-Nonen-3-ol	1087	t	0.1	0.1	0.1	0.1
26	$\alpha$ -Terpinolene	1089	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
27	p-Cymenyl	1090	t	t	t	0.1	0.1
28	trans-Sabinene hydrate	1098	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
29	Linalool	1100	1.0	2.0	2.5	2.0	1.3
30	Borneol	1167	t	0.2	0.2	0.1	0.1
31	4-Terpineol	1177	0.2	0.7	0.7	0.4	0.2
32	p-Cymen-8-ol	1184	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
33	$\alpha$ -Terpineol	1190	0.2	0.5	0.6	0.4	0.3
34	cis-Dihydrocarvone	1201	t	t	-	t	0.1
35	Thymol methylether	1234	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
36	Carvacrol methylether	1243	0.3	0.9	1.0	0.6	0.4
37	Thymoquinone	1260	t	t	t	t	t
38	Thymol	1290	<b>37.6</b>	<b>45.9</b>	<b>59.8</b>	<b>51.1</b>	<b>45.6</b>
39	Carvacrol	1300	<b>3.3</b>	<b>5.2</b>	<b>5.4</b>	<b>4.6</b>	<b>3.7</b>
40	$\alpha$ -Copaene	1376	t	t	t	t	t

41	$\beta$ -Caryophyllene	1420	0.4	1.7	1.7	1.1	0.8
42	$\beta$ -Gurjunene	1426	t	-	t	-	-
43	$\alpha$ -Bergamotene	1435	t	t	t	t	t
44	Aromadendrene	1441	t	t	t	t	t
45	$\alpha$ -Humulene	1453	t	0.1	0.1	0.1	0.1
46	(E)- $\beta$ -Farnesene	1490	t	0.1	0.1	0.1	t
47	$\alpha$ -Muuroolene	1499	t	t	t	t	t
48	$\beta$ -Bisabolene	1508	0.1	0.2	0.3	0.2	0.1
49	$\gamma$ -Cadinene	1514	t	0.1	0.1	0.1	0.1
50	$\delta$ -Cadinene	1523	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1
51	Spathulenol	1575	0.1	0.1	0.1	0.1	t
52	Caryophyllene oxide	1581	0.6	1.4	1.7	1.2	1.0
53	Palmitic acid	1982	t	t	t	t	-
Total (%)			96.4	93.8	95.1	93.3	97.4
Monoterpènes			51	31.5	17.1	28.2	41.5
Monoterpènes oxygénés			43.2	56.6	71.5	60.1	52.4
Sesquiterpenes			0.6	2.2	2.6	1.8	1.2
Sesquiterpenes oxygenés			0.7	1.4	1.8	1.3	1.0
Autres			0.9	2.1	2.1	1.9	1.3

Composés classés par ordre d'élution par rapport à la colonne HP 5MS ; IR= indices de rétentions relatifs à la série de n-alcanes C<sub>7</sub>-C<sub>25</sub> ; t=trace (<0.1%) ; Identification : IR : par comparaison des indices de rétention calculés par rapport à ceux de la bibliographie, MS : comparaison des spectres de masses par rapport à ceux de la bibliographie et à ceux fournis par la banque de spectres informatisée (Wiley 7 et NIST 2005). Quantification des teneurs relatives (%) des composés en GC-FID.



**Figure 53: Chromatogrammes successifs des huiles irradiées à différentes doses (0, 5, 10, 20 et 30 kGy)**

L'analyse par CG et CG/SM des HE d'*Origanum floribundum* irradiée à différentes doses a permis l'identification de 53 composés correspondant à des teneurs de 96.4%, 93.8%, 95.1%, 93.3% et 97.4% de l'ensemble des HE injectées respectivement pour les doses (0 kGy, 5kGy, 10kGy, 20kGy et 30kGy). Les composés monoterpéniques et surtout les monoterpènes oxygénés constituent la quasi-totalité des HE.

D'après les résultats obtenus nous constatons que l'irradiation par les rayonnements gamma influe quantitativement et non qualitativement sur la composition chimique des HE d'origan. Ce même résultat a été enregistré auparavant par **Zantar et al., (2015)** qui ont travaillé sur la composition chimique des HE de *Thymus vulgaris* et *Mentha pulegium* irradiées à

différentes doses (10 kGy, 20 kGy et 30 kGy). Cependant quelques composés à l'état de traces (sabinene, carvone,  $\beta$ -Gurjunene, etc.) ne sont pas présents dans tous les échantillons.

Cette influence quantitative et surtout enregistrée pour les quatre composés majoritaires présents dans tous les échantillons d'HE (tableau 29).

**Tableau 29: Comparaison des teneurs (%) des composés majoritaires des HE d'origan irradié**

Doses Composés	0 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	30 kGy
p-Cymene	25.2	17.2	8.0	12.6	19.6
$\gamma$ -Terpinene	20.6	11.6	7.3	13.4	17.8
Thymol	37.6	45.9	59.8	51.1	45.6
Carvacrol	3.3	5.2	5.4	4.6	3.7

Nous remarquons que la teneur en hydrocarbures monoterpéniques est plus élevée pour l'échantillon d'origan non irradié, alors que les monoterpènes oxygénés sont présents en quantités plus grandes dans les échantillons ayant subis le traitement d'irradiation.

Nous constatons que l'irradiation a fait augmenter la teneur du composé principale qui est le thymol. Ce dernier fait partie des molécules des HE présentant les plus fortes activités antioxydantes (**Gabriel et al.2013**). En effet, si nous essayant de corrélérer l'activité antioxydante des huiles essentielles avec leurs compositions chimiques ; des études ont montré qu'une forte teneur en composés monoterpéniques réduit l'activité de piégeage des radicaux libres et un effet inverse est observé en présences des composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol (**Aidi Wannas et al.,2010**). Cependant cette augmentation n'est pas proportionnelle aux doses d'irradiation, la teneur la plus élevé en thymol est enregistré pour l'échantillon irradié à 10 kGy.

**Machhour et al., 2011** ont montré aussi que l'irradiation affecte quantitativement et non qualitativement la composition chimique de l'HE de *Mentha peperita* irradiée à des doses allant de 0.5 à 2.66 KGy.

**Antonelli et al., (1998)** ont constaté que les rayonnements gamma augmentent significativement la quantité du linalol dans l'HE de basilic irradié. Pour notre HE le linalol fait partie des composés minoritaire et la teneur la plus élevé de ce dernier est enregistré pour l'échantillon irradié à 10 kGy.

D'un autre côté, **Haddad et al., (2007)** et **Seo et al., (2007)** ont trouvé que la composition chimique n'est pas affectée par le traitement d'irradiation gamma.

Cette différence dans les résultats obtenus par ces auteurs peut être expliqué par le fait que l'effet de l'irradiation sur la composition chimique dépend des doses et de la durée d'irradiation, du type de la plante et du mode d'extraction (**Haddad et al., 2007**). Ces auteurs rajoutent aussi que les mêmes composés peuvent être affecté différemment selon l'espèce étudiée.

Concernant l'activité biologique des plantes irradiées ; **Pèrez et al., (2011)**, n'ont pas enregistré une différence significative dans la teneur en composés phénoliques et le pouvoir antioxydant de l'extrait l'origan irradiée à 30 kGy et celui non-irradié. **Fatemi et al., (2015)**, à leurs tours ont constaté que l'irradiation gamma n'a pas affecté l'activité antimicrobienne de l'HE de *Zataria multiflora*.

**Aouidi et al., (2011)**, ont traité les feuilles d'olive par les rayonnements gamma et d'après les résultats obtenus ont conclu que ce traitement améliore la qualité microbiologique des feuilles sans altéré leurs teneurs en composés phénoliques ainsi que leurs propriétés antioxydantes.

Il serait donc intéressant d'étudier l'influence du traitement par l'irradiation gamma sur certaines activités biologiques des différents échantillons d'origan irradié.

## Conclusion

Actuellement, il existe une grande inquiétude sur le danger que peuvent présenter les conservateurs chimiques dont beaucoup sont suspects en raison de leurs actions cancérigènes et allergènes ou de leur toxicité résiduelle. C'est pour cela que le consommateur soucieux de sa santé, commence à prendre conscience de l'importance du retour au naturel.

