

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE

EL-HARRACH -ALGER-

## THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES AGRONOMIQUES

Présentée par :

M<sup>me</sup> ALLOUN Kahina

Thème :

**Composition Chimique et activités biologiques de métabolites secondaires de *Crithmum maritimum* L., de *Melissa officinalis* L. et de *Thymus pallescens* de Noé et effet de l'irradiation gamma sur les huiles essentielles du thym**

Soutenue publiquement le 05/05/2019

Devant le jury composé de

Mme MOUHOUCHE F.

Professeur à l'ENSA

Président

M. BENCHABANE O.

MCA à l'ENSA

Directeur de thèse

Mme SAHRAOUI N.

MCA à USTHB

Examineur

M. FERHAT M. A.

Professeur à l'ENS

Examineur

M. BENCHABANE A.

Professeur à l'ENSA

Examineur

M. AOUCHE A.

MCA à l'ESSAIA

Examineur

Année universitaire : 2018 / 2019

## Remerciements

*Dieu, merci de m'avoir donné la vie, puis la faculté d'accomplir la noble tâche d'apprendre, d'aimer le savoir et le courage de continuer dans ce chemin dans les moments les plus difficiles et pour cela je te remercie.*

*Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer à Mr **Hazzit Mohamed** professeur à l'ENSA ma profonde reconnaissance pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ce cursus. Son expérience, sa patience et sa disponibilité m'ont été bénéfiques. Ses précieux conseils et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche. C'était aussi pour moi un grand avantage d'appartenir à son équipe de recherche. Qu'il trouve ici toute mon affection et mes remerciements pour sa présence permanente.*

*Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse Mr **Benchabane Otmane** maitre de conférences à l'ENSA pour m'avoir accordé l'honneur de diriger ce travail, pour son soutien et l'intérêt qu'il a continuellement porté pour cette étude, ses conseils, ses encouragements et sa constante disponibilité m'ont été d'un grands intérêt.*

*Ma plus profonde gratitude va à Mme **Mouhouche Fazia** professeur à l'ENSA, d'abord pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Phytopharmacie de l'ENSA, ensuite pour son aide précieuse dans l'étude de l'activité insecticide et enfin de m'avoir honoré en acceptant de présider le Jury.*

*J'exprime mes remerciements à Mr **Ferhat Mohamed-Amine** professeur à l'ENS d'avoir accepté de juger mon travail.*

*Je suis profondément reconnaissante à Mr **Benchabane Ahmed** professeur à l'ENSA qui a aimablement accepté de faire partie du jury.*

*Je tiens à remercier Mme **Sahraoui Naima** maitre de conférences à l'USTHB pour avoir bien voulu examiner et juger mon travail.*

*Je remercie également Mr **Aouiche Adel** maitre de conférences à l'ENSSAIA pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner et d'évaluer ce travail.*

*Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

*A tous, un grand Merci*

## DEDICAEES

---

❖ *Aux mémoires des chers disparus :*

*Mes grands-parents « Malika et Abderrahmane »*

*Et ma tante « Farida »;*

*Que le bon dieu leur accorde sa miséricorde et les accueille dans son vaste paradis.*

❖ *A mes très chers parents ; que j'aime et que je respecte énormément ; je ne pourrais jamais assez leurs exprimé mon amour et ma reconnaissance.*

❖ *A mon frère ;*

❖ *A mon mari et mon bout de chou « Simou »;*

❖ *A toute ma famille, ainsi que ma belle-famille ;*

❖ *A tous mes Amis.*

*« A vous tous je vous dédis ce travail pour vous témoigner toute ma gratitude »*

*Kahina*



# Table des matières

## Liste des tableaux

## Liste des figures

## Liste des abréviations

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b> .....	3
<b>Chapitre I : Substances actives</b> .....	3
1. Huiles essentielle.....	3
1.1. Bref Historique.....	3
1.2. Production mondiale.....	3
1.3. Définition et caractéristiques.....	4
1.4. Procèdes d'extraction des HE.....	6
A. Expression à froid.....	6
B. Distillation.....	6
C. Distillation assistée par micro-ondes et ultrasons.....	8
D. Enflourage.....	8
E. Incision.....	9
1.5. Composition chimique et biosynthèse.....	9
1.5.1. Composition chimique des HE.....	9
a. Les composés terpéniques.....	9
b. Les composés aromatiques.....	10
c. Les composés d'origines variées.....	10
1.5.2. Biosynthèse des constituants des HE.....	10
1.6. Analyse des Huiles essentielles.....	14
1.6.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	14
1.6.2. Spectroscopie de masse (SM).....	15
1.6.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).....	16
1.7. Données Toxicologiques.....	17
1.8. Principaux domaines d'application des huiles essentielles.....	18
2. Les composés phénoliques ou polyphénols.....	20
2.1. Généralités.....	20
2.2. Définition et classification des composés phénoliques.....	20
2.2.1. Définition.....	20
2.2.2. Classification des composés phénoliques.....	20
a. Anthocyanosides.....	24
b. Tanins.....	25
c. Flavonoïdes.....	26
2.3. Intérêt biologique des composés phénoliques.....	30
2.4. Les composés phénoliques et la santé de l'homme.....	32
<b>Chapitre II : Monographie des espèces étudiées</b> .....	33
1. Le Fenouil marin ou la Criste marine « <i>Crithmum maritimum</i> L.».....	33
1.1. Généralités.....	33
1.2. Historique.....	33
1.3. Caractéristiques botaniques.....	34
1.3.1. Description de la plante.....	34
1.3.2. Classification botanique.....	34
1.3.3. Habitats et culture.....	35
1.4. Principaux constituants du fenouil marin.....	35
1.5. Effets et usages médicaux.....	35
2. La Mélisse « <i>Melissa officinalis</i> L.».....	36
2.1. Généralités.....	36
2.2. Histoire et tradition.....	36
2.3. Caractéristiques botaniques.....	37
2.3.1. Description de la plante.....	37
2.3.2. Classification botanique.....	38
2.3.3. Habitat et culture.....	39
2.4. Les principaux constituants de la Mélisse.....	39
2.4.1. Les principaux effets de la Mélisse.....	40
2.5. Usages traditionnel et courant de la Mélisse.....	40

# Table des matières

3.	Le Thym « <i>Thymus pallesecns</i> de Noé ».....	41
3.1.	Généralités.....	41
3.2.	Étymologie.....	41
3.3.	Histoire.....	41
3.4.	Caractéristiques botaniques.....	42
3.4.1.	Description de la plante.....	42
3.4.2.	Classification botanique.....	42
3.4.3.	Habitat et culture.....	43
3.5.	Les principaux constituants du Thym.....	43
3.5.1.	Les principaux effets du Thym.....	43
3.6.	Usages traditionnels et courants du Thym.....	44
	<b>Chapitre III : Procédé d'irradiation.....</b>	<b>45</b>
	Introduction sur l'ionisation des denrées alimentaire.....	45
1.	Définition de l'irradiation des aliments.....	45
2.	Historique.....	46
3.	Types de rayonnement.....	46
4.	Le processus d'irradiation des aliments.....	49
5.	Les mécanismes d'action des rayonnements ionisants.....	50
5.1.	Interaction des rayonnements et de la matière.....	50
5.2.	Effets du rayonnement sur le milieu.....	51
5.2.1.	Dose et débit de dose.....	51
5.2.2.	Sources de rayonnements ionisants.....	52
5.3.	Effets chimique.....	53
5.4.	Effets biologique.....	54
6.	Principales applications et limitations de l'ionisation.....	55
6.1.	Les applications.....	55
6.2.	Les limitations.....	55
	<b>Chapitre IV : Activité antioxydante.....</b>	<b>56</b>
	Introduction.....	56
1.	Les antioxydants ou antioxygènes.....	56
1.1.	Définition.....	56
1.2.	Caractéristiques des antioxydants.....	57
1.3.	Types d'antioxydants.....	58
1.3.1.	Classement des antioxydants selon l'origine.....	58
a.	Antioxydants de synthèse.....	58
b.	Antioxydants naturel.....	58
1.3.2.	Classement des antioxydants selon leurs mécanismes d'action.....	59
a.	Les antioxydants de type I.....	59
b.	Antioxydant de type II.....	59
c.	Les antioxydants de type III.....	59
d.	Les agents synergiques.....	59
e.	Enzymes comme antioxydants.....	60
1.4.	Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	60
1.4.1.	Analyses des peroxydes.....	61
1.4.2.	Mesure de l'oxydation des lipides.....	62
1.4.3.	Mesure du pouvoir chélateur et réducteur.....	62
1.4.4.	Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH.....	63
2.	Stress oxydatif.....	63
2.1.	Définition du stress oxydatif.....	63
2.2.	Les espèces oxygénées réactives (EOR).....	63
2.3.	Les radicaux libres.....	64
2.3.1.	Définition.....	64
2.3.2.	Les principaux radicaux libres.....	64
2.3.3.	Origine des radicaux.....	65
2.4.	Stress oxydant et ses conséquences biologiques.....	65
	<b>Chapitre V : Activité antimicrobienne.....</b>	<b>68</b>
	Introduction.....	68

# Table des matières

1. Principaux agents antimicrobiens.....	68
1.1. Agents physiques.....	68
1.2. Les agents chimiques.....	69
1.3. Les agents biologiques.....	69
2. Détermination de l'activité antimicrobienne.....	69
2.1. Principales méthodes.....	70
3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne.....	72
3.1. Nature et état du micro-organisme.....	72
3.2. Rôle de l'environnement.....	72
4. Activité antimicrobienne des HE.....	73
4.1. Propriétés antibactériennes des HE.....	73
4.1.1. Propriétés antibactériennes sur les bactéries pathogènes présentes parfois dans les aliments.....	73
4.1.2. Propriétés antibactériennes sur les bactéries utiles à la transformation des aliments.....	73
4.1.3. Mécanisme d'action sur les bactéries.....	74
4.2. Propriétés antifongiques des HE.....	74
4.2.1. Activité sur les moisissures.....	74
4.2.2. Activité sur les levures.....	75
5. Activité antimicrobienne des extraits éthanoliques.....	75
6. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne.....	76
6.1. Effet de la température.....	76
6.2. Le pH.....	76
7. Applications des HE sur les aliments.....	77
<b>Chapitre VI : Activité insecticide.....</b>	<b>78</b>
Introduction.....	78
1. Historique.....	78
2. Pouvoir insecticide des extraits végétaux.....	79
2.1. Action des huiles essentielles.....	79
2.2. Modes de pénétration des HE dans l'insecte.....	80
2.3. Moyens de lutte.....	81
2.3.1. Les méthodes traditionnelles.....	81
2.3.2. La lutte chimique.....	81
2.3.3. La lutte biologique.....	82
2.4. Aperçu bioécologiques des insectes.....	82
2.4.1. La Bruche de Niébé « <i>Callosobruchus maculatus</i> F.».....	82
2.4.2. Dendroctone de la farine « <i>Tribolium confusum</i> Duval ».....	85
<b>Partie 2 : Etude expérimentale.....</b>	<b>88</b>
<b>Chapitre I : Matériels et Méthodes.....</b>	<b>88</b>
1. Matériels.....	88
1.1. Matériel végétal.....	88
1.2. Matériel microbiologique.....	88
1.3. Matériel entomologique.....	89
2. Méthodes.....	90
2.1. Procédé d'irradiation des échantillons de thym.....	90
2.2. Extraction des huiles essentielles.....	91
2.2.1. Protocole expérimental d'extraction.....	91
2.1.1. Rendement de l'extraction.....	91
2.3. Extraction des composés phénoliques.....	91
2.3.1. Mode opératoire.....	92
2.3.2. Le taux d'extraction.....	92
2.4. Caractéristiques des HE.....	93
2.4.1. Propriétés organoleptiques.....	93
2.4.2. Indices physico-chimiques.....	93
2.4.3. Densité relative à 20°C: Norme NF T 75 - 111.....	93
2.4.4. Indice de réfraction à 20°C: Norme NF T 75 -112.....	93
2.5. Analyse qualitative et semi-quantitative des HE par CPG et CPG/SM.....	93
2.5.1. Analyse qualitative des HE par chromatographie en phase gazeuse seule.....	93
2.5.2. Analyse semi-quantitative des HE par CG/SM.....	94
2.6. Dosage des composés phénoliques.....	95
2.6.1. Dosage des phénols totaux.....	95

# Table des matières

2.6.2.	Dosage des flavonoïdes.....	96
2.7.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	96
2.7.1.	Activité de piégeage du radical DPPH (2,2-Diphényl-1- picrylhydrazyl).....	96
2.7.2.	Pouvoir réducteur.....	97
2.7.3.	Piégeage du radical-cation ABTS <sup>+</sup> .....	98
2.7.4.	Test des substances réactives à l'aide de l'acide thiobarbiturique « TBARS ».....	99
2.8.	Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	102
2.8.1.	Etude qualitative : détermination de l'effet inhibiteur des HE étudiées.....	102
2.8.2.	Etude quantitative : détermination de la CMI & CMB de l'HE de mélisse.....	103
A.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	103
B.	Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	106
2.9.	Evaluation de l'activité insecticide.....	106
2.9.1.	Estimation de la toxicité des HE par contact.....	106
2.9.2.	Estimation de la toxicité des HE par inhalation.....	107
2.9.3.	Expression des résultats.....	108
2.10.	Analyse statistique.....	108
<b>Chapitre II : Résultats et discussion.....</b>		<b>109</b>
1.	Rendement d'extraction en HE des plantes étudiées.....	109
2.	Taux d'extraction des composés phénoliques.....	112
3.	Caractéristiques physico-chimiques.....	114
4.	Analyse qualitative et semi-quantitative des HE étudiées.....	115
4.1.	L'analyse qualitative et semi-quantitative de l'HE du fenouil marin.....	115
4.2.	L'analyse qualitative et semi-quantitative de l'HE de Mélisse.....	119
4.3.	L'analyse qualitative et semi-quantitative des échantillons de l'HE Thym.....	126
5.	Dosage des Polyphénols des extraits étudiés.....	129
5.1.	Les phénols totaux.....	129
5.2.	Dosage des flavonoïdes.....	130
6.	Activités biologique.....	134
6.1.	Activité antioxydante des HE étudiées.....	134
6.1.1.	Résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH des HE de <i>Crithmum maritimum</i> L. et de <i>Melissa officinalis</i> L.....	134
6.1.2.	Résultats du test du pouvoir réducteur des HE de <i>Crithmum maritimum</i> L. et de <i>Melissa officinalis</i> L.....	136
6.1.3.	Résultats de l'activité de piégeage du radical ABTS <sup>+</sup> par les HE de <i>Crithmum maritimum</i> L. et de <i>Melissa officinalis</i> L.....	138
6.1.4.	Discussion sur de l'activité antioxydante des HE <i>Crithmum maritimum</i> L. et de <i>Melissa officinalis</i> L.....	139
6.1.5.	Activité antioxydante des HE de <i>Thymus palleescens</i> de Noé.....	141
6.2.	Activité antimicrobienne.....	142
6.2.1.	Activité antimicrobienne de l'HE de <i>Melissa officinalis</i> L.....	142
6.2.2.	Activité antimicrobienne de <i>Thymus palleescens</i> de Noé.....	147
6.3.	Activité insecticide des HE étudiées.....	150
6.3.1.	Activité insecticide des HE de <i>Crithmum maritimum</i> L. et de <i>Melissa officinalis</i> L.....	150
6.3.2.	Activité insecticide des échantillons d'HE <i>Thymus palleescens</i> de Noé.....	158
6.3.3.	Discussion sur de l'activité insecticide des plantes étudiées.....	165
<b>Conclusion générale.....</b>		<b>167</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>		<b>171</b>