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de la flore spontanée poussant en Algérie, nous avons mené un travail qui consistait à étudier la composition chimique et l'activité biologique des substances naturelles extraites de *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, *Calamintha nepeta*, *Visnaga daucoïdes* et *Origanum floribundum*.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'extraction et à la caractérisation phytochimique des huiles essentielles et des extraits non volatils de plusieurs échantillons de plantes étudiées ainsi qu'à l'évaluation de leurs pouvoirs antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires.

Ensuite nous avons choisis l'espèce d'origan endémique à l'Algérie pour approfondir notre recherche par l'étude de l'influence de la durée d'extraction sur la composition chimique et l'activité biologique des huiles essentielles d'une part et d'une autre part nous avons procédé à l'application d'un traitement de décontamination et de conservation qui est l'irradiation par les rayonnements gamma et nous avons étudié l'influence de ce traitement physique sur la composition chimique de cette espèce.

L'analyse par CG et CG/SM des huiles essentielles de germandrée des trois régions a montré une composition similaire qui diffère uniquement dans la teneur en leurs constituants. Le *t*-Cadinol (18,3%) est le principal composé de l'HE de Boussaâda suivi de près par le Germacrene D (15,3%) et le  $\beta$ -Pinene (10,5%); tandis que ces deux derniers sont majoritairement présent dans HE de Kadiria et de Tablat respectivement avec des teneurs de 20.4%-18.5% pour le Germacrene D et 17% -15.4% pour le  $\beta$ -Pinene.

Pour les huiles extraites de sarriette, les monoterpènes oxygénés constituent la quasi-totalité des huiles essentielles des deux échantillons. Les deux composés majoritairement présents sont le pulegone (39,5%- 45.9%) et le neo-menthol (33% -18.10%) respectivement pour l'HE d'El Affroun et de H. Melouane.

L'huile essentielle de khella est caractérisée par la dominance du Cembrene C enregistrant une teneur de 57 % suivi par le linalol (14,0 %) et l'Amylisovalérate (3,0 %). Le reste de l'huile est constitué par un grand nombre de composés dont le pourcentage reste inférieur ou égale à 1 %.

D'une manière générale, les fortes teneurs en polyphénols ont été enregistrées avec l'extrait d'origan. En se référant à la littérature, les résultats enregistrés pour cette espèce sont supérieurs à ceux rapportés par d'autres auteurs.

Concernant l'activité antioxydante des HE des quatre espèces étudiées, l'inhibition du radical DPPH exprimée en termes de concentration inhibitrice de 50% des radicaux ( $IC_{50}$ ), n'a été évaluée que pour les HE d'origan des deux régions étant donné que pour les autres huiles cette grandeur ne pouvait pas être atteinte. Cependant celle de Lakhdaria s'est montrée plus active ( $IC_{50}=250$  mg/l) que celle de Maala ( $IC_{50}=461.5$  mg/l).

Par contre, les extraits éthanoliques ont montré une activité de piégeage du radical DPPH beaucoup plus élevée que celle des HE et comparable avec celle du BHT. Ce fort pouvoir serait attribué à la forte teneur des extraits en composés phénoliques.

Les HE et les extraits étudiés ont montré une action inhibitrice envers la majorité des souches microbiennes testées. Dans la quasi-totalité des observations, la bactérie Gram positive *Staphylococcus aureus* a été la plus sensible contrairement à la Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* qui était la moins sensible.

Les HE d'origan ont les plus fortes activités antimicrobiennes parmi toutes les huiles testées, ceci peut s'expliquer par leurs richesses en thymol auquel on attribue généralement une forte action inhibitrice.

Concernant l'activité anti-inflammatoire, les HE de *Teucrium polium* et d'*Origanum floribundum* possèdent une activité inhibitrice de la 5-lipoxygénase mais celle d'origan est plus intéressante avec un  $IC_{50}$  de 125.7  $\mu$ g/ml qui est supérieur à celles des HE d'autres espèces d'origan.

L'étude de l'influence de la durée d'extraction sur les HE d'origan nous a permis de constater que :

La totalité des composés identifiés est extraite au bout d'une heure et que le thymol (32.7-45%),  $\gamma$ -terpinène (19.9-28.7%) et p-cymène (15.5-23.1%) sont majoritairement présents. Mais

certains composés, particulièrement les sesquiterpènes qui sont moins volatils, ne sont extraits quantitativement que pour les longues durées (2 ou 3 heures) nous considérons donc que la distillation prolongée est nécessaire pour connaître la composition chimique tant qualitative que quantitative la plus complète que possible d'une plante.

Les concentrations inhibitrices de 50% des radicaux libres (DPPH, ABTS et TBARS) indiquent en général une meilleure activité de l'huile extraite pour une durée de 30 min, par rapport aux huiles extraites pour des durées plus longues. Cependant, les antioxydants de synthèse ont dans tous les cas montré une meilleure efficacité.

Le test d'aromatogrammes ainsi que les valeurs de CMI et CMB/CMF (entre 0.125% à 0.5%) ont révélé que les huiles extraites pour 30 min et 3 h, c'est-à-dire la moins riche et la plus riche en thymol, ont été les plus efficaces. Ce résultat suggère que l'efficacité n'est pas liée uniquement à la teneur de ce composé auquel on attribue généralement un rôle majeur dans l'activité biologique des huiles qui le contiennent.

L'activité antimicrobienne des HE est hautement dépendante de leurs compositions chimiques (principalement les phénols). Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De ce fait, la valeur d'une HE tient à son « totum », c'est à dire à l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires.

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet d'irradiation sur la composition chimique des HE montrent que l'irradiation par les rayonnements gamma a une légère influence quantitative et non qualitative sur la composition des HE d'origan. Cela veut dire que l'irradiation n'affecte pas la qualité des huiles. Il serait donc intéressant d'utiliser ce mode de traitement pour la décontamination et la conservation des épices et des plantes aromatique à fort pouvoirs biologiques en vue de leur commercialisation.

L'étude détaillée des huiles essentielles et extraits, reste un travail de longue haleine. Il peut être constamment amélioré par les techniques d'extraction, de séparation et d'identification et reste lié au fait que la composition chimique de ces substances bioactives dépend énormément de divers facteurs dont l'environnement pédoclimatique, les facteurs génétiques, l'âge de la plante et les quantités relatives des parties traitées de la plante.

Les présents résultats restent néanmoins préliminaires et ouvrent des perspectives intéressantes à exploiter notamment par :

- L'étude de l'influence du traitement par l'irradiation gamma sur certaines activités biologiques des HE d'origan.
- Approfondir l'analyse de la composition chimique des différents extraits obtenus, afin d'identifier les composés bioactifs;
- Isoler les composés principaux et comparer leurs pouvoirs antimicrobiens et antioxydants avec ceux des HE et extraits ;
- Tester l'activité antioxydante et antimicrobienne *in vivo* dans un aliment sélectionné pour permettre leurs utilisations comme de nouveaux agents conservateurs naturelles.

1. **Aburjai T., Hudaib M. et Cavrini V., 2006.** Composition of the Essential Oil from Jordanian Germander (*Teucrium polium* L.). *Journal of Essential Oil Research*, 18 (1), 97-99.
2. **Adams R.P., 2007.** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed., Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL., USA.
3. **AFNOR 2000.** Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.
4. **AidiWannes W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., ElyesKchouk M. et Marzouk B., 2010.** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1362-1370.
5. **Albano S. M., Lima S. L., Miguel M. G., Pedro L. G., Barroso J. G., et Figueiredo A. C. 2012.** Antioxidant, Anti-5-lipoxygenase and Antiacetylcholinesterase Activities of Essential Oils and Decoction Waters of Some Aromatic Plants *Rec. Nat. Prod.*, 6 (1), 35-48
6. **Alfaïz C., 2006.** Plante du mois : origan. Maroc-PAM, 7, p.4.
7. **Alonso W.R. et Croteau R., 1993.** Prenyltransferases and cyclases: Methods Plant. Biochemistry, 9, 239-260.
8. **Amezouar F., Badri W., Hsaine M., Bourhim N., Fougrach H., 2013.** Antioxidant and anti-inflammatory activities of Moroccan *Erica arborea* L. *Pathologie Biologie*, 61, 254-258.
9. **Amin J. N., Murad A., Motasem A. M., Ibrahim S. R., Ass'ad, J. M., Ayed A. M., 2015.** Phytochemical Screening and In-vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Entire Khella Plant (*Ammi visnaga* L.) A member of Palestinian Flora., 26 (7), 513-518.
10. **Anizon J-Y., Lemaire B. et Surbled M., 2003.** Extraction assistée par micro-ondes. Techniques de l'ingénieur, traité Agroalimentaire, 12P.
11. **Antonelli, A., Fabri C., Boselli E., 1998.** Modification of dried basil (*Ocimum basilicum*) leaf oil by gamma and microwave irradiation. *Food Chem.*, 63, 485-489.

12. **Antunes, T., Sevinate-Pinto, I., Barroso, J.G., Cavaleiro, C., Salgueiro, L.R., 2004.** Micromorphology of trichomes and composition of essential oil of *Teucrium capitatum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 336–340.
13. **Aouidi F., Ayari S., Ferhi H., Roussos S., Hamdi M., 2011.** Gamma irradiation of air-dried olive leaves: Effective decontamination and impact on the antioxidative properties and on phenolic compounds. *Food Chemistry*, 127, 1105–1113.
14. **Arvanitoyannis I.S., 2008.** Impact of Irradiation on fish and Seafood Shelf Life : A Comprehensive Review of Application and Irradiation Detection, 46, 11, 68-112.
15. **Babushock, V.I., Linstrom, P.J., Zenkevich, I.G., (2011).** Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40, 43101-1- 43101-47.
16. **Bagamboula C. F., Uyttendaele M., et Debevere J., 2004.** Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21, 33-42.
17. **Baher Z. F. et Mirza M., 2003.** Volatile constituents of *Teucrium flavum* L. From Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 15 (2), 106-107.
18. **Bärtels A., 1998.** Guide des plantes du bassin méditerranéen. Ed. Eugen Ulmer, Paris. 400 P.
19. **Baser K.H.C., Kürkçüoğlu M., Houmani Z., Abed I., 2000.** Composition of the essential oil of *Origanum floribundum* Munby from Algeria. *J. Essent. Oil Res.* 12, 753-756.
20. **Bayramoğlu B., Sahin S. et Sumnu G., 2008.** Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*, 88, 535–540.
21. **Benchabane, O., Hazzit, M., Baaliouamer, A., Mouhouche, F., (2012).** Analysis and antioxidant activity of essential oils of *Ferula vesceritensis* Coss et Dur and *Thymus munbyanus* Desf.. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15 (5), 774-781.
22. **Benhabiles N.E., 1995.** Comparaisons des huiles essentielles de deux espèces Algériennes de romarin : Extraction et étude analytique. Th. magister, ENP, Alger.
23. **Belaïche, P., 1979.** "L'aromatogramme" : Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1. Ed. M.S.A., Paris. 204 P.

24. **Beloued A., 2005.** Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Office Des Publications Universitaires, Alger. 284 P
25. **Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchikhi T. et Remmal A., 2004.** Surface alteration of *Saccharomyces cerviceae* induced by thymol and eugenol. Letters in Applied Microbiology, 38(6), 454-458.
26. **Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M. et Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. Information chimie.
27. **Berset C. et Cuvelier M.E. 1996.** Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. Science des Aliments, 16, 219-245.
28. **Berthod A., Billardello B. et Geoffroy S., 1999.** Polyphenols in countercurrent Chromatography: An example of large scale separation<sup>1</sup>. Analysis. EDP Sciences, WileyVCH, 27, 750-757.
29. **Beta T., Nam S., Dexter J. E. et Sapirstein H.D., 2005.** Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. Journal of Cereal Science, 82 (4), 390–393.
30. **Birt D.F., Hendrich S. et Wang W., 2001.** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. Pharmacology et therapeutics., 90, 157-177.
31. **Bock B., 2011.** Tela Botanica, Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. BDNFF v 4.02.
32. **Bohlmann J., Steele C.L. et Croteau R., 1997.** Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*): DNA isolation, characterization, and functional expression of myrcene synthase, (-)-(4s)-limonene synthase, and (-)-(1s,5s)-pinene synthase. Journal of Biological Chemistry, 272, 21784–21792.
33. **Bourkhiss M., Hinach M., Paolin J., Costa J., Farah A., et Satrani B., 2010.** Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata (Vahl)* Masters du Maroc. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 79, 141 – 154.
34. **Bouterfas K., Mehdadi Z., Latreche A., Hazem Z. et Bouredja N., 2013.** Quantification de quelques polyphénols de *Marrubium vulgare* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale) pendant les deux périodes de végétation et de floraison. Les technologies de laboratoire, Maroc, 8, 31.

35. **Brooks C.D.W., Summers J.B., 1996.** Modulators of leukotriene biosynthesis and receptor activation. *J. Med. Chem.*, 39, 2630-2654.
36. **Brouillard R., Figueiredo P., Elhabiri M. et Dangles O., 1997.** Molecular interactions of phenolic compounds in relation to the colour of fruits and vegetables. In: *Phytochemistry of fruit and vegetables Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. Oxford. Clarendon Press, 30 - 49.
37. **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, 2ème Ed., Paris. 623P.
38. **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Lavoisier, 3ème Ed., Paris. 585 P
39. **Bruneton J., 1995.** Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Ed. Lavoisier, Paris. 915 P.
40. **Burits, M., & Bucar, F. 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14, 323–328.
41. **Burt S. A. et Reinders R. D., 2003.** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36 (3), 162-167.
42. **Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
43. **Cabana S., 1996.** Dossier l'irradiation au service de l'alimentation. Ed : Réseau, le magazine de l'université du Québec, p.p.18-19.
44. **Calliste C.A., Trouillas P., Allais D.P., Simon A. et Duroux J.L., 2001.** Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J. Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3321-3327.
45. **Canillac N. et Mourey A., 1996.** Comportement de *Listeria* en présence d'huiles essentielles de sapin et de pin. *Sciences des Aliments*, Vol. 16, p.p. 403 – 4
46. **Chang S.-T., Chen P.-F. et Chang S.-C., 2001.** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum mophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 123-127.

47. **Chao S.C., Young D.G. et Oberg G.J., 2000.** Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 12, p.p. 639-649.
48. **Chen J.H. et Ho C.T., 1997.** Antioxydant Activity of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2374-2378.
49. **Choma I. M. et Grzelak E. M. 2011.** Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2684-2691.
50. **Conner D.E., 1993.** Naturally occurring compounds: Antimicrobials in foods. Ed. Davidson In.P.& Branen A. L., New York. 468 P.
51. **Connolly J.D. et Hill R.A., 1991.** Dictionary of terpenoids. Ed. Chapman & Hall, London, 2156 P.
52. **Cosentino S., Tuberoso C. I. G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. et Palmas F., 1999.** In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 29, n. 2, p.p. 130-135.
53. **Cowan M. M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12, n. 4, p.p. 564-582.
54. **Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. et Wyllie S.G., 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88 (1), 170-175
55. **Cozzani S., Muselli A., Desjobert J. M., Bernardini A. F., Tomi F. et Casanova J., 2005.** Chemical composition of essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) from Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 436-441.
56. **Crabas N., Marongiu B., Piras A., Pivetta T. et Porcedda S., 2003.** Extraction, séparation and isolation of fowl and dyes of *Officinalis calendula* L. And *Aloysiastriphylla* Britton by CO<sub>2</sub> supercritical. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 15 (4), 272.
57. **Crock J., Wildung M.R. et Croteau R., 1997.** Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita*, L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)- $\beta$ -farnesene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 12833-12838.