## *Liste des Figures*

<b>Figure 01:</b> Biosynthèse de l'AcétoacétylCoA.....	11
<b>Figure 02:</b> Biosynthèse de l'Acide mévalonique.....	11
<b>Figure 03:</b> Schéma global de la biosynthèse des terpènes par voie de l'acide mévalonique.....	12
<b>Figure 04:</b> Exemple de biosynthèse des dérivés phenylpropanes.....	13
<b>Figure 05:</b> Structure de l'acide cinnamique.....	22
<b>Figure 06:</b> Structure de quelques composés phénoliques.....	24
<b>Figure 07:</b> Structures chimiques de quelques anthocyanidines.....	24
<b>Figure 08:</b> Structure générale des flavonoïdes.....	27
<b>Figure 09:</b> Biosynthèse des Flavonoïdes.....	30
<b>Figure 10:</b> <i>Crithmum maritimum</i> L.....	34
<b>Figure 11:</b> <i>Melissa officinalis</i> L.....	38
<b>Figure 12:</b> Spectre électromagnétique.....	48
<b>Figure 13:</b> Interaction des rayonnements ionisants avec la matière.....	51
<b>Figure 14:</b> Illustration de la méthode des microatmosphères.....	70
<b>Figure 15:</b> Différents états de <i>T. confusum</i> Duval.....	86
<b>Figure 16:</b> Schéma de l'irradiateur pilote de CRNA.....	90
<b>Figure 17:</b> Montage de l'extraction solide-liquide par soxhlet.....	92
<b>Figure 18:</b> Protocole de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.....	98
<b>Figure 19:</b> Génération du radical-cation ABTS <sup>•+</sup> avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH).....	99
<b>Figure 20:</b> Protocole de mise en œuvre du test TBARS.....	101
<b>Figure 21:</b> Schéma simplifié du principe de la méthode des aromagrammes.....	102
<b>Figure 22:</b> Méthode de détermination de la CMI en milieu solide.....	105
<b>Figure 23:</b> Chromatogramme CG-SM de l'HE de <i>Crithmum maritimum</i> .....	117
<b>Figure 24:</b> Chromatogramme CG-SM agrandi de l'HE de <i>Crithmum maritimum</i> .....	117
<b>Figure 25:</b> Histogramme des différents constituants de l'HE de <i>C. maritimum</i> .....	118
<b>Figure 26:</b> Histogramme des différentes classes chimiques de l'HE de <i>C. maritimum</i> .....	118
<b>Figure 27:</b> Histogramme des constituants majoritaires de l'HE de <i>C. maritimum</i> .....	119
<b>Figure 28:</b> Chromatogramme CG-SM de l'HE de <i>Melissa officinalis</i> L.....	122
<b>Figure 29:</b> Chromatogramme CG-SM agrandi de l'HE de <i>Melissa officinalis</i> L.....	122
<b>Figure 30:</b> Histogramme des différents constituants de l'HE de <i>Melissa officinalis</i> L.....	123
<b>Figure 31:</b> Histogramme des différentes classes chimiques de l'HE de <i>M. officinalis</i> L.....	123
<b>Figure 32:</b> Histogramme des constituants majoritaires de l'HE de <i>M. officinalis</i> L.....	124
<b>Figure 33:</b> Histogramme des constituants des différents échantillons de <i>Thymus pallescens</i> de Noé.....	127
<b>Figure 34:</b> Histogramme des constituants majoritaires des différents échantillons de <i>Thymus pallescens</i> de Noé.....	127
<b>Figure 35:</b> Courbe d'étalonnage des phénols totaux.....	131
<b>Figure 36:</b> Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	130
<b>Figure 37:</b> Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de <i>Crithmum maritimum</i> L. et <i>Melissa officinalis</i> L.....	131
<b>Figure 38:</b> Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits des échantillons de <i>Thymus pallescens</i> de Noé.....	132
<b>Figure 39:</b> Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	135
<b>Figure 40:</b> Résultats du piégeage du radical DPPH par le BHT, le tocophérol et les HE testées.....	136
<b>Figure 41:</b> Résultats du test du pouvoir réducteur du BHT et des HE étudiées.....	137
<b>Figure 42:</b> Résultats du piégeage du radical ABTS par les HE testées et le TOLOX.....	139
<b>Figure 43:</b> Diamètres des zones d'inhibition de l'HE testée, la Ciprofloxacine et la Piperacilline.....	143
<b>Figure 44:</b> Détermination des TL <sub>30</sub> et TL <sub>50</sub> de l'HE <i>Crithmum maritimum</i> L. par effet d'inhalation vis à vis de <i>C. maculatus</i> F.....	152
<b>Figure 45:</b> Détermination des TL <sub>30</sub> et TL <sub>50</sub> de l'HE <i>Melissa officinalis</i> L. par effet d'inhalation vis à vis de <i>C. maculatus</i> F.....	153
<b>Figure 46:</b> Temps léthal causant la mort de 30% (TL <sub>30</sub> ) et 50% (TL <sub>50</sub> ) des individus de <i>C. maculatus</i> F.....	153
<b>Figure 47:</b> Détermination des DL <sub>30</sub> et DL <sub>50</sub> de l'HE <i>Crithmum maritimum</i> L. par effet de contact vis à vis de <i>C. maculatus</i> F.....	156
<b>Figure 48:</b> Détermination des DL <sub>30</sub> et DL <sub>50</sub> de l'HE <i>Melissa officinalis</i> L. par effet de contact vis à vis de <i>C. maculatus</i> F.....	157
<b>Figure 49:</b> Dose létale causant la mort de 30% (DL <sub>30</sub> ) et 50% (DL <sub>50</sub> ) des individus de <i>C. maculatus</i> F.....	157
<b>Figure 50:</b> Détermination des TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé non irradié par effet d'inhalation vis à vis de <i>T. confusum</i> Duv.....	158



## Liste des Figures

---

<b>Figure 51:</b> Détermination des TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé irradié 5 kGy par effet d'inhalation vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	159
<b>Figure 52:</b> Détermination des TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé irradié 10 kGy par effet d'inhalation vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	159
<b>Figure 53 :</b> Détermination des TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé irradié 20 kGy par effet d'inhalation vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	160
<b>Figure 54 :</b> Détermination des TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé irradié 30 kGy par effet d'inhalation vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	160
<b>Figure 55 :</b> Temps létale causant la mort de 50% (TL <sub>50</sub> ) et 90% (TL <sub>90</sub> ) des individus de <i>T.confusum</i> Duv....	161
<b>Figure 56 :</b> Détermination des DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé non irradié par effet de contact vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	162
<b>Figure 57 :</b> Détermination des DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé irradié 5 kGy par effet de contact vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	162
<b>Figure 58:</b> Détermination des DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé irradié 10 kGy par effet de contact vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	163
<b>Figure 59 :</b> Détermination des DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé irradié 20 kGy par effet de contact vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	163
<b>Figure 60 :</b> Détermination des DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> de l'HE <i>Thymus pallescens</i> de Noé irradié 5 kGy par effet de contact vis à vis de <i>T.confusum</i> Duv.....	164
<b>Figure 61 :</b> Concentration létale causant la mort de 50% (DL <sub>50</sub> ) et 90% (DL <sub>90</sub> ) des individus de <i>T.confusum</i>	164

## Liste des Tableaux

---

<b>Tableau 01:</b> Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux pays producteurs dans le monde en 2008 .....	04
<b>Tableau 02:</b> Les dérivés de l'acide benzoïque : Acides hydroxybenzoïques.....	22
<b>Tableau 03:</b> Les dérivés de l'acide cinnamique : Acides hydroxycinnamiques.....	23
<b>Tableau 04:</b> Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe.....	28
<b>Tableau 05:</b> Activités biologiques des composés phénoliques.....	31
<b>Tableau 06:</b> Force des rayonnements.....	47
<b>Tableau 07:</b> Les effets biochimiques induits par les traitements ionisants.....	54
<b>Tableau 08:</b> Propriété des antioxygènes.....	57
<b>Tableau 09:</b> Quelques antioxydants synthétiques et leurs effets sur la santé humaine.....	60
<b>Tableau 10:</b> Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes.....	64
<b>Tableau 11:</b> Le matériel végétal utilisé.....	88
<b>Tableau 12:</b> Caractéristiques des souches microbiennes testées.....	89
<b>Tableau 13:</b> Rendement en HE des espèces étudiées (ml/100 g. matière végétale).....	109
<b>Tableau 14:</b> Rendements d'extraction en HE de mélisse selon la provenance.....	110
<b>Tableau 15:</b> Rendement en extrait végétal des plantes étudiées.....	112
<b>Tableau 16:</b> Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des HE étudiées.....	114
<b>Tableau 17:</b> Composition chimique de l'HE de <i>Crithmum maritimum</i> L.....	115
<b>Tableau 18:</b> Composition chimique de l'HE de <i>Melissa officinalis</i> L.....	120
<b>Tableau 19:</b> Comparaison des teneurs en constituants majoritaire de l'HE de mélisse selon la provenance.....	125
<b>Tableau 20:</b> Composition chimique des HE de <i>Thymus pallescens</i> de Noé non irradiés et irradiés.....	126
<b>Tableau 21:</b> Teneur en polyphénols totaux des extraits étudiés.....	130
<b>Tableau 22:</b> Teneur en flavonoïdes des extraits étudiés.....	131
<b>Tableau 23:</b> Teneur en composés phénoliques de deux échantillons de <i>C. maritimum</i> L.....	133
<b>Tableau 24:</b> Comparaison des teneurs en phénols totaux de trois extraits de <i>M.officinalis</i> L.....	133
<b>Tableau 25:</b> Activité de piégeage du radical DPPH par les HE étudiées, le BHT et du tocophérol.....	135
<b>Tableau 26:</b> Résultats du test du pouvoir réducteur du BHT et des HE étudiées.....	136
<b>Tableau 27:</b> Résultats du test d'inhibition du radical ABTS <sup>•+</sup> par les HE étudiées et le TROLOX.....	138
<b>Tableau 28:</b> Résultats des concentrations inhibitrices de 50% des radicaux des HE étudiées, du BHT et du TROLOX.....	141
<b>Tableau 29:</b> Sensibilité des souches étudiées à l'HE de mélisse.....	142
<b>Tableau 30:</b> Evaluation des CMI de l'HE de mélisse.....	145
<b>Tableau 31:</b> Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) de l'HE de mélisse.....	145
<b>Tableau 32:</b> Concentration Minimales Bactéricides (CMB) de l'HE de mélisse.....	145
<b>Tableau 33:</b> Rapports CMB/CMI de l'HE de mélisse.....	146
<b>Tableau 34:</b> Sensibilité des souches étudiées aux échantillons de <i>Thymus pallescens</i> .....	149
<b>Tableau 35:</b> Evaluation de la toxicité par inhalation des HE de fenouil marin et de mélisse vis-à-vis de <i>C.maculatus</i> F.....	151
<b>Tableau 36:</b> TL <sub>30</sub> et TL <sub>50</sub> des HE de fenouil marin et de mélisse.....	153
<b>Tableau 37:</b> Evaluation de la toxicité par contact des HE de fenouil marin et de mélisse vis-à-vis de <i>C.maculatus</i> F.....	155
<b>Tableau 38:</b> DL <sub>30</sub> et DL <sub>50</sub> des HE de fenouil marin et de mélisse.....	157
<b>Tableau 39:</b> TL <sub>50</sub> et TL <sub>90</sub> des échantillons de <i>T.pallescens</i> de Noé.....	160
<b>Tableau 40:</b> DL <sub>50</sub> et DL <sub>90</sub> des échantillons de <i>T.pallescens</i> de Noé.....	164

## *Liste et symboles des abréviations*

---

**ABTS** : 2,2- azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)

**AFOR** : Association française de normalisation.

**AIEA**: Agence Internationale de l'Energie Atomique

**AOM**: active oxygen method.

**ATCC** : American Type Collection Culture

**BHA**: Butyl-hydroxy-anisol.

**BHT**: Butyl-hydroxy-toluene.

**CG/SM** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

**Ci** : Curie

**CMB** : Concentration Minimale Bactéricide

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**Co<sup>60</sup>** : Isotope du Cobalt

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse.

**CRD** : Centre de Recherche et du Développement

**CRNA** : Centre de Recherche Nucléaire d'Alger

**DL<sub>30</sub>** : Dose létale de 30% des individus

**DL<sub>50</sub>** : Dose létale de 50% des individus

**DL<sub>90</sub>** : Dose létale de 90% des individus

**DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**EAG** : Equivalent acide gallique

**ENSA** : Ecole Nationale Supérieure Agronomique

**EOR** : Les espèces oxygénées réaction.

**EQ** : Equivalent quercétine

**FAO**: Food and Agriculture Organization of the United Nations

**Y**: Gamma.

**HE** : Huile essentielle

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice de 50% des radicaux

**IK**: Indice de Kovats

**kGy** : Kilo grey

**MH** : Muller Hinton

**O<sub>2</sub>** : Oxygène

**OMS** : Organisation mondiale de la Santé

**pH** : potentiel hydrogène

**ppm** : partie par million

**Rdt HE** : Rendement en huile essentielle

**SAB** : Sabouraud

**SM** : Spectrometrie de masse

**T** : température.

**TBA** : Acide thiobarbiturique.

**TBARS** : Test des substances réactives à l'aide de l'acide thiobarbiturique

**TBHP**: Trihydroxybutyrophénone.

**TBHQ** : Ter-Butyl-hydroxy-quinone.

**TL<sub>30</sub>** : Temps létal de 30% des individus

**TL<sub>50</sub>** : Temps létal de 50% des individus

**TL<sub>90</sub>** : Temps létal de 90% des individus

**V**: volume.

**β** : Beta

## ***Introduction générale***

---

Depuis l'aube de l'humanité, les plantes permettent à l'homme non seulement de se nourrir, se vêtir, se loger, se chauffer, se parfumer, mais aussi, de maintenir son équilibre, soulager ses souffrances, préserver et soigner les maladies qui nuisent à sa santé.