58. **Croteau R., 1987.** Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chemical Reviews*, 87, 929–954.
59. **Croteau R., Alonso W.R., Koepf A.E. et Johnson M. A., 1994.** Biosynthesis of monoterpenes: Partial purification, characterization, and mechanism, of action of 1,8-Cineole synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 309, 184–192.
60. **Cuvelier M., Richard H. et Berset C., 1992.** "Comparaison of the antioxydant activity of some acid-phenols: structure-activity relationship." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 324-325.
61. **Danin A., and Künne I., 1996.** *Origanumjordanicum* (Labiatae), a new species from Jordan, and notes on the other species of *Origanum* sect. *Campanulaticalyx*, *Willdenowia*, 25, 601-611.
62. **Deans S.G. et Ritchie G., 1987.** Antimicrobial proprieties of plants essential oils. *Journal of food microbiology*, 5, 162-180.
63. **De Billerbeck G., 2000.** Activité fongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* sur l'*Aspergillus niger*: Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur des substances volatiles en phase vapeur. Faculté des sciences pharmaceutiques, Institut national polytechnique de Toulouse, 236 P.
64. **De Billerbeck V.-G., Roques C., Vanière P. et Marquier P., 2002.** Activité antibactérienne et antifongique produits à base d'huiles essentielles. *Hygienes*, 3, 248-251.
65. **De Feo V., Bruno M., Tahiri B., Napolitano F. et Senatore F., 2003.** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Thymus spinulosus* Ten. (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3849-3853.
66. **Delaquis P.J., Stanich K., Girard B. and Mazza G., 2002.** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, 74, 101-109
67. **Dhanya R, Mishra BB, Khaleel K.M., 2011.** Effet of gamma irradiation on curcumioids and volatile oils of fresh turmeric (*Curcuma longa*). *Radiat Phy Chem.*, 80, 1247-1249.

68. **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N., 2006.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654–660.
69. **Dobignard A., et Chatelain C., 2013.** Index synonymique de la flore d’Afrique du nord. Vol. 1-5. Conservatoire et Jardin botanique, Genève. 451p.
70. **Dobravalskyte D., Venskutonis P.R., Talout., 2012.** Antioxidant properties and essential oil composition of *Calamintha grandiflora* L. *Food chemistry*, 135, 1539-1546
71. **Dorman D.H.G., Bachmayer O., Kosar M. et Hiltunen R., 2004.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 762-770.
72. **Dugo G. et Di Giacomo A., 2004.** *Citrus: The Genus Citrus*. Taylor & Francis Group, 656 p.
73. **Dukic N.M., Couladis M., Tzakou O., Jancic R. et Slavk V., 2004.** Essential Oil of *Calamintha sylvatica* Bromf. And *Calaminthavardarensis* Silic *Journal of Essential Oil Research*, 16(3), 219-222.
74. **Dupont R., Goossens J.-F., Cotelte N., Vrielynck L., Vezin H., Henichart J.-P., Cotelte P., 2001.** New bis-catechols 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 229-235.
75. **Dupont F., Guignard J.-L., 2007.** *Systématique moléculaire, Abrégé de botanique*, 14e édition, Masson, Issy-les-moulineaux, 285 p.
76. **Ela M.A., El-Shaer N.S. et Ghanem N.B., 1996.** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie*, Vol. 51, p.p. 993-995.
77. **Elmasri W. A., Hegazy M. E., Mechrefa Y. et Paréa P.W., 2016.** Structure-antioxidant and anti-tumor activity of *Teucrium polium* phytochemicals. *Phytochemistry Letters*, Vol.15, p.81-87.
78. **El Kalamouni C., 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d’extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse doctorat. Université de Toulouse, France, 263 P.
79. **El-Shazly A. M. et Hussein K. T., 2004.** Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leuocladum* Boiss. (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 32, n. 7, P. 665-674.

80. **Eymard S., 2003.** Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Th. Doctorat, Université de Nantes, France, 277 P.
81. **Faleiro L., Miguel G., Gomes S., Costa L., Venancio F., Teixeira A., Figueiredo A.C., Barroso J. G. et Pedro L. G., 2005.** Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymus capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L.. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 8162-8168.
82. **F.A.O., 1999.** Protein quality evaluation . Report of a joint FAO/WHO, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, pp.4-3.
83. **Fatemi F., Dini S., Dadkhah A., Zolfaghari M. R., 2015.** Considering the antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss essential oil treated with gamma-irradiation in vitro and in vivo systems. Radiation Physics and Chemistry, 106, 145-150.
84. **Favier A., 2003.** Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique, 108-115.
85. **Filliat P., 2012.** Les plantes de la famille des apiacées dans les troubles digestifs. Thèse Doctorat, faculté de pharmacie de Grenoble, 140p.
86. **Fleurette J, Freney J, Reverdy M.E., 1995.** Antiseptie et désinfection. Edition ESKA, Paris, 199-221.
87. **Franchomme P. et Pénéol D., 1990.** Matière médicale aromatique fondamentale.
88. L'aromathérapie exactement, 4, 317-446.
89. **Franchomme P., Pénéol D., 2001.** L'aromathérapie exactement. France, Edition Roger Jollois.
90. **Frankel E.N., 1996.** "Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality." Food Chemistry, 57: 51-55.
91. **Frankel E.N., 1998.** Lipid oxidation: The Oily Press. Ed. Dundee, Scotland. 303 P.
92. **Frum, Y. and Viljoen, A.M., 2006.** In vitro 5-lipoxygenase activity of three indigenous South African aromatic plants used in traditional healing and the stereospecific activity of limonene in the 5-lipoxygenase assay, J. Essent. Oil Res., 18, 85-88.

93. **Furneri P.M., Marino A., Saija A., Uccella N. et Bisignano G., 2002.** In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20, 293- 296.
94. **Gabriel I ., Alleman F., dufourcq V., perrin F. et Gabarrou J-F ., 2013.** Utilisation des huiles essentielles en alimentation des volailles : hypothèse sur les modes d'action impliqués dans les effets observés. *INRA Productions Animales*, 26,13-24.
95. **German J.B. et Kinsella J.F., 1985.** Lipidoxidation in fish tissue: Enzymatic initiation via lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 680-683.
96. **Ghedira, K., 2005.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.*, 4, 162-169
97. **Gil M.I., Thomàs-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M. et Kader A.A., 2000.** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48,4581-4589.
98. **Gill A.O., Holley R.A., 2004.** Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and eugenol against *L.monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5750-5755.
99. **Grayna Z., Dragan T., Gourniak K., Basiura E., 1998.** Determination of furanochromones and pyranocoumarins in drugs and *Ammi visnaga* fruits by combined solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 797(1-2), 305-309.
100. **Griffin S. G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N., 1999.** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14, 322-332.
101. **Guetat A. and Al-Ghamdi F.A. 2014.** Analysis of the essential oil of the germander (*Teucrium Polium* L.) aerial parts from the northern region of Saudi arabia. *International journal of applied biology and pharmaceutical technology*, 5 (2), 128-135.
102. **Guignard J.L., 1996.** *Biochimie végétale*. Ed. Masson, Paris. 255 P.
103. **Guiraud J.P., 2003.** *Microbiologie Alimentaire*. Ed. Dunod, Paris. 652 P.
104. **Guo L., Xie M. Y., Yan A. P., Wan Y. Q. et Wu Y. M., 2006.** Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC MS Analytical

- and Bioanalytical Chemistry, 386, 1881-1887.
105. **Gustafson JE., LiewYC., Chew S., Markham J., Bell HC., Wyllie SG.et Warmington JR.,1998.** Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*,26, 194 -198.
106. **Gynayd K. et Erim B., 2002.** Determination of khellin and visnagin in *Ammi visnaga* fruits by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 954, 291- 294.
107. **Haddad M., Herent M. F.,Tilquin B.,Quetin-Leclercq J., 2007.**Effect of gamma and e-Beam radiation on the essential oils of *Thymus vulgaris* thymoliferum, *Eucalyptus radiata*, and *Lavandula angustifolia*. *J.Agric.Food Chem.*, 55,6082–6086.
108. **Hale A. L., 2003.** Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis.Ed. Office of Graduate Studies of Texas A&M University. 260 P.
109. **Hammouda F, M., Ismail S, I, Abdel-Azim N, S and Shams K, A., 2005.** A Guide to Medicinal Plants in North Africa.IUCNCentre for MediterraneanCooperation. Malaga. 2005.
110. **Harborne J.B., 1989.** Methods in plant biochemistry, I: Plant phenolics. Academic Press.
111. **Heim E.K., Tagliaferro A.R. etBobilya D.J., 2002.** Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry.*, Vol. 13, p.p. 572-584.
112. **Hayouni E.K., Abedrabba M., Bouix M. et Hamdi M., 2007.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. And *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, Vol. 105, p.p. 1126–1134.
113. **Hazzit, M., Baaliouamer, A., Verissimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 200.**Chemical composition and Biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*, 116, 714-721.
114. **Hazzit, M. 2008.** Etude de la composition chimique de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie. Thèse de doctorat en chimie, spécialité organique appliquée, USTHB, 204P.