Par ailleurs, les plantes aromatiques et médicinales jouent un rôle économique considérable dans le secteur des industries de l'agroalimentaire, de la parfumerie, des cosmétiques et de la pharmacie (**Bruneton, 1999**).

Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles.

Les huiles essentielles suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, biologiste et médecins en raison de leurs utilisations dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour lesquelles les antibiotiques de synthèse deviennent de moins en moins actifs ou dans la préservation des aliments contre l'oxydation comme alternatives aux produits chimique de synthèses (**Farnsworth et al., 1986; Roux et al., 2007**).

Même si les huiles essentielles sont connues et utilisées depuis plus de 6000 ans, la recherche scientifique actuelle se limite à des recherches fondamentales, phytochimiques ou sur les propriétés biologiques des huiles essentielles.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. Mais la tendance actuelle des consommateurs à rechercher une alimentation plus naturelle, a entraîné un regain d'intérêt des scientifiques pour ces substances. Depuis deux décennies, des études ont été menées sur le développement de nouvelles applications et l'exploitation des propriétés naturelles des huiles essentielles dans le domaine alimentaire.

Cependant, l'évaluation de leurs propriétés biologiques comme antioxydants, antimicrobiens et insecticides, demeure une tâche très intéressante et très utile.

L'oxydation des produits alimentaires lors de leurs fabrications et stockage conduit à la formation de radicaux libres très nocifs pour la santé humaine et donc l'ajout d'antioxydant devient nécessaire. Cependant, les antioxydants les plus utilisés comme le BHT et le BHA peuvent être toxiques (**Yu et al., 2000**). En effet, le BHA convertirait certains produits ingérés

en substances toxiques ou carcinogènes en augmentant la sécrétion des enzymes microsomaux du foie et des organes extra-hépatiques.

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20<sup>ème</sup> siècle pour que les *scientifiques* commencent à s'y intéresser. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction d'huiles essentielles et aux composés phénoliques contenus dans les plantes.

Aussi, avec la révolution dans le domaine agro-alimentaire, la production alimentaire doit être maximisée afin d'assurer une alimentation adéquate de la population mondiale. Pour ce faire, elle doit réduire l'abondance des espèces animales qui sont en compétition alimentaire avec elle. Parmi ces animaux, les invertébrés dont les insectes représentent le groupe le plus diversifié et le plus riche en nombre d'espèces. Les insectes ravageurs des denrées alimentaires stockées peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et/ou la quantité des produits stockés. D'après l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'Agriculture (FAO), les pertes dues aux insectes nuisibles correspondent à 35% de la production agricole mondiale (**Dossevi et Essou, 2011**). Il est donc, plus utile et plus rentable d'assurer une bonne conservation des récoltes que de compenser les pertes par une augmentation de la production.

Les plantes sur lesquelles notre choix s'est porté sont, la Criste marine (*Crithmum maritimum*), la Mélisse (*Melissa officinalis*) et le Thym (*Thymus pallezens*) provenant respectivement des trois régions d'Algérie : **Hammamet (Alger), Sétif et Bouira (Kadiria)**.

Au cours de ce travail, nous essayerons de :

- ✓ Traiter par rayons gamma l'échantillon de Thym séchés
- ✓ Évaluer le rendement des huiles essentielles et des extraits
- ✓ Déterminer certaines caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles extraites par hydrodistillation.
- ✓ Analyser qualitativement et quantitativement les huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (CPG) seule et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).
- ✓ Évaluer les activités biologiques des différentes essences étudiées.

## Chapitre I : Substances actives

---

### 1 Les huiles essentielles

#### 1.1 Bref Historique

L'utilisation des huiles essentielles remonte aux plus anciennes civilisations, tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient et par la suite au nord de l'Afrique et en Europe. Il y a environ 3000 ans, les huiles essentielles étaient utilisées en Egypte. Les arabes participèrent activement aux techniques de distillation des HE, ils inventèrent l'alambic grâce auquel, ils purent obtenir des HE très pures dont la médecine et la parfumerie en fait grand usage (**Odoul, 2003**).

Au 16<sup>ème</sup> siècle, le médecin Suisse Paracelse étudia l'extraction de «l'âme» des végétaux à laquelle on donna le nom « d'esprit d'essence », ensuite « l'huile essentielle ». En 1877, Léopold Ruzicka a mis en évidence les « polyterpènes », composants importants des essences.

En 1928, le chimiste français René-Maurice Gattefosse a utilisé le terme "aromathérapie" pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main (**Garneau, 2005**). Le terme de l'aromathérapie a mené vers de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (**Besombes, 2008**).

De nos jours, l'usage des huiles essentielles est très large dans les domaines de la pharmacologie, la cosmétique, l'agroalimentaire et la protection des végétaux.

#### 1.2 Production mondiale

Plusieurs pays tirent une grande partie de leurs ressources de l'exploitation des plantes à huiles essentielles. On estime aujourd'hui à environ 40 000 le nombre d'espèces aromatiques croissant dans le monde dont 3000 ont été étudiées et 300 sont exploitées industriellement (**Souza et al., 2006b**). Plus de 90 % des espèces à étudier et à valoriser poussent dans les pays tropicaux (**Ouamba, 1991**). Les principales huiles essentielles produites et les principaux pays producteurs sont résumés dans le tableau 01.

**Tableau 01:** Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux pays producteurs dans le monde en 2008 (**Perfumer & Flavorist, 2009**).

Huiles essentielles	Production (Tonnes)	Principaux producteurs
Huile d'orange	51000	USA, Brésil, Argentine
Huile de citron	9200	Argentine, Italie, Espagne
Huile de l'eucalyptus	4000	Chine, Inde, Australie, Afrique du Sud
Huile de menthe poivrée	3300	Inde, USA, Chine
Huile du clou de girofle	1800	Indonésie, Madagascar
Essence de la citronnelle	1800	Chine, Sri Lanka
Huile de la menthe verte	1800	USA, Chine
Huile du bois de cèdre	1650	USA, Chine
Huile du patchouli	1200	Indonésie, Inde
Huile de la lavande	1100	France

### 1.3 Définition et caractéristiques

Le terme « huile essentielle » a été inventé au 16<sup>ième</sup> siècle par le médecin Suisse Parascelsus Von HOHENHEIM pour désigner le principe actif d'un remède naturel (**Burt, 2004**). De très nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles essentielles. D'après **William Naves [1874-1936]**, aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite de la clarté, ni celui de la précision. Cet auteur définit les huiles essentielles comme « des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passent avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau » (**Garnéro, 1996**). Cette définition a été reprise à peu de choses près par AFNOR et ISO : « l'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe frais de certains agrumes, soit par distillation. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques » (**ISO, 1997; 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.

Il reste difficile d'attribuer une seule définition au terme « huile essentielle », car il en existe plusieurs. D'après **Anton, Lobstein, 2005**, L'HE est le résultat de la distillation à la vapeur d'eau des plantes ou d'arbres aromatiques pour en extraire l'essence. L'HE est donc l'essence distillée.



Toutefois dans l'usage courant le terme « essence » est souvent utilisé pour parler d'HE. Mais Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce).

Les HE peuvent être stockées dans tous les organes végétaux Fleur (Origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorce (cannelier), bois (bois de rose, santal), racine (vétiver), rhizome (acore), fruit (badiane) ou graine (carvi). Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes, la composition pouvant varier d'un organe à l'autre (exemple : fruit et fleur du citronnier) (**Henandez Ochoa L.R., 2005**).

La synthèse et l'accumulation d'une huile essentielle sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface du végétal (**Bruneton, 1987**). Il existe en fait quatre structures sécrétrices:

- **Cellules sécrétrices:** chez les Lauracées, Zingibéracées, poils glandulaires épidermiques : les plantes possédant ces poils font partie des familles des Lamiacées, des Géraniacées, des Verbénacées.
- **Les poches sphériques schizogènes :** les glandes de type poche se rencontrent chez les familles des Astéracées, Hypricacées, Rosacées, Rutacées, Myrtacées,...
- **Les canaux glandulaires lysigènes :** on les retrouve chez les Conifères, Ombellifères,...

Les HE forment un groupe très homogène en ce qui concerne leurs propriétés physico-chimiques qui sont les suivantes : (**Bruneton, 1993; Bernard et al., 1988**).

- Elles sont généralement liquides à température ambiante.
- Elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes.
- Elles sont volatiles et très rarement colorées.
- La densité des HE à forte teneur en monoterpènes est faible.
- L'indice de réfraction dépend essentiellement de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indicé élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse.
- Elles sont solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau.
- La solubilité dans l'éthanol à 80 % est en relation directe avec la teneur en hydrocarbures aliphatiques, mono et sesquiterpènes. Plus leur teneur est élevée et plus la solubilité est faible.

- Elles sont douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques.

Les HE sont très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux.

#### 1.4 Procédés d'extraction des HE

De nombreux procédés sont utilisés 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).

##### A. Expression à froid

Cette technique est utilisée industriellement pour l'obtention d'huile essentielle d'agrumes. En général, on couple la récupération d'huile essentielle avec l'extraction du jus. Le principe consiste à rompre les poches à essences par un moyen mécanique, pression, incision ou abrasion à froid. L'huile essentielle entraînée par un courant d'eau sera séparée par décantation ou centrifugation (Richard et Multon, 1992).

##### B. Distillation

L'extraction à la vapeur d'eau, connue depuis la plus haute antiquité, transmise par les arabes et perfectionnée par les Grassois, est un procédé utilisant la vapeur d'eau pour séparer les substances aromatiques.

###### • Hydrodistillation

Ce mode d'extraction a été proposé 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 (Bruneton, 1993).

La partie de la plante contenant la molécule à extraire est placée dans un ballon avec de l'eau et quelques morceaux de pierre ponce pour assurer le brassage de la solution. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense. Elle est ensuite récupérée dans une ampoule à décanter où il est possible de distinguer deux phases bien distinctes, l'huile essentielle et en dessous l'eau aromatique (ou hydrolat) chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée (Bachelot et al., 2006).

L'extraction qui s'effectue à température élevée et à pH acide durant une période plus ou moins longue peut engendrer des réactions secondaires au sein de l'HE à savoir : hydrolyse, élimination, cyclisation et réarrangement (**Benhabiles, 1995**).

- **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 l'osmose et la diffusion libre (**Guenther, 1972**).

- **Distillation par solvants organiques**

Certaines huiles essentielles ont une densité voisine de l'eau et le procédé par distillation à la vapeur d'eau ne peut être dans ce cas utilisé. Le principe consiste à faire macérer la plante dans un solvant afin de faire passer les substances odorante dans le solvant.

- ✚ **Solvants issus du pétrole**

Ce moyen met en œuvre des solvants organiques comme le pentane, l'hexane, l'heptane. Il est réservé aux huiles essentielles ayant une densité voisine de celle de l'eau.

- ✚ **Forane**

Le forane 113 (F<sub>2</sub>CCl-CCl<sub>2</sub>F) permet d'extraire un mélange d'HE et d'huile lipidique en même temps, ce qui permet de valoriser doublement la plante.

- ✚ **Dioxyde de carbone**

La technique d'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique est connue et utilisée au niveau industriel depuis de nombreuses années. Elle trouve un intérêt tout particulier au niveau des produits naturels, car elle conduit à des extraits « cœur de la nature » souvent très proches de l'odeur de la matière première traitée et exempts de solvants organiques. Grâce aux caractéristiques du CO<sub>2</sub> à l'état supercritique, en particulier celle d'être un solvant à « géométrie variable », nous pouvons donc obtenir à basse pression des extraits dont la composition est de type « huile essentielle », et à haute pression des extraits dont la composition est de type « concrète ». Evidemment selon les conditions opératoires, on peut en théorie obtenir tous les extraits intermédiaires (**Pellerin, 2001**).

- **Extraction distillation simultanée (SDE)**

L'extraction- distillation simultanée est une extraction liquide-liquide qui est menée dans l'appareil de Likens et Nikerson modifié. Son principe est le suivant: les composés

volatils entraînés par la vapeur d'eau sont extraits par des vapeurs de solvant que l'on condense ensuite dans un réfrigérant puis on recycle en continu le solvant (**Vermin, 1982**).

### C. Distillation assistée par micro-ondes et ultrasons

Ces techniques récentes offrent plusieurs avantages significatifs par rapport aux techniques classiques. En effet, elles nécessitent un volume moindre de solvant et un temps de chauffage réduit ce qui évite la perte et la dégradation des composés volatils thermosensible. Ainsi elles conduisent à des rendements plus élevés. (**Paré, 1992 ; Camel, 2000 ; Lucchesi et al., 2004**).

#### *Extraction par micro-ondes*

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique encore plus récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux huiles essentielles et aux extraits aromatiques. Elle consiste à extraire l'huile essentielle entraînée dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre au produit traité.

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par un rayonnement de micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle, l'HE est entraînée dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée.

C'est un procédé très rapide et peu consommateur d'énergie par rapport à l'hydrodistillation (**Bruneton, 1999**).

#### *Extraction par ultrasons*

Le matériel végétal mis en contact avec un solvant (eau ou solvant organique) est immergé dans un bain à sonication maintenu à une agitation constante. (**Kimbaris et al., 2006**).

### D. Enfleurage

Ce procédé met à profit le caractère liposoluble des composants odorants des végétaux (**Bruneton, 1993**). Il consiste à mettre en contact la fleur avec un corps gras qui se sature d'essence puis ce dernier sera épuisé par un solvant évaporé sous vide par la suite.

**Naves (1974)** signale que le succès de cette extraction à froid dépend essentiellement de la qualité de la graisse employée. Celle-ci ne doit présenter aucune odeur mais, en revanche, elle doit posséder une certaine consistance (surface semi-dure) afin de faciliter l'élimination des fleurs épuisées.

Le principe consiste à déposer les pétales de fleurs, à la température ambiante, sur des plaques enduites de graisses solides sur lesquelles, elles séjournent de 24 à 78 heures.

On obtient ainsi une pommade (graisse saturée en constituants volatils) à partir de laquelle, on récupère les produits volatils floraux au moyen d'un alcool.

- **Macération** : Ce procédé exige que les graisses utilisées soient chaudes (40-60°C), ce qui a pour effet d'augmenter leur pouvoir absorbant. Cette technique est rapide et s'applique aux fleurs dont l'activité physiologique cesse à la cueillette. L'extraction est réalisée par immersion des fleurs fraîchement cueillies et constamment renouvelées dans un bac de graisses chaudes jusqu'à atteindre la saturation. Un épuisement à l'alcool absolu est généralement appliqué sur cette graisse (**Blakeway et Salerno, 1987**).

## E. Incision

C'est une opération peu fréquente, il suffit de fendre l'écorce des arbres pour en recueillir le suc comme par exemple le caoutchouc de l'arbre hévéa.

## 1.5 Composition chimique et biosynthèse

### 1.5.1. Composition chimique des HE

Dans les plantes, les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines (**Brunetton, 1987**).

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Kurkin, 2003**).

#### a. Les composés terpéniques

Les terpènes doivent leur nom à Kekulé (ter=térébenthine; pène=pin). Ce sont des composés formés de l'assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques (2-méthylbuta-1,3-diène), unité composée de cinq carbones isopréniques. (**Capon et al., 1993**).

Selon **Brunetton (1995, 1999)** seuls les terpènes les plus volatils dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée (monoterpènes et sesquiterpènes) rentrent dans la composition des HE.

- ✓ *Les monoterpènes (composés en C<sub>10</sub>)*: Ce sont des hydrocarbures volatils présents dans la quasi-totalité des HE ; ils peuvent être acycliques (Myrcène, Ocimène), monocyclique (p-Cymène, (Terpinène) ou bicyclique (Camphène, Sabinene,

Pinénes, 3-Caréne) (**Bruneton, 1995**).

✓ *Les sesquiterpènes (composé en C<sub>15</sub>):* Ils sont constitués de trois éléments isopréniques, disposés de façon à donner des structures monocycliques ou polycycliques.

### b. Les composés aromatiques

Les huiles essentielles renferment aussi des composés odorants (phényl-propanoïdes) dont la biogénèse est différente de celle des terpènes (**Bernard et al. 1988**).

Parmi ces divers composés aromatiques, on peut citer:

- Les aldéhydes (anisiques, cuminique, cinnamique).
- Les phénols et éthers (thymol, eugénol, anéthol).
- Les coumarines (bergapteine, ombelliférone).

Des composés acycliques tels que les acides organiques à faible poids moléculaire (acétique, formique, valérique) peuvent être également rencontrés.

### c. Les composés d'origines variées

Selon le mode de récupération utilisé, les HE peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînés lors de l'hydrodistillation: acides, aldéhydes, esters acycliques et lactones (**Bruneton, 1995**).

A titre indicatif on peut citer

- L'heptane et la paraffine dans l'essence de camomille.
- Des acides en C<sub>3</sub> et C<sub>10</sub>.
- Des esters acycliques présents surtout dans les fruits : acétate de butyle (pomme) ; acétate d'isoamyle (Banane).
- Des aldéhydes comme l'octanal et le décanal des citrus.
- Des alcools comme le 1 octén-3-ol de l'essence de lavande.

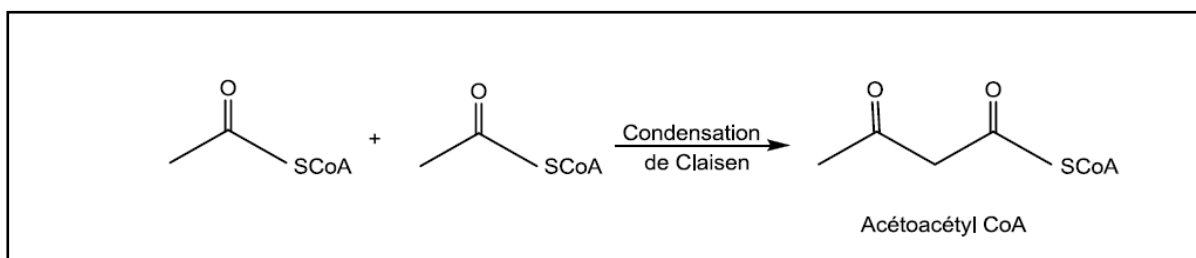
## 1.5.2. Biosynthèse des constituants des HE

La biosynthèse des constituants des HE emprunte deux voies utilisant comme intermédiaire soit l'acide mévalonique soit l'acide shikimique respectivement pour les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes (**Singh et al., 1990**).

### ➤ Biosynthèse des terpènes

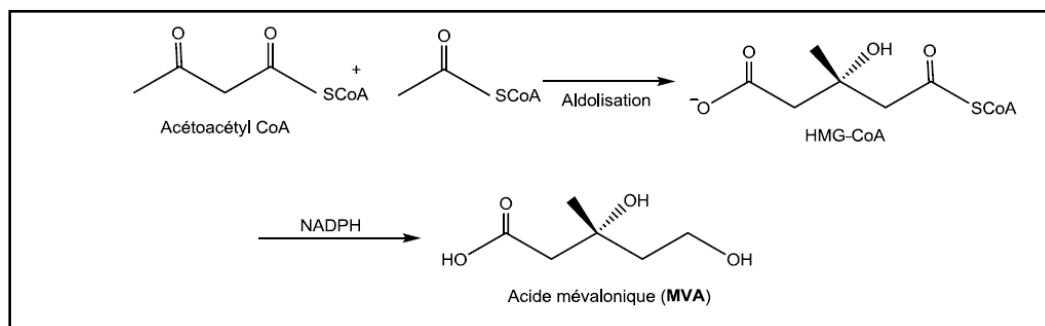
La biosynthèse des terpènes prend son origine au niveau de l'acétylcoenzyme A (CH<sub>3</sub>COSCOA) produit de la glycolyse (catabolisme des sucres). L'étude des mécanismes réactionnels régissant la biosynthèse des terpènes a montré l'existence de plusieurs étapes. (**Sallé, 1991**).

La première étape est une condensation de type claisen, entre deux molécules acétylCoA, conduisant à l'acétoacétylCoA.



**Figure 01:** Biosynthèse de l'AcétoacétylCoA.

La deuxième étape est une réaction d'aldolisation entre une troisième molécule d'acétylCoA et l'acétoacétylCoA. Après hydrolyse et réduction par NADPH (Nicotine Adénine Di nucléotide Phosphate), il se forme l'acide mévalonique.



**Figure 02:** Biosynthèse de l'Acide mévalonique.

Après pyrophosphorylation par ATP (Adénosine Tri Phosphate) la déshydratation et décarboxylation par une élimination concertée permettant d'atteindre les deux intermédiaires en C5, bio-précurseurs des terpènes : le pyrophosphate de diméthylallyle (DMPP) : les deux intermédiaires en C5 réagissant alors l'un sur l'autre, pour conduire au pyrophosphate de géranyl (GPP), point de départ de tous les monoterpènes et monoterpénoïdes.

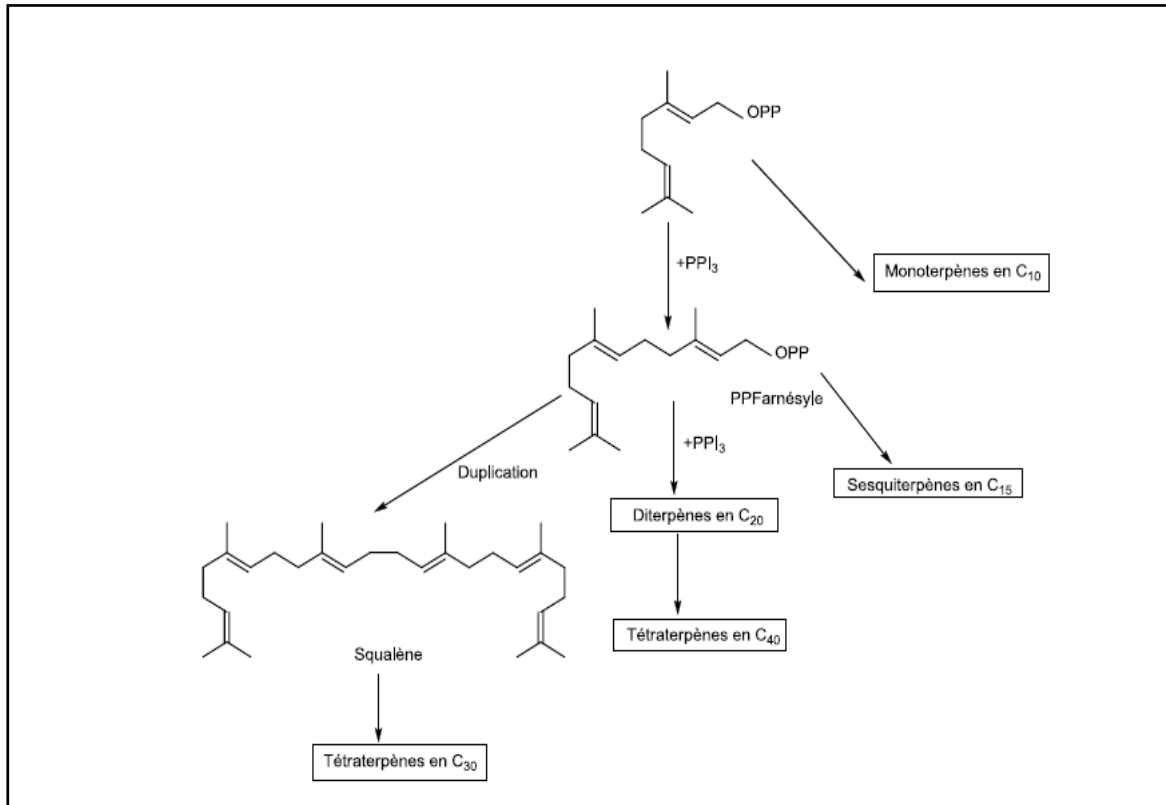
La condensation suivant le même principe, entre le pyrophosphate d'isopentyle (IPP) et pyrophosphate de géranyl (GPP) conduit au pyrophosphate de farnésyl, point de départ de tous les dérivés sesquiterpéniques.

Par condensation d'un pyrophosphate de farnésyl (FPP) avec un pyrophosphate d'isopentyle (IPP), on obtient un géranyl-géranyl pyrophosphate (GGPP) point de départ de tous les diterpènes/ diterpénoïdes.

Par contre la formation du tri et tétra terpène/ terpénoïdes s'obtient par dimerisation réductive à l'aide de NADPH de deux unités pyrophosphate de farnésyl ou géranyl- géranyl-

pyrophosphate.

La figure 03 Montre le schéma indiquant les différentes étapes de la biosynthèse des terpènes.



**Figure 03:** Schéma global de la biosynthèse des terpènes par voie de l'acide mévalonique.

#### ➤ Biosynthèse des phenylpropanoïdes

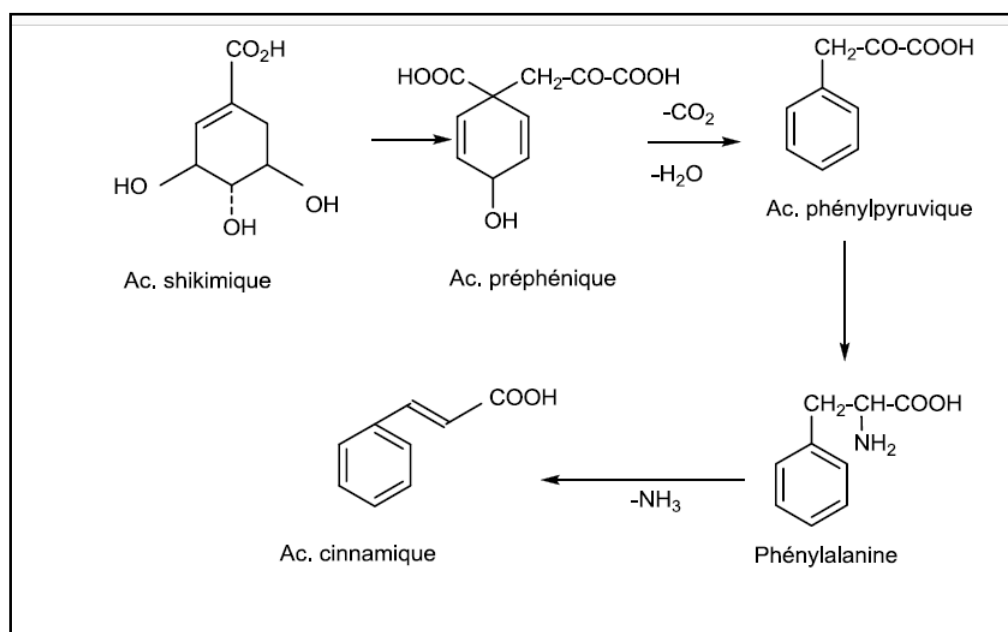
La biosynthèse des dérivés du phénylpropane se fait par l'intermédiaire de l'acide shikimique qui représente le principal mode d'accumulation des phénols dans la plante. Cette voie fait intervenir une série de réactions et représente le chemin biosynthétique des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine...)

L'acide est obtenu par condensation de l'acide pyruvique activé par phosphorylation sur un sucre phosphorylé. L'addition d'une deuxième molécule d'acide pyruvique activé fournit l'acide préphénique qui par déshydratation et décarboxylation donne l'acide phenylpyruvique.

Cet acide se transforme en phénylalanine, acide aminé aromatique, qui est à l'origine du métabolisme des composés aromatiques.

La figure 04 illustre les principales étapes de la formation des dérivés aromatiques : exemple de l'acide cinnamique (**Hahlbrok et al., 1989**).





**Figure 04:** Exemple de biosynthèse des dérivés phenylpropanes.

➤ **Paramètres influençant la composition quantitative et qualitative des huiles essentielles**

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être très différentes (Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Benini, 2007). Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de croissance et de développement de la plante.