115. **Hazzit M., Baaliouamer A., 2009.** Composition of the essential oils of the leaves and flowers of *Thymus pallescens* de Noe and *Origanum floribundum* Munby from Algeria. Journal of Essential Oil Research, 21, 267-270.
116. **Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro L., Miguel Graça M., 2006.** Composition of the Essential Oils of Thymus and Origanum Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 6314-6321.
117. **Helander IM., Alakomi H-L., Latva-Kala K. et al., 1998.** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 3590-5.
118. **Hendrich A.B., 2006.** Flavonoid-membrane interactions: possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. Acta pharmacologica Sinica., Vol. 27, p.p. 27-40.
119. **Hisham A., Pathare N., Al-Saidi S. et Al-Salmi A., 2006.** The composition and the antimicrobial activity of leaf essential oil of *Teucrium mascatenses* Boiss. from Oman. Journal of Essential Oil Research, Vol. 18, n. 4, p.p. 465-468.
120. **Hoyland D.V., Taylor A.J., 1991.** A review of the methodology of the 2-Thiobarbituric acid test, Food Chemistry, 1991, 40, 271-291.
121. **Huang D.J., Lin C.D, Chen H.J. et Lin Y.H., 2004.** Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas*[L.] Lam ‘Tainong 57’) constituents Bot. Bull. Acad. Sin., Vol. 45, p.p. 179-186.
122. **Hudaib M., Speroni E., Di Pietra A.M. et Cavrini V., 2002.** GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 29, p.p. 691–700.
123. **Hayouni E. K, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M., 2007.** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. Fruit extracts. Food Chemistry, 105, 1126–1134.
124. **Hulin V., Mathot A. G., Mafart P. et Dufossé L., 1998.** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d’arômes. Sciences des aliments, Vol. 18, p.p. 563-582.
125. **Hultin, H.O., 1992.** Lipid Oxidation in Fish Muscle. In: Advances in seafood

- biochemistry: Composition and quality. Flick, G.J. & Martin, R.E. (Eds.), Technomic Publishing CompagnyInc, Lancaster, 99-122.
126. **Hultin, H.O., 1994.** Oxidation of lipids in seafoods. In: Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality .Shahidi, F. &Botta, J.R. (Eds), Blackie Academic &Professional, New York; 49-74.
127. **Hussain A.I., Anwar F., Sherazi T.HS.et Przybylski R., 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry, 108, 986-995.
128. **Hussain A.I., 2009.**Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae.Thèse de Doctorat, Pakistan, 257p.
129. **Jones S.M., Luo M., Healy A.M., Peters-Golden M., Brock T.G., 2002.**Structural and functional criteria reveal a new nuclear import sequence on the 5- lipoxygenase protein. J. Biol. Chem., 277, 38550-38556.
130. **Juan R., Pastor J., Millan F., Alaiz M. et Vioque J., 2004.** Amino acids composition of *Teucriumnutlet* proteins and their systematic significance.Annals of Botany, 94, 615-621.
131. **Juven B.J., Kanner J., Schved F. etWeisslowicz H., 1994.** Factors that interact with the antibacterial essential oil and its activeconstituents.Journal of Applied Bacteriology, 76, 626 631.
132. **Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z. et Benlabeled K., 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria.The International Journal of Aromatherapy,15, 129-133.
133. **KaboucheZ., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z. et Kabouche A., Touafek O., Nacer A. et Kabouche Z., 2006.** Volatile oil constituents of *Teucriumatratum*Pomel from Algeria. Journal of Essential Oil Research, 18 , 175-177.
134. **Kabouche Z. et Jay M., 2011.** Flavonols and antioxydant activity of *Ammi visnaga* L. (Apiaceae). Rec. Nat. Prod ., 5 (1), 52-55.
135. **Kang O.H., Chae H.S., Choi J.G., Oh Y.C., Lee, Y.S., Kim J.H., Seung M.J., Jang H.J., Bae K.H., Lee J.H., Shin D.W. et Kwon D.Y., 2008.** Ent-pimara-8(14), 15-dien-19-oic acid isolated from the roots of *Aralia cordata* inhibits induction of inflammatory mediators by blocking NF-κB activation and mitogen-activated protein kinase pathways,

- European Journal of Pharmacology, **601**, Issues 1-3, 28 ,179 – 185.
136. **Karatzas A.K., Kets E.P.W., Smid E.J. et Bennik M.H.J., 2001.**The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Applied Microbiology, 90, 463–469.
137. **Khani A., Heydarian M., 2014.**Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucriumpolium* subsp. *capitatum* (L.). Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 956-961.
138. **Khalfallah A., Labed A., Semra Z., Aikaki B., Kabouche A., Touzani R., Kabouche Z., 2011.** Antibacterial activity and chemical composition of the essentialoil of *Ammi visnaga* L. (apiaceae) from Constantine,Algeria. Int. J. Med. Arom. plants.,1 (3), 302-305.
139. **Kim H.P., Mani I., Iversen L., Ziboh V., 1998.**Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs.*Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 58(1), 17-24.
140. **Kim Y.S., Hwang C.S. et Shin D.H., 2005.**Volatile constituents from the leaves of *Polygono-numcuspidatum* and their anti-bacterial activities. Food Microbiology, 22, 139–144.
141. **Kitic D., Stojanovic G., Palic R., et Randjelovic V., 2005.** Chemical Composition and Microbial Activity of the Essential Oil of *Calamintha nepeta* (L) Savi subsp. *nepeta* Var.subisonda (Bord) Hayek from serbia. Journal of Essential Oil Research, 17(6), 701-703.
142. **Kleeman A., Engel J., Kutcher B. et Reichert D., 1999.**Pharmaceutical Substances,Synthèses, Patents, Applications. AM, 4th ed., Thieme, New York, 1 380 p.
143. **Knobloch K., Paulin A., Iberl B., Weigand H. et Weis N., 1989.** Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. Journal of Essential Oil Research, 1, 119-128.
144. **Knowles J. R., Roller S., Murray D. B. et Naidu A. S., 2005.** Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteric Serovar Typhimurium*.Applied and Environmental Microbiology,71,797-803.
145. **Koroch A.R., Juliani H.R., etZygadlo J.A., 2007.** Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In: Berger R.G. Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing

- and Sustainability. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 85-115.
146. **Kulisic T., Radonic A., Katalinic V. et Milos M., 2004.** Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.*, 85, 633–640.
147. **Kumaran A. et Karunakaran R.J., 2006.** Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food chemistry*, 97, 109-114
148. **Kürkçüoğlu M., İscan G., Ozek T., Baser K. et Alan S., 2007.** Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Calamintha betulifolia* Boiss et Bal *Journal of Essential Oil Research*, 19 (3), 285-287.
149. **Lahlou M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, 435-448.
150. **Lamaison, J.L.C. et Carnet, A., 1990.** Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C.) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 65, 315 – 320.
151. **Lambert R. J. W. et Skandamis P. N., 2001.** A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
152. **Lang G. et Buchbauer G., 2012.** A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.*, 27, 13–39.
153. **Larousse, 1997.** Encyclopédie des plantes médicinales. Identification, préparation, soins. Larousse. P 11-12.
154. **Lawrence B.M. et Reynolds R.J., 1984.** The botanical and chemical aspect of *Origanum*. *Perfumer et Flavorist*, 9, 41-51.
155. **Le Corre F. et Venaille L., 1989.** Traitements ionisants. In : *Microbiologie Alimentaire*. Volume 1, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, p.p.345-368.
156. **Li Y.-L., Xu W.-F., 2004.** Design, synthesis, and activity of caffeoylpyrrolidine derivatives as potential gelatinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 5171-5180.
157. **Lis-Balchin M. et Hart S. L., 2000.** Pharmacological and antimicrobial studies on different tea-tree oils, originating in Australia and New Zealand. *Phytotherapy Research*, 14, 623-629.
158. **Ljubuncic P., Dakwar S., Portnaya I., Cogan U., Ayaizeh H. et Bomzon A., 2006.** Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity in-