**i. Facteurs intrinsèques**

Une huile essentielle doit avant tout autre chose être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toutes dénominations trompeuses du matériel végétal (Bruneton, 1999). L'influence du stade végétatif (Garnéro, 1991; Bruneton, 1999; Stefanini *et al.*, 2006a; Aprotosoie *et al.*, 2010), l'organe de la plante (Maffei et Sacco, 1987 ; Barry, 2001 ; Stefanini *et al.*, 2006a; Chowdhury *et al.*, 2009), les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie (Garnéro, 1991; Aprotosoie *et al.*, 2010) et le polymorphisme chimique « chimiotypes ou formes physiologiques » (Garnéro, 1991; Anton et Lobstein, 2005; Belyagoubi, 2006) sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

## ii. Facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la quantité de lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (**Bruneton, 1999; Mohammad et al., 2009; Olle et Bender, 2010; Aprotosoiaie et al., 2010**). Il y a eu pas mal des travaux ayant mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (**Barry, 2001; Mohammedi, 2006; Marzoukia et al., 2009**), les conditions culturales telles que la date de semis, la date de récolte, les traitements phytosanitaires, l'emploi d'engrais, ainsi que les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles (**Barry, 2001; Lahlou, 2004; Stefanini et al., 2006a; Benini, 2007; Aprotosoiaie et al., 2010**).

### 1.6. Analyse des Huiles essentielles

Les techniques d'analyse ont pour but de déterminer la composition d'un échantillon et de doser les éléments le constituant. Elles existent depuis longtemps mais ont considérablement progressées depuis le développement de l'informatique et de l'électronique. Aujourd'hui les méthodes d'analyse sont beaucoup plus accessibles grâce à des logiciels fonctionnels donnant des informations directement exploitables par des personnes non spécialistes.

#### 1.6.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie est une puissante technique de séparation qui trouve de nombreuses applications dans tous les domaines de la science (**Skoog et al, 2003**).

Réalisée expérimentalement en 1952 par James et Martin, la CPG s'est montrée une méthode des plus appropriées à la séparation et à l'identification des constituants des HE particulièrement avec la programmation de la température. Elle permet à la fois l'analyse qualitative et quantitative (**Paris et Godon, 1979**).

- **Principe**

En CPG, l'échantillon est injecté et vaporisé au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. A la sortie de la colonne se trouve un détecteur relié à un enregistreur ; lorsqu'un constituant de l'échantillon le traverse, un pic apparaît sur l'enregistreur (**Skoog et al., 2003**).

- **Identification des composés**

Après la séparation par la chromatographie, les pics des échantillons doivent être identifiés. Ils sont définis par l'injection des étalons purs et par des données de rétention.

Les indices de rétention ont été introduits par Kovats, ils constituent pour chaque substance une grandeur de rétention assez reproductible. Il est défini par Van Deen Dool (**Ghrib, 1995**).

Selon l'expression suivante:

$$IX = 100.n + \frac{T_x - T_n}{T_{n+1} - T_n} . 100$$

Où : IX : indice de rétention.

$T_x$ : temps de rétention du soluté (x) étudié.

n : nombre de carbone de l'alcane qui précède (x).

$T_n$  : temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone qui précède x.

$T_{n+1}$ : temps de rétention de l'alcane à n+ 1 atomes qui suit x.

L'identification consiste en la comparaison des indices de rétention à ceux des étalons purs injectés parallèlement. Cependant, l'utilisation d'étalons et d'indices de rétention pour une analyse qualitative et quantitative des échantillons étudiés limite l'efficacité de la CPG et impose son couplage avec d'autres méthodes telles que spectrométrie de masse. Cette dernière a la capacité d'identifier un très grand nombre de composés présents dans le mélange à analyser.

Actuellement elle représente le couplage le plus utilisé dans divers secteurs (Agro-alimentaire, Biochimie) (**Rouessac et Rouessac, 1995, Tranchant, 1995**).

### 1.6.2. Spectroscopie de masse (SM)

Selon **Skoog et al. (2003)**, la spectroscopie de masse est sans doute, parmi toutes les techniques analytiques, celle dont le domaine d'application est le plus étendu. En effet, elle peut fournir des informations concernant la composition élémentaire d'un échantillon, la structure de molécules inorganiques, organiques et biologiques, la composition qualitative et quantitative de mélanges complexes.

Une analyse par SM comprend les étapes suivantes :

- Atomisation de l'échantillon ;
- Conversion d'une fraction importante des atomes formés pendant la première étape en

ions (habituellement porteur d'une seule charge positive).

- Séparation des ions formés à la deuxième étape sur la base du rapport de leur masse à leur charge.
- Détermination de la population d'ion de chaque espèce par comptage ou par mesure du courant résultant de l'arrivée des ions à un transducteur adéquat. Ce dernier convertit le faisceau d'ions en un signal électrique qui peut être traité et stocké dans la mémoire d'un ordinateur.

### 1.6.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Au cours des vingt dernières années, les avancées obtenues dans ces domaines d'analyse tiennent principalement à deux raisons : dans le domaine de la séparation chromatographique et, en particulier, de la CPG, au développement de colonnes chromatographiques capillaires à très haute résolution ; dans le domaine de la détection, au développement en routine des techniques de couplages, de séparations chromatographiques avec la détection par SM.

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**).

L'interface la plus simple pour cette technique consiste à réunir la colonne du chromatographe au spectromètre de masse, soit en introduisant directement l'extrémité de la colonne dans la chambre d'ionisation ou par le relais d'un capillaire de transfert chauffé et placé entre le chromatographe et le spectromètre de masse (**Rouessac et Rouessac, 1995**).

#### • Principe

Le principe consiste à soumettre un composé moléculaire à cette analyse en déclenchant un processus à plusieurs étapes (**Pradeau et al., 1992**).

- ❖ Ionisation: les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de départ.
- ❖ Accélération: les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- ❖ Séparation: les ions seront distribués selon leur rapport masse / charge.
- ❖ Détection: après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.
- ❖ Traitement du signal: le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui

constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction du rapport masse / charge.

L'appareillage CG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondant à chaque pic chromatographique, ce qui rend possible l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG et ceci en comparant les spectres de masse obtenus avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées. C'est donc une technique de pointe permettant la connaissance d'échantillons parfois complexes en un temps très court.

### 1.7. Données Toxicologiques

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des huiles essentielles est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie.

Les effets toxiques d'une huile essentielle varient considérablement selon sa nature (**Traoré, 2006**). Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde (**Smith et al., 2000**) ou phototoxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarines (**Naganuma et al., 1985**)). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique. Les cétones comme l' $\alpha$ -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (**Franchomme et al., 1990**). Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers (**Homburger et al., 1968**). C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le safrole (*Sassafras*), l'estragole (*Artemisia dracuncululus*), le  $\beta$ -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs (**Wiseman et al., 1987**). Le safrole et l'estragole, par exemple, sont métabolisés par les microsomes au niveau du foie des rats et des souris en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui eux sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines (**Kim et al., 1999**).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë faible ou très faible par voie orale: une DL<sub>50</sub> comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle.) ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver.) d'autres ont une DL<sub>50</sub> inférieure à 1g/kg : l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg), l'essence de moutarde (0.34 g/kg) , les essences d'origan et de

la sarriette (1.37 g/kg), les huiles essentielles du basilic, de l'estragon et de l'hysope (1,5 ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (**Bruneton, 1999; Benzeggouta, 2005**).

### 1.8. Principaux domaines d'application des huiles essentielles

Les domaines d'application des huiles essentielles diffèrent selon la plante dont elles proviennent mais surtout de la partie du végétal dont elles sont extraites (la fleur, la feuille, les racines et la graine). D'une manière générale, les essences extraites des racines sont reconnues pour leur action sur le système nerveux, celles extraites des graines et des fleurs pour leur impact sur l'ensemble du système digestif et celles issues des feuilles pour leur bienfait sur les systèmes respiratoire et cardiaque.

A cet effet, les HE sont recommandées en usage antibiotique, antiviral, antiseptique, fongicide, cicatrisant, digestif, anti-inflammatoire, sédatif, etc (**Richard et Multon, 1992**).

#### a. Industries agroalimentaires

Plusieurs segments alimentaires utilisent, à des degrés divers, les HE qui leur offrent un formidable potentiel de leurs notes aromatiques dans un registre infiniment varié. On les retrouve presque dans tous les secteurs alimentaires: boissons non alcoolisées, confiseries, produits laitiers, soupes, sauces, produits de boulangerie, produits carnés ... etc. (**Richard et Multon, 1992**). Cependant, c'est seulement récemment que beaucoup d'attention a été donnée à l'application potentielle d'HE comme conservateurs et ceci est dû à la présence dans ces dernières de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Smith Palmer et al., 1998**).

#### b. Aromathérapie

Alors que les microbes développent de plus en plus résistances aux structures moléculaires de synthèse des antibiotiques, ils se heurtent plus difficilement à l'infinie diversité et à la complexité des HE (**Richard et Multon, 1992**). Elles apportent à l'organisme, les concentrés de la nature les plus précieux pour rétablir ou conserver l'équilibre indispensable à la santé.

#### c. Pharmacologie

De nombreuses HE se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques: sirops, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusions telles que: la verveine, le thym, la menthe et autres.

**d. Cosmétologie et parfumerie**

Les HE sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'important tonnage d'essence (60%) en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine... etc. Les HE sont consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons... etc (**Seu-Saberno et Blakeway, 1984**).

Les produits d'hygiène, détergents et lessives par exemple consomment eux aussi beaucoup d'HE pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs.

## 2. Les composés phénoliques ou polyphénols

### 2.1. Généralités

Les polyphénols ou « composés phénoliques » prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Les polyphénols constitue un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances le royaume des végétaux, avec le 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 shikimate et l'acétate (**Lugasi et al., 2003**).

Les composés phénoliques sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets prébiotiques, antioxydants, de chélation et anti inflammatoires. Leurs toxicité est faible et donc, considérés non toxiques (**Psotová et al., 2003**)

### 2.2. Définition et classification des composés phénoliques

#### 2.2.1. Définition

Les polyphénols, également dénommés composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances aux structures variées qu'il est difficile de définir simplement.

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques, avec ou pas d'autres fonctions (OH alcoolique, carboxyle). Dans cette catégorie, on trouve de nombreuses substances simple en C6 - C1 et C6 - C3, les noyaux dérivant de l'extension du phényl propane, en C6 – C3 – C6 (**Dubois et al., 1977**).

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

#### 2.2.2. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols se répartissent selon leur caractéristique structurale dans différentes familles : anthocyanes, coumarines, flavonoïdes, tanins, quinones, acides-phénols, xanthones... Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 Dalton (**Harborne, 1993**).



D'après **Anders (2002)**, Les polyphénols sont divisés en quatre classes majeures selon leur structures chimiques en : Phénols, acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanosides et tanins.

➤ **Acides phénoliques et phénols**

Les acides phénoliques sont contenus dans certaines plantes agricoles et médicinales (**Psotová et al., 2003**). Comme exemple d'acides phénoliques on peut citer : l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide protocatechique, l'acide vanillique, l'acide ferulique, l'acide sinapique et l'acide gallique (**Hale, 2003**).

Les phénols simples sont rares dans la nature (catéchol, phloroglucinol) (**Krief, 2003**). Un acide-phénol (ou acide phénolique) est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique.

➤ **Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque: acides hydroxybenzoïques**

L'acide benzoïque, de formule chimique  $C_6H_5COOH$  (ou  $C_7H_6O_2$ ) est un acide carboxylique aromatique dérivé du benzène.

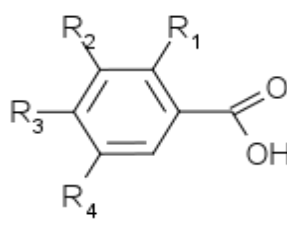
Ces dérivés sont obtenus par hydroxylation de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1. Ces hydroxyles phénoliques peuvent ensuite être méthylés.

*Exemples :*

- ✚ Acide gallique, élément constitutif des tanins hydroxylables, prévient la formation du cancer œsophagien chez les rats (**Hale, 2003**).
- ✚ Acide vanillique dont l'aldéhyde, la vanilline, est bien connue comme l'arôme naturel de vanille.

Le tableau 02 récapitule les différents dérivés de l'acide benzoïque.

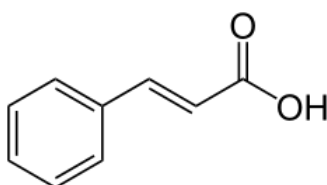
**Tableau 02:** Les dérivés de l'acide benzoïque : Acides hydroxybenzoïques

<i>Acides hydroxybenzoïques</i>					
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>Formule Générale</b>
<i>Acide parahydroxybenzoïque</i>	H	H	OH	H	
<i>acide protocatéchique</i>	H	OH	OH	H	
<i>acide vanillique</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
<i>acide gallique</i>	H	OH	OH	OH	
<i>acide syringique</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
<i>acide salicylique</i>	OH	H	H	H	
<i>acide gentisique</i>	OH	H	H	OH	

➤ *Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique : acides hydroxycinnamiques*

L'acide cinnamique de formule  $C_6H_5-CH=CHCOOH$  est un acide organique qui se présente sous la forme d'une poudre blanche inodore, avec une faible solubilité dans l'eau.

Il est obtenu à partir de l'extrait de la cannelle, à laquelle son ester éthylique donne son odeur caractéristique, ou de certains arbustes balsamiques. La figure 05 montre la structure plane de l'acide cinnamique.

**Figure 05 :** Structure de l'acide cinnamique.

Les dérivés de l'acide cinnamique ont une structure de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>. Ils appartiennent à la grande famille des phénylpropanoïdes. Les hydroxyles phénoliques OH de ces dérivés peuvent aussi être méthylés (-O-CH<sub>3</sub>).

*Exemples :*

- ✚ L'acide paracoumarique, dont les lactones, les coumarines, sont largement distribuées dans tout le règne végétal.

- ✚ L'acide caféique, très large représentation chez les végétaux, souvent sous forme de l'acide chlorogénique, comme dans le grain de café, le romarin, la pomme ou sous forme d'un ester dans l'artichaut et le thé de Java (orthosiphon).
- ✚ L'acide férulique.
- ✚ L'acide sinapique.

L'acide caféique et l'acide férulique préviennent la formation du cancer des poumons chez les souris (Hale, 2003).

**Tableau 03 :** Les dérivés de l'acide cinnamique : Acides hydroxycinnamiques

	R1	R2	R3	Formule générale
<i>acide paracoumarique</i>	H	OH	H	
<i>acide caféique</i>	OH	OH	H	
<i>acide férulique</i>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
<i>acide sinapique</i>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	

#### ➤ Biosynthèse de l'acide cinnamique

L'acide cinnamique est biosynthétisé par une grande partie des végétaux. C'est un des éléments de la voie des phénylpropanoïdes; il est produit par l'action de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) sur la phénylalanine, il est ensuite transformé en acide paracoumarique par l'action de la cinnamate 4-hydroxylase.

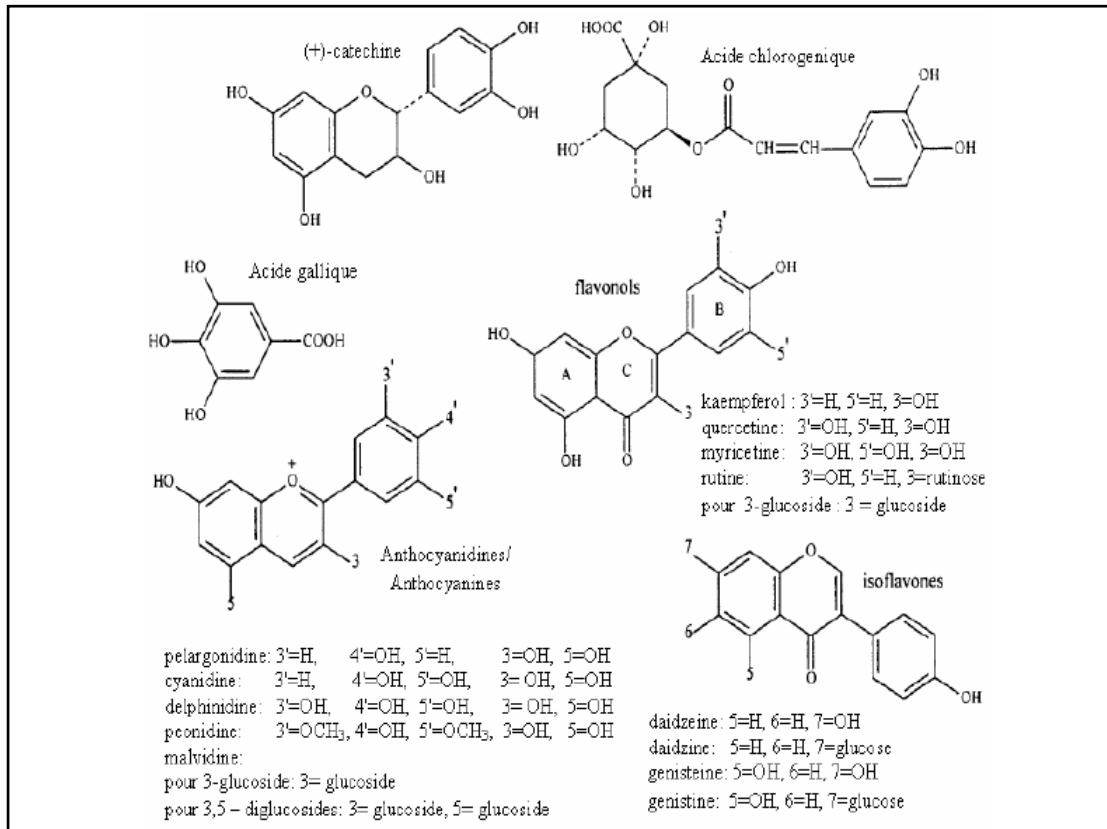


Figure 06: Structure de quelques composés phénoliques (Wang et Mazza, 2002).

### a. Anthocyanosides

Les anthocyanosides ou pigments anthocyaniques sont des composés hydrosolubles, de teint rouge, violet ou bleu, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Les anthocyanes sont présents dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proches des flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et des propriétés pharmacologiques. Leur structure de base (Figure 07) est caractérisée par un noyau « flavon » généralement glucosylé en position C3 (Ribereau-Gayon, 1968).

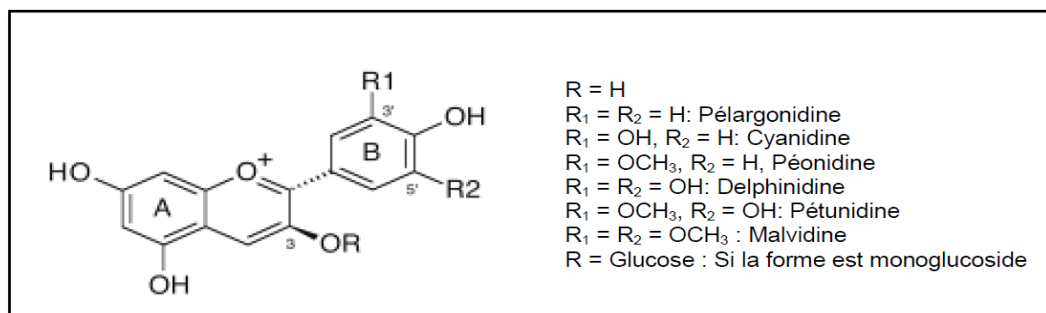


Figure 07 : Structures chimiques de quelques anthocyanidines (Collin et Crouzet, 2011).

Les anthocyanosides, dont les couleurs vives attirent les insectes et les oiseaux, jouent un rôle majeur dans la pollinisation et la dispersion des graines. Un fort pouvoir colorant et l'absence de toxicité font de ces hétérosides des colorants naturels susceptibles de remplacer dans l'industrie alimentaire, les colorants synthétiques. Leur innocuité et leur acceptabilité par le consommateur compensent leur instabilité (PH, température, lumière) et leur coût de production parfois élevé (**Bruneton, 2009**).

### **b. Tanins**

Les tanins sont des polyphénols polaires d'origine végétale (**Berthod et al., 1999**).

On les trouve dans pratiquement toutes les parties des végétaux (écorces, racines, feuilles, bois, fruits, etc.), leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 (**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**).

Dans la plante, les tanins jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites. Ils sont caractérisés par une sensation de dessèchement en bouche. Par exemple, les pépins de raisins sont très chargés en tanins.

Les tanins ont des couleurs qui vont du blanc jaunâtre au brun et foncent à la lumière. Ils possèdent une légère odeur caractéristique, un goût amer et sont astringents. Ils se dissolvent dans l'eau, l'acétone et l'alcool, mais non dans le benzène, l'éther ou le chloroforme. Chauffés à 210 °C, ils se décomposent pour former notamment du pyrogallol et du dioxyde de carbone.

Il existe deux catégories de tanins, hydrolysables et condensés, tous deux d'origines biosynthétiques différentes, ils peuvent être constitués par condensation des dérivés flavone qui sont transportés aux tissus du bois des plantes. Alternativement, des tanins peuvent être constitués par polymérisation des unités de quinones (**Cowan, 1999**).

#### ➤ *Les tanins hydrolysables*

Ils sont composés de sucre et d'acide-phénol, les tanins hydrolysables, dérivés de l'acide gallique (lui-même dérivé de l'acide benzoïque) et d'autres acides polyphénoliques, ne sont pas exactement des acides, mais ils résultent de l'estérification, par ces acides, des fonctions alcooliques du glucose. Leur structure chimique est très variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; ces tanins hydrolysables donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique soit de l'acide ellagique.

On divise les tanins hydrolysables en deux catégories : les monomères (1 glucose) et les oligomères (x glucoses).

**✚ Les tanins hydrolysables monomères :**

1. Le tanin gallique : acide gallique + 1 glucose. Le plus commun est le pentagalloylglucose (5 acides galliques et un glucose) qu'on trouve dans les fagacées, ericacées, géraniacées, acéracées. L'acide tannique (ou gallotannique)  $C_{76}H_{52}O_{46}$ , présent dans les glands, est utilisé pour la clarification du vin ou de la bière et la dénaturation de l'alcool industriel.
2. Le tanin ellagique : HHDP (acide hexahydroxydiphénique) + 1 glucose. Exemple : noix de galle du chêne.
3. Le tanin di-hydroellagique : issu de l'oxydation du tanin ellagique. Acide chébulagique (mirobolan).
4. Les tanins complexes : camelliatanin, condensation d'un acide ellagique et d'un flavonoïde (2 acides ellagiques, 1 flavane-3-ol, 1 glucose).
5. Les tanins mixtes : acide ellagique + acide gallique, exemple : acide agrimonique (aigremoine).

**✚ Les tanins hydrolysables oligomères:**

Les tanins formés d'acide gallique, d'acide ellagique et plusieurs oses (2000 à 5000).

**➤ Les tanins condensés**

Aussi appelés tanins catéchiques ou proanthocyanidols. Structure : polymères de flavanes-3-ol et anthocyanidols (flavonoïdes). Les tanins condensés sont à base de phénols, d'autres sont des mélanges d'esters, de glucose ou d'autres sucres. Les meilleurs tanins sont issus de la noix de galle du chêne et des feuilles du sumac. La macération dans l'eau, ou dans l'alcool dilué, constitue la première étape de la préparation. La précipitation, suivie de l'évaporation à basse température, donne alors le produit commercial.

**c. 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).

**i. Structure et classification des flavonoïdes**

De nos jours, plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à

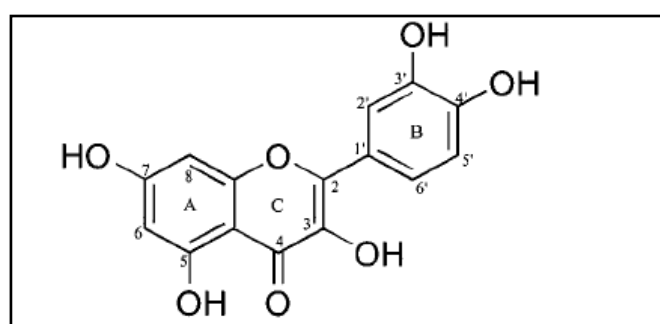
quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C6 (A et B), reliés par un hétérocycle en C3 (**Figure 08**) (**Bruneton, 1999; Pietta, 2000**).

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**) (**Tableau 04**).

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).

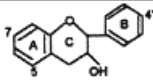
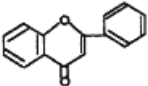
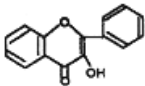
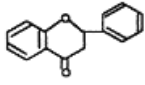
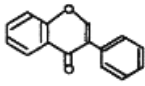
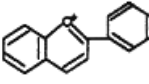
La fixation d'un groupement hydroxyle (OH) sur le carbone 3 dans les deux cas précédents constitue respectivement les flavonols et les flavanonols (**Birt et al., 2001**).

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 08** : Structure générale des flavonoïdes (**Heim et al., 2002**).

**Tableau 04:** Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe (D'après Heim et al., 2002).

Classe	structure générale	flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin  luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses  5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavanol		kaempferol  quercetin	3,5,7,4'-OH  3,5,7,3',4'-OH
		myricetin tamarixetin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoses
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

## ii. Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes. Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce (Lee et al., 1994). Les flavonoïdes se trouvent dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé et le vin rouge. Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75 mg de flavonoïdes par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riches en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants (Schewe et Sies, 2003).

La majorité des flavonoïdes apportés par l'alimentation sont sous forme glycosylée, ils peuvent occasionnellement y être présents sous forme aglycone (Ishii et al., 2003).



La plupart des flavonoïdes aglycones sont hydrophobes et peuvent donc traverser passivement les membranes biologiques.

Alors que la liaison d'un groupement glucidique à un composé phénolique diminue son hydrophobicité et limite sévèrement sa diffusion passive (**Williamson et al., 2000**), il semblerait que l'absorption des flavonoïdes glycosylés ne pouvait pas avoir lieu au niveau de l'intestin grêle. Cependant, **Hallman et al., (1995 et 1997)** ont montré chez l'Homme que l'absorption des formes glycosylées de la quercétine administrées oralement étaient plus importantes (52%) que celle de la quercétine aglycone (24%). Ces auteurs ont alors suggéré que la partie glucidique associée aux flavonoïdes facilite leur passage dans les entérocytes via le système de transport des glucides (**Hallman et al., 1997**).

### **iii. Biosynthèse des Flavonoïdes**

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2', 4',6'- tetrahydroxychalone (**Figure 09**), cette chalone métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalone isomérase, en naringénine (1). Sur cette dernière, agit la flavonesynthétase pour donner l'apigénine (2) ou le dihydroflavonol (3). Ce dihydroflavonol en présence de la flavonolsynthétase se métabolise en kaempferol (4) ou en leucoanthocyanidol. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3,4-ols (6) et l'anthocyanidol (7). Sous l'action de la 3-O- glycosyltransferase l'anthocyanidol, se transforme en anthocyanoside (8) (**Marfak, 2003**).

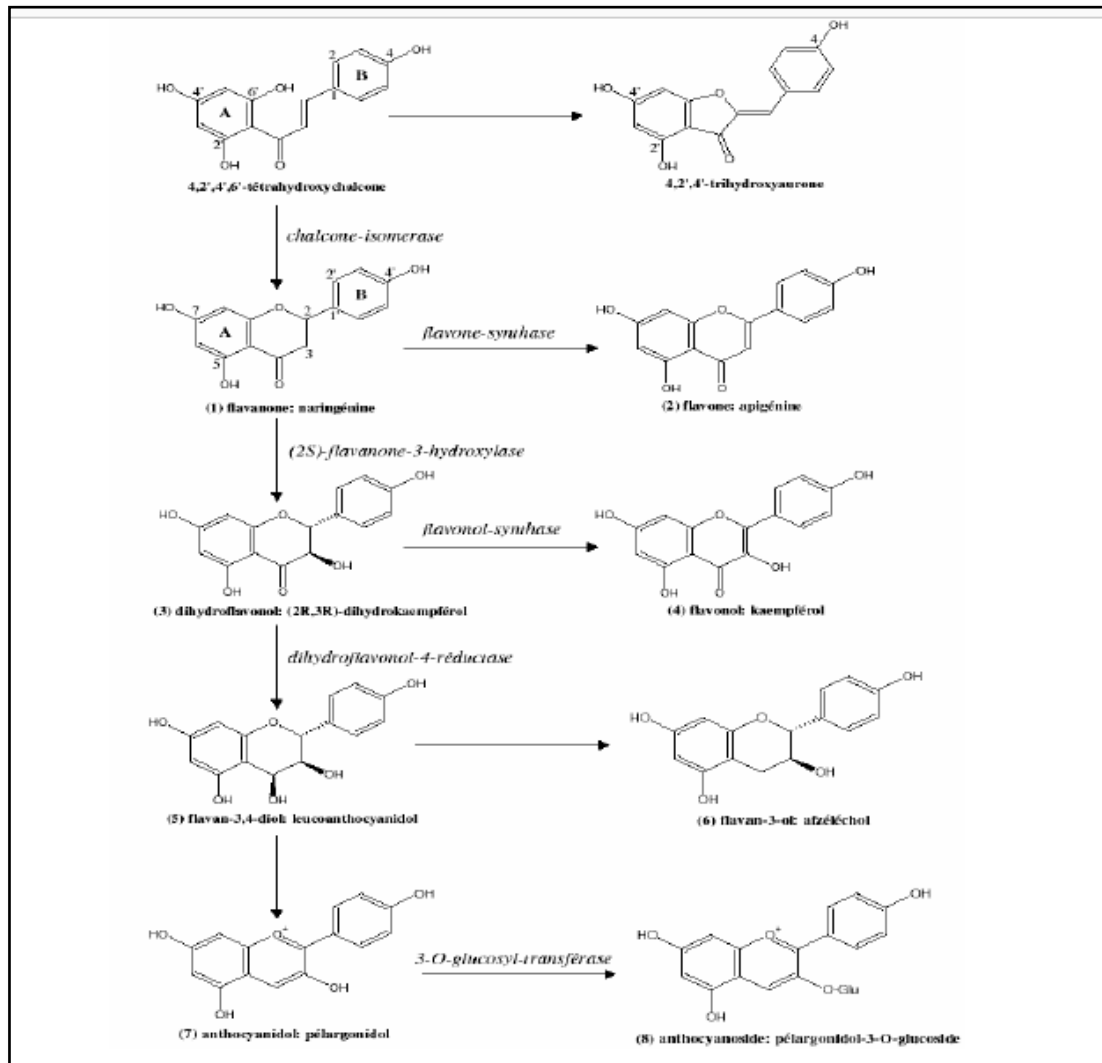


Figure 09: Biosynthèse des Flavonoïdes (Bruneton, 1999).