- vitro.eCAM, 3 (3), 329-338.
159. **Lucchesi M.E., Chemat F. et Smadja J., 2004.** Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043, 323–327.
160. **Lucchesi M. E., 2005.**Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes : Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat, Université de la Réunion, 146p.
161. **Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W. et Chemat F., 2007.** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*, 79, 1079– 1086.
162. **Lugasi A., Hovari J., Sagi K. V. et Biro L. 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47 (1-4), 119-125.
163. **Luigia L., Scardino A. et Vasapollo G., 2007.** Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrina* L. *Innovative Food Science And Emerging Technologies*, 8 (3), 360- 364.
164. **Maccioni S., Baldini R., Tebano M., Cioni P. L. et Flamini G., 2007.** Essential oil of *Teucrium scorodonia* L. subsp. *scorodonia* from Italy. *Food Chemistry*, 44, 1393-1395.
165. **Machhour H., Hadrami, I.E.L., Imzilen, B., Mouhib, M., Mahrouz, M., 2011.** Microbial decontamination by low dose gamma irradiation and its impact on the physico- chemical quality of peppermint (*menthe piperita*). *Radiat. Phys. Chem.*, 80, 604–607.
166. **Mafart P., 1995.** Génie Industriel Alimentaire. Tome I, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 137-144.
167. **Mau J.L., Huang P.N., Huang S.J., 2004.** Antioxydant properties of methanolic extracts from two kinds of *Antrodia camphorata* mycelia. *Food Chemistry*, 86, 25-31.
168. **Manthey JM (2000).** Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*, 7, 28-34.
169. **Marfak A., 2003.** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de leur Réactivité avec les Radicaux Issus des Alcools : Formation de Depsides. Th. Doctorat, Université de Limoges. 187 P.
170. **Meena M.R. et Sethi V., 1994.** Antimicrobial activity of the essential oils from spices.

- Journal of Food Science and Technology, Mysore, 31, 68-70.
171. **Mejlholm O. et Dalgaard P., 2002.** Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27-31.
172. **Menichini F., Conforti F., Rigano D., Formisano C., Piozzi F. et Senatore F., 2009.** Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*, 115, 679–686.
173. **Middleton E JR, Kandaswami C et Heoradies T.C., 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, 52, 673-751.
174. **Mimica-Dukic N., Couladis M., Tzakou O., Jancic R. et Slavk V., 2004.** Essential Oil of *Calamintha sylvatica* Bromf. and *Calamintha vardarensis* Silic. *Journal of Essential Oil Research*, 16(3), 219-222.
175. **Miguel G., Cruza C., Faleiro M.L., Simoes M.T.F., Figueiredo A.C. et Barroso J.G., 2011.** *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Products Research*, 5, 526-541.
176. **Miguel M., Bouchamaa N., Aazza S., Gaamoussi F., & Lyoussi B., 2014.** Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of Moroccan plants. *Fresenius Environ Bull.*, 23, 1375-1388.
177. **Misirli A., Küden A., Demir G. et Gülcan R., 2001.** Determination of phenolic compounds in some almond hybrids varying in resistance to *Pseudomonas amygdali*. In: 11ème Colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier. Zaragoza, 71-86.
178. **Mitić V., Jovanović O., Stankov-Jovanović V., Zlatkovic B. et Stojanovic G., 2012.** Analysis of the essential oil of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* from the Balkan Peninsula. *Natural Products Communication*, 7(1), 83-86.
179. **Moll M. et Moll N. 1998.** Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques, Ed. Dunod, Paris. (Technique et Ingénierie, série Agro-alimentaire).
180. **Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M. et Sineiro J., 2001** "Natural antioxidants from residual sources." *Food Chemistry*, 72, 145-171.

181. **Namiki M., 1990.** "Antioxidants/Antimutagens in Food." CRC critical reviews in food science and nutrition, 29, 273-300.
182. **Néve J., 2006.** Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : ciblage du système myeloperoxydase/ peroxyde d'hydrogene/ chlorure. Thèse Doctoraten pharmacie, Université Bruxelles, 221p.
183. **Nikhat F., Satynarayana D. et Subhramanyam E.V.S., 2009.** Isolation, charectrisation and screening of antioxidant activity of the roots of *Syzygiumcuminii* (L) Skeel. Asian J. Research Chem., 2, 218-221.
184. **Oosterhaven K., Poolman B. et Smid E. J., 1995.** S-carvone as a natural potato sproutinhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. Industrial Crops and Products, 4(1), 23-31.
185. **Oussalah M., Caillet S., Saucier L. et Lacroix M., 2006.** Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. Meat Science, 73, 236-244.
186. **Oussalah M., Caillet S., Saucier L. et Lacroix M., 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18, 414-420.
187. **Oyaizu M., 1986.** Studies on product of browning reaction prepared from glucoseamine. Japan Journal of Nutrition, 44, 307-315.
188. **Özkan G., Sağdıç O., Baydar N. G. et Baydar H., 2003.** Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. Journal of Food Science and Technology, 9 (2), 85-88.
189. **Paradiso A., Cecchini C., De Gara L. et D'Egidio M.G., 2006.** Functional, antioxidant and rheological properties of meal from immature durum wheat. Journal of Cereal Science, 43(2), 216-222.
190. **Paster N., Juven B., Shaaya E., Mena-Sherov M., Nitzan R. et Weisslowics D.U., 1990.** Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. Letters in Applied Microbiology, 11, 33 – 37
191. **Pereira S.I., Santos P.A.G., Barroso J.G., Figueiredo A.C., Pedro L.G., Salgueiro L.R., Deans S.G. et Schecer J.J.C., 2000.** Chemical polymorphism of the essential oils

- from populations of *Thymus caespitius* grown on the island S. Jorge (Azores). *Phytochemistry*, 55, 241-246.
192. **Pérez M. P., Banek S. A., Croci C.A. 2011.** Retention of antioxidant activity in gamma irradiated argentinian sage and oregano. *Food Chemistry*, 126, 121–126.
193. **Perrin, J-L., (1992).** Détermination de l'altération, in : Karleskind A. (ed.), *Manuel des corps gras*, 1198-1218, Lavoisier.
194. **Peters-Golden P.M. et Brock T.G., 2000.** Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161, 36–40.
195. **Pibiri M. C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huiles essentielles. Th. Doctorat, école polytechnique fédérale, Lausanne, 161 P.
196. **Pietta P.G., 2000.** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.
197. **Pouget J. P., 2000.** Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : Mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées. Thèse doctorat, Université Paris XI Faculté de Médecine Paris-Sud.
198. **Psotová J., Lasovsky J. et Vicar J., 2003.** Metal-Chelating Properties, Electrochemical Behavior, Scavenging And Cytoprotective Activities of Six Natural Phenolics. *Biomedical Papers*, 147, 2, 147–153.
199. **Quezel P. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris.
200. **Ragnarsson J.O., Leick D. et Labuza T.P., 1977.** "Accelerated temperature study of antioxidants." *Journal of Food Science*, 42, 1536-1544.
201. **Rasooli I., Rezaei M.B. et Allameh A., 2006.** Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, 10, 236-241.
202. **Rees S. B. et Harborne J. B., 1985.** The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry*, Vol. 24, p.p. 2225 – 2231.
203. **Richard H., 1992.** Epices et aromates. Ed. Lavoisier, Paris. 339 P. (Technique & Documentation).
204. **Richard H. et Multon J.L., 1992.** Les arômes alimentaires. Ed. Lavoisier, Paris. 438 P.