### 2.3. Intérêt biologique des composés phénoliques

L'évaluation de l'activité antioxydante de la quercétine dans les fractions lysosomales hépatiques des souris à l'aide du générateur radical hydrophile AAPH (2,2' azobis(2amidinopropane) dihydrochloride) et le générateur radical lipophile AMVN (2,2' azobis(2,4 diméthylvaleronitrile), suggère que la quercétine pourrait avoir un pouvoir antioxydant efficace entre la phase aqueuse et la phase lipidique dans les systèmes biologiques dû à la localisation dans les membranes (Nakagawa *et al.*, 2000).

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

Les composés phénoliques présentent une activité antimicrobienne à travers un flavonoïde glycoside « prunine 6-O-P- coumarate » contre deux souches bactériennes gram + (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus albus*) et deux souche gram – (*Escherichia coli* et *Proteus vulgaris*) (Harikrishna et al., 2004).

Plusieurs flavonoïdes montrent de nombreux effets biologiques tels que des activités anti inflammatoires, anti ulcéreuses, anti hépatotoxiques et ont des effets inhibiteurs d'enzymes et de prévention des maladies cardiovasculaires, en plus de leurs actions antiallergiques et anti virales (Narayana et al., 2001).

Le tableau 05 regroupe les différentes activités biologiques des composés phénoliques

**Tableau 05:** Activités biologiques des composés phénoliques

Composés phénolique	Activité	Référence de l'étude
<b>Acide phénol (cinnamique et benzoïque)</b>	Antimicrobienne Antioxydante	<b>Didry et al., 1982 Ravn et al., 1984 Hayase et Kato, 1984</b>
<b>Flavonoïdes</b>	Anti tumorales Anti cancérigène Anti-inflammatoire Hypotenseur et diurétique Antioxydante	<b>Stavric et Matula, 1992 Das et al., 1994 Bidet et al., 1987 Bruneton, 1993</b>
<b>Anthocyanes</b>	Protection des veines et capillaire	<b>Bruneton, 1993</b>
<b>Tanins</b>	Antioxydante	<b>Okuda et al., 1983 Okamura et al., 1993</b>

## 2.4. Les composés phénoliques et la santé de l'homme

Des recherches importantes sur les métabolites secondaires sont en cours, compte tenu des bénéfices considérables escomptés, mais aussi des dangers que ces substances comportent pour la santé humaine. Les nombreuses variations chimiques simples (hydroxylations, méthylations, glycosylations, acétylations, etc ...) autour des structures de base (exemple de l'acide caféique, du kaempférol ou de la quercétine) conduisent à une énorme diversité des composés phénoliques et en particulier des flavonoïdes.

L'activité biologique de ces molécules et plantes médicinales qui les accumulent peut varier fortement avec des petits changements structuraux qui entraînent souvent des modifications, des interactions avec l'eau, les protéines ou les lipides. Dans la plupart des cas, qu'il s'agisse de préparations brutes ou de fractions purifiées, l'action pharmacologique des composés phénoliques est associée à deux propriétés : d'une part, leur capacité à se lier aux protéines (propriété particulièrement marquée pour le groupe des tanins), ce qui peut conduire à l'inhibition d'activités enzymatiques (lipoxygénase, peroxydase, xanthine oxydase, glucosidase, ...) et d'autre part, leur caractère antioxydant qui permet de neutraliser les formes activées de l'oxygène ou les radicaux libres à caractère toxique issus de la peroxydation lipidique (**Macheix et al., 2005**). Les formes activées de l'oxygène sont pour la plupart des radicaux chimiques dérivés de l'oxygène, capables d'attaquer l'ADN, les enzymes, les protéines, les membranes cellulaires. Ces attaques peuvent être responsables de problèmes lors de la réplication de l'ADN entraînant mutations et cancers, des perturbations au sein des cellules qui peuvent conduire à leur mort ou à la destruction des membranes cellulaires, ceci peut mener au durcissement et à l'épaississement des artères mais aussi à des crises cardiaques, à la détérioration du collagène et donc la rigidité des tissus (**Leitao, 2011**).

---

## Chapitre II : Monographie des espèces étudiées

---

### 1. Le Fenouil marin ou la Criste marine « *Crithmum maritimum* L.»

#### 1.1. Généralités

La criste marine fréquente les côtes rocheuses de l'Atlantique et de la Méditerranée où ses touffes de feuilles charnues se repèrent de loin. Elle se comporte comme une plante **halophyte**, c'est à dire qu'elle tolère (plus ou moins) la présence du sel.

Cette plante a une très vieille histoire tant comme médicinale aux nombreuses propriétés avérées que comme alimentaire ou condimentaire.

#### 1.2. Historique

Comme la criste marine peuple tout le bassin méditerranéen, elle était connue des grands auteurs de l'Antiquité qui la citent surtout pour ses propriétés médicinales (Dioscoride, Pline l'ancien, ...). Son usage alimentaire apparaît dès cette époque : conservée dans de la saumure, mangée crue ou cuite avec du chou, consommée en salade. Callimaque, poète élégiaque alexandrin, parle dans une de ses œuvres d'Hécate (assimilée à Artémis) qui offre cette plante à Thésée.

L'étrange nom de criste dérive d'ailleurs de son appellation antique de *crithmé* ou *crithmon* (qui a donné le nom latin du genre *Crithmum*). Selon les auteurs, on affirme que ce nom dérive de *krithi* qui désigne un grain d'orge à cause de la ressemblance des graines avec celles-ci ou bien qu'il signifie endroit escarpé, allusion à son milieu de vie préféré, les falaises rocheuses. Ce nom surtout utilisé par les botanistes a parfois été orthographié *chrisme*, ce qui indique peut être un glissement de sens très fréquent dans les noms populaires vers une connotation religieuse.

Bernard de Palissy rapporte qu'elle est récoltée sur les « roches de Xaintonge » où on la consomme comme condiment, pratique qui s'est perpétuée jusqu'à nos jours, même si elle est bien moins connue que la salicorne, autre halophyte comestible.

Mais c'est surtout en Grande-Bretagne que la criste a connu ses heures de gloire. Déjà, vers 1603-1606, dans la pièce le Roi Lear, W. Shakespeare mentionne la vie dangereuse des cueilleurs de criste qui n'hésitent pas à escalader les falaises, preuve de l'attrait de cette plante très recherchée.

Effectivement, du 16<sup>ème</sup> au 19<sup>ème</sup>, sur l'île de Man ou sur la côte crayeuse du Kent, de Douvres à l'île de Wight, la criste était abondamment récoltée en mai, avant la floraison, et expédiée ensuite vers le marché de Covent Garden à Londres, stockée dans des tonneaux de saumure. Au 19<sup>ème</sup>, des grossistes pouvaient l'acheter quatre shillings le boisseau. Selon les comtés, elle est consommée sous différentes formes, cuite ou froide avec du pain ou bien ébouillantée puis servie avec du citron et du beurre. La méthode la plus répandue était celle des pickles confits dans du vinaigre. On la cultivait aussi dans les jardins jusque dans Londres sous le nom de « *Crest Marine* », déformation du nom criste. Cet usage s'est prolongé jusqu'au XX<sup>ème</sup> siècle dans l'Est du pays et connaît depuis peu un renouveau (**Anonyme 1**).

### 1.3. Caractéristiques botaniques

#### 1.3.1. Description de la plante

La Crithme marine est une plante de 20 à 50 cm de haut qui pousse sur les rochers et falaises de bord de mer. Elle a un port buissonnant et des feuilles charnues découpées en lanières. Ses fleurs vert-jaunâtre se présentent en ombelles d'ombellules. Ses fruits sont des diakènes spongieux, à côtes saillantes, ayant la propriété de flotter sur l'eau. C'est une plante halophile, c'est-à-dire qu'elle est adaptée au milieu salé, ce qui est rare. Elle est aussi très résistante à la sécheresse. L'eau qu'elle puise en profondeur est stockée dans ses feuilles charnues. Sa floraison a lieu entre juillet et octobre. C'est l'une des rares plantes méditerranéennes à fleurir au cœur de l'été.

#### 1.3.2. Classification botanique

- **Nom scientifique :** *Crithmum maritimum* L.
- **Nom commun :** Crithme marine, Criste (ou Christe) marine, Fenouil marin, Perce-pierre, Saxifrage marin.



**Figure 10 :** *Crithmum maritimum* L.

Systématique

- **Règne** : Plantae
- **Division** : Magnoliophyta
- **Classe** : Magnolopsida
- **Ordre** : Apiales
- **Famille** : Apiacées
- **Genre** : *Crithmum*
- **Espèce** : *Crithmum maritimum* L.

**1.3.3. Habitats et culture**

La Criste marine est présente sur les côtes de l'océan Atlantique, de la mer Méditerranée et de la mer Noire. Elle pousse sur les falaises et les rochers du bord de mer. C'est l'une des rares plantes capables de survivre sur des rochers régulièrement atteints par les vagues. Plante halophile, sa présence marque la zone dans laquelle les embruns sont mortels pour les plantes continentales. Outre sa résistance au sel, la Criste de mer est également très résistante à la sécheresse. Elle puise l'eau en profondeur pour ensuite la stocker dans ses feuilles charnues. C'est l'une des rares plantes méditerranéennes à pouvoir fleurir au cœur de l'été. (Larousse des plantes médicinales, 2001).

**1.4. Principaux constituants du fenouil marin**

- Monoterpènes :  $\beta$ -phellandrène (15-20%),  $\gamma$ -terpinène (25-50%), p-cymène (5-6%), sabinène (3-4%).
- Phénols méthyl-éthers : thymol méthyl-éther (5-6%).
- Ether-oxydes : apiole (5-6%).

**1.5. Effets et usages médicinaux**

Généralement délaissée en phytothérapie, la criste-marine est pourtant un bon diurétique. Riche en vitamine C et en minéraux, la criste-marine réduit les flatulences et facilite la digestion. Ces caractéristiques la rapprochent de son équivalent terrestre le fenouil. (Larousse des plantes médicinales, 2001).

## 2. La Mélisse « *Melissa officinalis* L.»

### 2.1. Généralités

La mélisse (*Melissa officinalis* L.), appelée aussi citronnelle, est une plante appartenant à la famille des Lamiacées. Le nectar de ses fleurs est très apprécié des abeilles et le nom même de la plante dérive du grec « melissa » qui signifie abeille ou de « meli » qui veut dire miel (**Ronat N., 2001**).

Réputée depuis longtemps pour ses propriétés sédatives et antispasmodiques, la mélisse est aussi utilisée en cuisine comme herbe aromatique, mais c'est surtout la célèbre Eau de Mélisse des Carmes de Boyer<sup>®</sup>, créée en 1611, qui a fait connaître la plante. La recette a traversé les siècles et reste encore aujourd'hui couramment utilisée (**Thoby C., 2009**). Ce remède, désormais élaboré par un laboratoire pharmaceutique, selon la recette originale, est préconisé en cas de troubles nerveux. Aujourd'hui, cette plante parfumée et calmante peut se révéler efficace dans le traitement de l'herpès (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

### 2.2. Histoire et tradition

Originnaire d'Asie mineure, la mélisse a été introduite dans la partie occidentale du bassin méditerranéen au moyen âge (**Rombi M., 1991**).

La mélisse, plante mellifère, condimentaire et médicinale, est connue depuis la haute Antiquité. Les Grecs l'utilisaient déjà au IV<sup>ème</sup> siècle avant Jésus-Christ, pour ses propriétés sédatives et comme condiments. Fort prisée dans la médecine arabe, la mélisse jouissait déjà d'une certaine réputation comme stimulant et antispasmodique.

Historiquement la mélisse a été utilisée dans toutes sortes de troubles et de maladies. Les feuilles, macérées dans le vin ou appliquées en cataplasme, étaient censées servir contre les piqûres de scorpions, d'araignées et les morsures de chiens. Elles étaient aussi utilisées pour la préparation d'eaux dentifrices pour les maux de dents et de lavements contre la dysenterie. On l'a également employée pour soigner les adénopathies, les douleurs articulaires et les ulcères (**Mc Vicar J., 2006 ; Schaffner W., 1993**).

Hippocrate (460-377 avant Jésus-Christ), prêtre médecin grec, la recommandait pour ses bienfaits digestifs, carminatifs et curatifs vis-à-vis des troubles intestinaux (**Hayons J.C., 2007**).



Ce sont les médecins arabes qui ont découvert les vertus médicinales de la mélisse vers le X<sup>ème</sup> siècle. Ils vantaient son pouvoir cordial (« qui réjouit le cœur ») ainsi que son remède contre la mélancolie (**Delaveau et al., 1977**).