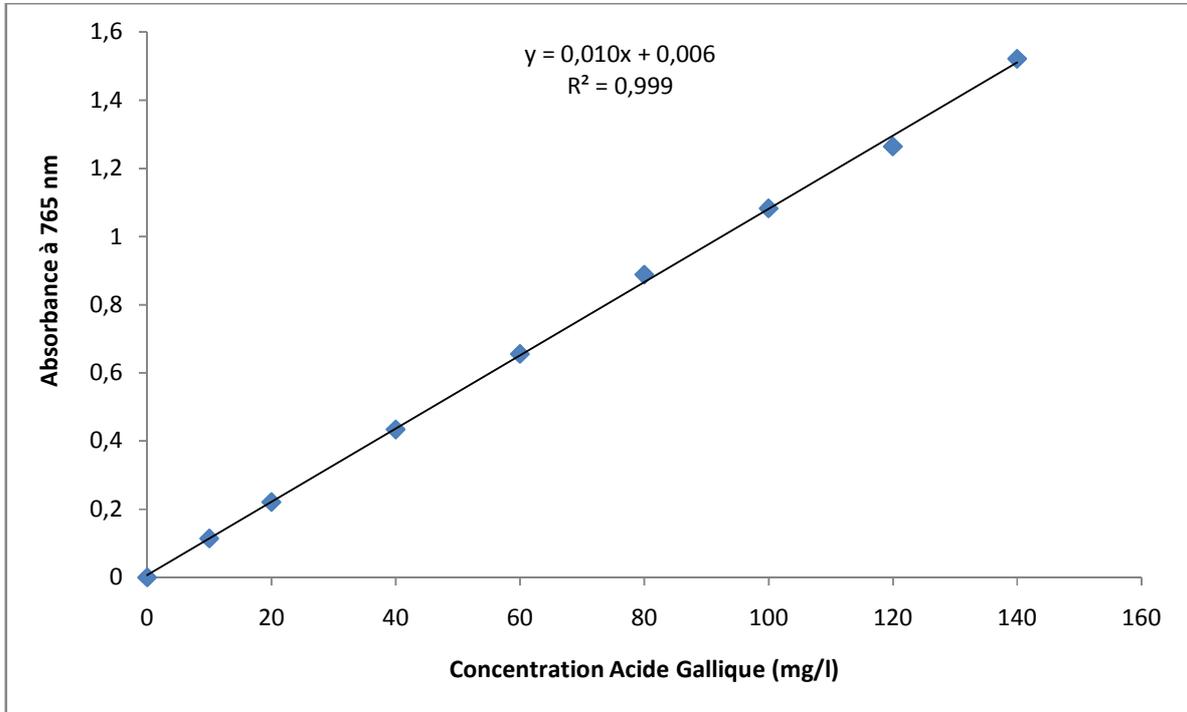
- (Sciences et techniques agroalimentaires).
205. **Roeding-Penman A. et Gordon M .H., 1998.** Antioxidant properties of Myricetin and Quercetin in oil and emulsions. *Journal of American Oil Chemist's Society*, Vol. 75, p.p.169- 180.
206. **Rossi, P.G. , Berti, L., Panighi, J., Luciani, A., Maury, J., Muselli, A., De Rocca, Serra, D.,Gonny, M. and Bolla, J.M., 2007.** Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. *Journal of Essential Oil Research*, 19 (2), 176-182.
207. **Ruberto G., Baratta M.T., Sari M. et Kaabeche M., 2002.** Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 251-254.
208. **Sacan O. et Yanardag R., 2010.** Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1275–1280.
209. **Satrani B., Farah A., Fechtal M., Talbi M., Blaghen M. et Chaouch A., 2001.** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oils from *Satureja calamintha* and *Satureja alpina* of Morocco. *Ann. Falsif. Expert. Chim. Tox.*, 94, 241-250.
210. **Satrani B., Farah A., Fechtal M., Talbi M. et Bouamrani M.L., 2004.** Composition chimique et activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle d'*Ammivisnaga* (L.) Lam. du Maroc. *Acta Bot. Gallica*, 151(1), 65-71.
211. **Seo H-Y., Kim J.H., Song H.P., Kim D.H., Byun M.W., Kwon J.H. et Kim K-S., 2007.** Effects of irradiation on the yield of volatile extracts of *Angelica gigas* Nakai. *Radiation physics and chemistry*, 76 (11), 1869-1874.
212. **Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D. et Corke H., 2007.** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 112–119.
213. **Shervin E.R., 1968.** "Methods for stability and antioxidant measurement." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45, 632-634.
214. **Siddhuraju P., 2007.** Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 40, 982–990.
215. **Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons

- with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 8022-8028.
216. **Singh G., Marimuthu P., De Heluani C.S. et Catalan Cesar A. N., 2006.** Antioxidant and Biocidal Activities of *Carumnigrum*(Seed) Essential Oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 174-181
217. **Singleton V.L., Ortofer R. et Lamuela-Raventos R.M., 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteureagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152 – 178.
218. **Šipailienė A., Venskutonis P. R., Baranauskienė R. et Šarkinas A., 2006.** Antimicrobial Activity of Commercial Samples of Thyme and Marjoram Oils. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 698-703
219. **Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simoni M. et Knez Z., 2005.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.*, 89 (2), 191-198.
220. **Smith-Palmer A., Stewart J. et Fyfe L., 1998.** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Journal of Food Microbiology*, 26, 118-122.
221. **Soro K.N., Sabri L., Amalich S., Khabbal Y., Zair T., 2015.** Chemical composition of Moroccan *Ammi visnaga* L. (Lam.) and antibacterial activity of its essential oil against extended-spectrum beta-lactamase producing and not producing bacteria. *Phytothérapie*, 13, 168-175.
222. **Sosa S., Tubaro A., Kastner U., Glasl S., Jurenttsch J., and Della Loggia R., 2001.** Topical anti-inflammatory activity of a new germacrane derivative from *Achillea pannonica*, *Planta Med.* 67, 654-658.
223. **Souza E.L., Stamford T.L.M. and Lima E.O., 2006.** Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *origanum vulgare*(Lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 527-532.
224. **Spichiger R. E., Savolainen V.V., Figeat M. et Jeanmonod D., 2004.** Botanique systématique des plantes à fleurs. 3<sup>ème</sup> Edition, Lausanne, 412p.
225. **Steele C.L., Crock J., Bohlmann J. et Croteau R., 1998.** Synthases from grand fir (*Abies grandis*): Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of Delta-Selinene synthase and

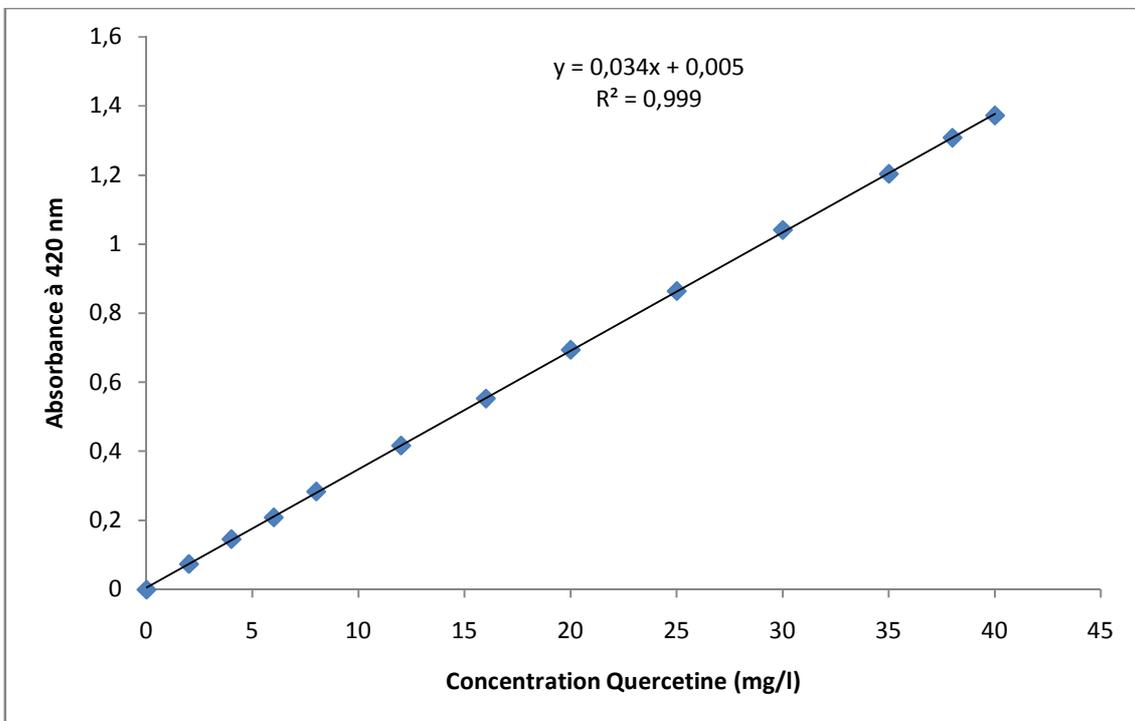
- Gamma-Humulene synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 2078–2089.
226. **Summers J.B., Gunn B.P., Mazdidasni H., Goetze A.M., Young P.R., Bouska J.B., Dyer R.D., Brooks D.W., Carter G.W., 1987.** In vivo characterization of hydroxamic acid inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.*, 30, 2121-2126.
227. **Sun J., Khtan B., Huang S-H., Whiteman M. et Zhu Y-Z., 2002.** Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta Pharmacol*, 23 (12), 1142 -1151.
228. **Taguri T., Tanaka T. et Kouno I., 2004.** Antimicrobial activity of 10 different plant poly-phenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol Pharm Bull*, 27, 1965–1969.
229. **Tassou CC., Drosinos HE. et Nychas JG., 1995.** Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4 degrees and 10 degrees C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 593- 60.
230. **Tarnawski M., Depta K., Grejciun D. et Szelepin B., 2006.** HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immune modulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 182–188.
231. **Tepe B., Sokmen M., Akpulat A. et Sokmen A., 2005.** In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food chemistry*, 92, 89-92.
232. **Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. et Bryne D. H., 2006.** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.
233. **Thiago M. Silva, Roqueline R.S. Miranda, Vany P. Ferraz, Marcio T. Pereira, Ezequias P. de Siqueira, Antonio F. C. Alcantara (2013).** Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodorus macrophyllus* exposed to  $\gamma$ -radiation. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23 (4), 600-607.
234. **Thoroski J., Blank G. et Biliaderis C., 1999.** Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.*, 52, 399-403.
235. **Ultee A., Kets E. P. W. et Smid E.J., 1999.** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65,

- 4606-4610.
236. **Ultee A., Smid E.J., 2001.** Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 373-378.
237. **Ultee A., Bennink M.H.J. et Moezelaar R., 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1561–1568.
238. **Valero M. et Salmeron M.C., 2003.** Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 73-81.
239. **Vasseur J.P., 1991.** Ionisation des produits alimentaires. Collection sciences et technique alimentaires. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
240. **Vogel A., 2013.** Encyclopédie des plantes. L'univers des plantes médicinales; Act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.*, 153 (1- 2), 1-5.
241. **Walsh S. E. et Maillard J. Y., 2003.** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (2), 240-247.
242. **Wang K., Hiruki C. and Chen M.H., 1998.** "Identification of a phytoplasma causing yellows of *Monarda*." *Plant Pathology*, 47, 103-106.
243. **Wang J. et Mazza G., 2002.** Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in LPS/IFN- $\gamma$ -Activated RAW Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, p.p. 4183-4189.
244. **Werz O., Klemm J., Samuelsson B., Radmark O., 2000.** 5-Lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97, 5261-5266.
245. **Wilkinson J.M., 2006.** Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapitre VIII., 157-165. In Ahmad I., Aqil F. et Owais M. *Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs*. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.
246. **Williams G. M., 1994.** Interventive prophylaxis of liver cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 3, 89-99.

247. **Zantar S., Haouz R., Chabbi M., Laglaoui A., Mouhib M., Boujnah M., Bakkali M., Hassani Zerrouk M., 2015.** Effect of gamma irradiation on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Menthapulegium* essential oils. *Radiation Physics and Chemistry*, 115, 6–11.
248. **Zheljzkov, V.D., Astatkie, T., Schlegel, V. 2012.** Distillation time changes oregano essential oil yields and composition but not the antioxidant or antimicrobial activities. *Hortscience*, 47, 777-784.
249. **Zhiri A., 2004.** Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Luxembourg, Éditions Inspir développement.
250. **Zrira S., Bessiere J.M., Menut C., Elamrani A. et Benjilali B., 2002.** Chemical Composition of the Essential Oil of *Ammi visnaga* Lamk. from Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 5 (2), 65-71.



**Annexe 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**



**Annexe 02 : Courbe d'étalonnage de la Quercetine**

## Résumé

Dans le but d'étudier le pouvoir biologique des substances actives des plantes aromatiques et médicinales afin de substituer les conservateurs chimiques ; nous nous sommes intéressés à quatre espèces à savoir : *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, *Calamintha nepeta*, *Origanum floribundum* et *Visnaga daucoides*. L'analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles extraites par hydrodistillation a été réalisée par CPG et CG-SM et nous a permis d'identifier et de quantifier les constituants de ces huiles. En ce qui concerne les extraits obtenus par soxhlet, le dosage des composés phénoliques a montré que ces derniers possèdent des teneurs intéressantes en polyphénols. L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et extraits a montré que ces derniers possèdent un pouvoir antioxydant qui est en relation avec leurs compositions chimiques et que les extraits sont plus actifs que les huiles. Parmi les espèces étudiées l'origan s'est montré la plus active avec un fort pouvoir antioxydant, anti-inflammatoire et antimicrobien. D'après les résultats obtenus pour les échantillons d'huiles essentielles extraites à différentes durées, nous avons conclu que la distillation prolongée est nécessaire pour connaître la composition chimique de l'huile essentielle tant qualitative que quantitative. Les résultats relatifs à l'étude de l'effet de l'irradiation sur les huiles essentielles montrent que ce traitement n'affecte pas la qualité des huiles. Il serait donc intéressant d'utiliser l'irradiation par les rayonnements gamma pour la décontamination et la conservation des épices et des plantes aromatique à fort pouvoirs biologiques.

**Mots clés :** *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, *Origanum floribundum*, *Calamintha nepeta*, *Visnaga daucoides*, CPG/CG-SM, temps d'extraction, irradiation, activités biologiques.

## ملخص

لهدف دراسة النشاط البيولوجي للمواد الفعالة للنباتات الطبية و العطرية لتحل محل المواد المحافظة الكيميائية. قمنا بدراسة أربعة نباتات وهي : *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, *Calamintha nepeta*, *Origanum floribundum* و *Visnaga daucoides* الدراسة النوعية و الشبه الكمية للزيوت الأساسية المستخلصة بالتقطير المائي تمت بواسطة CG و CG-SM و مكنتنا من معرفة نوعية و كمية مكونات هذه الزيوت. أما فيما يتعلق بالمستخلصات المتحصل عليها بواسطة soxhlet أظهرت معايرة المركبات الفينولية أنها غنية بالبوليفينول. إن تقييم نشاط مضاد الأكسدة للزيوت الأساسية و المستخلصات المدروسة أظهر أن هذه الأخيرة تملك نشاط مضاد الأكسدة يتعلق بتركيبها الكيميائية وأن هذا النشاط أكثر فعالية في المستخلصات. من بين مختلف النباتات المدروسة؛ الزعتر هو الأكثر نشاط و هذا بفعالية مضادة للأكسدة، مضادة للميكروبات و مضادة للالتهابات جد قوية. بينت النتائج المتحصل عليها لعينات الزيوت الأساسية المستخلصة في أوقات مختلفة أن التقطير لفترات طويلة ضروري لمعرفة التركيب الكمي والنوعي للزيوت. فيما تشير نتائج دراسة تأثير الإشعاع على الزيوت الأساسية أن هذا العلاج لا يؤثر على جودتها. سيكون إذا من مثير الاهتمام استخدام الأشعة غاما للحفاظ على التوابل والنباتات العطرية ذو فعالية بيولوجية قوية.

**الكلمات الأساسية:** *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, *Origanum floribundum*, *Calamintha nepeta*, *Visnaga daucoides*, CG و CG-SM, مدة التقطير, الإشعاع, الفعالية البيولوجية.

## Abstract

In order to study the biological activities of the active substances of medicinal and aromatic plants for the purpose to replace chemical preservatives; we studied four species respectively named: *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, *Calamintha nepeta*, *Origanum floribundum* and *Visnaga daucoides*. The qualitative and semi-quantitative analysis of the essential oils extracted by hydrodistillation was performed by GC and GC-MS, and permitted to identify and quantify the components of these oils. The determination of phenolic compounds of the extracts obtained by soxhlet showed that they possess high concentration of polyphenols. The evaluation of the antioxidant activity of essential oils and extracts pointed out that both of them have an antioxidant potency related to their chemical compositions and the extracts are more active than oils. Among the studied species, oregano was the most active with a strong antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities. Considering the results obtained for oregano samples extracted by different hydrodistillation times, we concluded that extended distillation is necessary to identify the complete chemical composition of the essential oil both qualitative and quantitative. The results obtained regarding the effect of irradiation on the essential oils shows that this treatment does not affect the quality of the oils. It would be very interesting to use irradiation with gamma radiation for decontamination and conservation of spices and aromatic plants with high biological potential.

**Key words:** *Teucrium polium* subsp. *capitatum*, *Origanum floribundum*, *Calamintha nepeta*, *Visnaga daucoides*, CPG/CG-SM, hydrodistillation duration, biological activities.