Avicenne (980- 1037), grand médecin persan, l'employait notamment pour ses vertus stimulantes et digestives. Il déclarait alors que « la mélisse est propre à relever les forces, ranimer le courage, faire connaître la gaité, chasser les soucis, dissiper l'anxiété » (**Teuscher et al, 2005**).

La plante a été importée en Espagne au X<sup>ème</sup> siècle grâce aux arabes et plus tard en Europe Centrale par l'intermédiaire des moines bénédictins. Ses usages sont décrits dans l'ouvrage « physica » rédigé par Sainte Hildegarde de Bingen (1098- 1179). Pour elle, « l'on est enclin à rire lorsqu'on mange de la mélisse car elle réjouit le cœur, elle mérite donc le nom de consolatrice du cœur » (**Teuscher et al., 2005**).

Paracelse (1493- 1541), médecin suisse, lui attribue la faculté de revitaliser le corps de ceux qui sont malades, fatigués ou âgés.

Aux XVI<sup>ème</sup> siècle, elle était déjà cultivée dans quelques pays Européens (**Teuscher et al., 2005**).

## 2.3. Caractéristiques botaniques

### 2.3.1. Description de la plante

La mélisse est une plante vivace herbacée de 30 à 80 cm de hauteur, à port de menthe, à feuilles vert vif d'odeur citronnée. La partie souterraine est constituée de tiges souterraines, rameuses, portant des racines et produisant des bourgeons adventifs qui permettent à la plante de se perpétuer et de se multiplier, La tige est dressée, quadrangulaire, caractère typique des Lamiaceae, plus ou moins velue, peu ramifiée à la base, elle le devient fortement dans les parties hautes à la floraison. Les rameaux de la partie supérieure portent des fleurs et sont bien développés, tandis qu'ils sont courts et non fleuris dans la partie inférieure.

Les feuilles de la mélisse sont simples, opposées, ovales, quelquefois légèrement cordiformes, pétiolées, largement dentées en scie, à nervation réticulée, mesurant de 5 à 8 cm sur 4 à 5 cm. La face supérieure, de couleur vert vif foncé, est rugueuse au toucher car couverte de poils tecteurs fins et courts de couleur blanche.

Les nervures, saillantes sur la face inférieure beaucoup plus pâle et glabre, forment un réseau entre les branches duquel le limbe est soulevé ce qui donne à la face inférieure un aspect gaufré caractéristique. Les feuilles des rameaux axillaires sont plus petites.

Les fleurs sont groupées par trois ou six en verticilles axillaires unilatéraux, espacés le long de la tige et insérés à l'aisselle des feuilles supérieures et centrales.



**Figure 11:** *Melissa officinalis* L.

### 2.3.2. Classification botanique

- **Nom scientifique :** *Melissa officinalis* L.
- **Nom commun :** Mélisse officinale, Mélisse Citronnelle ou simplement Citronnelle, Ifer tzizwa (Bérbere - Kabyle), Trandjane (Arabe).

#### Systematique

- **Règne :** Plantae
- **Sous-règne :** Trachéobionta
- **Division :** Magnoliophyta
- **Classe :** Magnoliopsida
- **Sous-classe :** Asteridae

- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiaceae
- **Genre** : Melissa
- **Espèce** : *Melissa officinalis* L.

### 2.3.3. Habitat et culture

Originaire d'Europe méridionale, d'Asie occidentale et d'Afrique du Nord, la mélisse pousse à présent dans le monde entier. On l'a retrouvée à l'état spontané, en touffes dans les terrains vagues, aux abords des habitations, dans les haies, aux pieds des murs et bords des chemins jusqu'à 1000 m d'altitude (**Hayons J.C., 2007 ; Boullard B., 2001**).

La mélisse pousse sur tous types de sols sauf les plus humides. En sols légers et fertiles elle peut même être envahissante. L'idéal pour cette plante est un sol drainé, chaud mais pas trop sec, sablonneux ou argileux, riche en humus et un emplacement ensoleillé. Elle peut pousser dans des endroits ombragés mais sa teneur en huile essentielle sera amoindrie (**Teuscher et al., 2005**).

On la cultive par semis ou par boutures au printemps. On cueille les parties aériennes dès le début de l'été et juste avant que les fleurs éclosent (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

### 2.4. Les principaux constituants de la Mélisse

La plante de mélisse fraîche est composée de 0,2% d'huile essentielle au maximum (**Larousse des plantes médicinales, 2001**). L'huile essentielle de mélisse est constituée de :

- Aldéhydes terpéniques (citronellal et citral, un mélange de néral et de géraniol) ;
- Alcools terpéniques (eugénol, géraniol, citronellol, linalol) ;
- Sesquiterpènes (caryophyllène) ;

Les autres composants de la mélisse sont :

- Acides phénols (acide rosmarinique, acide chlorogénique, acide caféique) ;
- Tri-terpènes (acide ursolique et oléanique, acide hydroxyoléanolique) ;
- Flavonoïdes (dérivés de la lutéoline et du quercétol) ;
- Coumarines ;
- Tanins (les dérivés hydroxycinnamiques) ;
- Mucilages uroniques (**Anonyme 2**).

#### 2.4.1. Les principaux effets de la Mélisse

- Relaxant
- Antispasmodique
- Stimule la transpiration
- Favorise l'évacuation des gaz
- Antiviral
- Tonique nerveux (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

#### 2.5. Usages traditionnels et courants de la Mélisse

- Cette plante a un effet bénéfique sur le moral. Pour les uns, son utilisation accroît la longévité; elle guérit les blessures, apaise les palpitations et les rages de dents ;
- La mélisse est une relaxante efficace en cas d'anxiété, de dépression légère, de nervosité et d'irritabilité ;
- Elle diminue l'émotivité et apaise les palpitations cardiaques d'origine nerveuse. La mélisse est également indiquée lorsque l'anxiété provoque des troubles digestifs tels qu'indigestions, acidité, nausées, ballonnements et coliques ;
- La mélisse élimine les éruptions dues au virus de l'herpès et en réduit la fréquence.
- La mélisse serait efficace en cas d'hyperexcitabilité due à un dérèglement de la thyroïde (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

### 3. Le Thym « *Thymus pallesecns* de Noé »

#### 3.1. Généralités

Le thym est la célèbre farigoule des garrigues provençales. Connue surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales. Fortifiant et antiseptique, le thym soulage aujourd'hui encore de multiples troubles plus particulièrement les troubles respiratoires.

**Thymus** est un genre de plantes (couramment appelées **thym** ou **serpolet**) de la famille des Lamiacées. Ce genre comporte plus de 300 espèces. Ce sont des plantes rampantes ou en coussinet portant de petites fleurs rose pâle ou blanches. Ces plantes sont riches en huiles essentielles et à ce titre font partie des plantes aromatiques. La principale huile essentielle du thym commun (*Thymus vulgaris*) est un terpénoïde qui lui doit son nom, le thymol, une substance bactéricide.

#### 3.2. Étymologie

Le nom de « Thym » est la francisation de *Thymus* qui désignait en latin plusieurs Lamiacées aromatiques de petite taille, lui-même issu du grec *thumon* qui signifie « offrande (que l'on brûle) » et « parfum », à cause de l'odeur agréable que la plante dégage naturellement ou lorsqu'on la fait brûler. Le nom provient de l'égyptien *tham*, nom d'une plante servant à embaumer les corps ou de la racine grecque *thy*, signifiant « exhiler une odeur »

#### 3.3. Histoire

Les Égyptiens et les Étrusques utilisaient le thym mélangé aux onguents pour embaumer leurs morts. Les Grecs en brûlaient devant l'autel de leurs dieux, sur les places publiques et dans les riches demeures, pensant que cette plante était source de courage ; ils en mettaient aussi dans leurs plats. Le thym était aussi utilisé à profusion comme parfum stimulant qu'ils versaient dans leur bain ou dont ils oignaient le corps. La légende veut que Paris enleva Hélène et que la princesse était fort triste : à chaque larme qui tombait de ses yeux sur le sol, naissait une touffe de thym. Théophraste connaissait deux espèces de thym, l'un blanc, médicinal et très mellifère, l'autre noir, « qui corrompt l'organisme et suscite la bile ».

Les Romains, la diffusant en Europe, en faisaient de nombreuses sortes de cosmétiques (eau de toilette parfumant même leurs couches, baume censé retarder le vieillissement) et s'en servaient pour purifier leurs pièces d'habitation et pour « donner du parfum aux fromages et liqueurs. » (Grieve M., 1931).

### 3.4. Caractéristiques botaniques

#### 3.4.1. Description de la plante

Le thym est une plante sous-ligneuse érigée ou prostrée, odorante, formant des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à 20 cm au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocailleux et dans les garrigues.

Ses tiges sont ramifiées tortueuses et ligneuse peu touffues et d'où les rameaux dressés sont grisâtres et compactes

Les feuilles de thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui, est tubuleux à deux lèvres et la corolle est plus au moins exserte à deux lèvres aussi (Quezel & Santa, 1963).

#### 3.4.2. Classification botanique

- **Nom scientifique** : *Thymus pallescens* de Noé.
- **Nom commun** : Thym, serpolet, زعيترة (en arabe)

#### Systematique

Selon Engler (1829- 1926), la classification de *Thymus pallescens* de Noé est la suivante

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Spermaphyte
- **Sous- embranchement** : Angiosperme
- **Classe** : Magnolopsida
- **Sous- classe** : Métaclamydées
- **Ordre** : Tubiflorale
- **Famille** : Lamiaceae
- **Genre** : *Thymus*
- **Espèce** : *Thymus pallescens* de Noé.

### 3.4.3. Habitat et culture

Ce thym est très résistant, il a besoin de soleil et pousse à l'état sauvage sur les collines arides et rocailleuses des régions méditerranéennes. La germination prend deux ans, il est préférable de reproduire la plante par division de racines, par marcottage ou par bouturage au printemps. On cueille les parties aériennes à la fin de l'été. (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

### 3.5. Les principaux constituants du Thym

La tige de thym contient en plus de l'huile essentielle des flavonoïdes (thymonine, cirsilineol et 8-methoxy-cirsilineol), des acides phénols (notamment caféique et rosmarinique), des tanins et une résine (**Haraguchi et al., 1996**).

En pharmacie le thymol et carvacrol sont employés en collutoires, dans les dentifrices, les savons, les onguents, les lotions, les pastilles pour la gorge et les remèdes antigrippes.

La composition chimique de l'HE de thym est variable, elle dépend d'un nombre de facteurs principalement d'origine génétique et édaphoclimatique, elle dépend aussi de la saison de cueillette (stade végétatif) (**Hazzit et al., 2009**).

Selon la littérature, environ 84 huiles essentielles du thymus ont été analysées de 1960 à 1989 (**Stahl-Biskup, 1991**).

#### 3.5.1. Les principaux effets du Thym

##### a) Usage interne

- Stimulant général, physique et psychique de la circulation capillaire
- Tonique nervin
- Apéritif
- Hyper tenseur
- Antispasmodique, stomachique
- Balsamique, expectorant (modificateur des sécrétions)
- Antiseptique intestinal, pulmonaire, génito-urinaire
- Stimulant de la leucocytose dans les maladies infectieuses, diurétique, sudorifique, emménagogue, carminatif, vermifuge et hypnotique léger (**Valnet, 1979**).

##### b) Usage externe

- Antiseptique et bactéricide (surtout essence peroxydée)
- Antivenimeux, antiputride, cicatrisant, révulsif, antirhumatismal et parasiticide (**Valnet, 1979**).

### 3.6. Usages traditionnel et courant du Thym

- Contre les infections : le thym est excellent contre la bronchite, la coqueluche, la pleurésie .L'infusion soigne les infections bénignes de la gorge et des bronches.
  - Le thym est prescrit aux enfants asthmatiques. Il est efficace en cas de rhume des foins.
  - Le thym est prescrit aux enfants comme vermifuge.
  - Le thym soulage les piqûres d'insecte à appliquer sur la peau en usages externes.
  - On l'utilise en cas de douleurs sciatique ou rhumatismales.
  - Il soigne aussi l'herpès, le pied d'athlète, les aphtes, les mycoses, la gale et les poux.
- (Larousse des plantes médicinales, 2001).**



---

## Chapitre III : Procédé d'irradiation

---

### Introduction sur l'ionisation des denrées alimentaires

La conservation des aliments, pratiquée depuis la préhistoire, notamment par l'usage du sel, consiste à traiter la nourriture de sorte que soit arrêtée ou fortement ralentie sa détérioration, afin de réduire au minimum les risques d'intoxication alimentaire, tout en maintenant la valeur nutritionnelle et le goût de l'aliment. L'innocuité des aliments a de tout temps été une préoccupation importante et figure toujours parmi les priorités de nombreux pays. Les exigences des consommateurs en regard de la qualité et de la sécurité sanitaire des aliments sont, en fait, de plus en plus élevées. De nouveaux risques sanitaires, liés notamment à la contamination des aliments par des microorganismes pathogènes, peuvent apparaître du fait des changements dans les méthodes de production et de transformation des aliments. Les techniques de traitement des aliments, parmi lesquelles on retrouve l'irradiation, peuvent jouer un rôle important dans l'amélioration de la sécurité alimentaire et de l'hygiène des aliments, officiellement appelée « ionisation » (moins péjoratif), l'irradiation des aliments est l'une des trouvailles de l'industrie nucléaire pour les applications civiles de l'atome. Cette technique utilisée par l'industrie agroalimentaire depuis une cinquantaine d'années a pour objectif d'augmenter la durée de conservation des aliments en leur infligeant une dose radioactive « légère ». Cette dose ne produit pas d'aliments « contaminés », c'est-à-dire radioactifs.

En Europe, l'irradiation est autorisée, en principe, pour un nombre limité de denrées : les herbes aromatiques séchées, les condiments et les épices.

### 1. Définition de l'irradiation des aliments

L'ionisation consiste en un traitement physique sur les aliments et leur emballages en vue d'assainir et d'allonger la conservation de l'aliment. Cette technique consiste à soumettre une denrée alimentaire (dans son emballage final) à l'action des rayonnements ionisants.

L'irradiation des aliments permet théoriquement d'améliorer la salubrité des aliments en réduisant le nombre de microorganismes responsables des toxi-infections et de prolonger la durée de conservation des aliments périssables en empêchant la germination des plantes racines. Les autorités chargées de veiller à la santé et à la sécurité, dans plus d'une cinquantaine de pays, ont à ce jour approuvé cette technologie pour assurer une meilleure conservation de plus de soixante aliments différents, allant des épices aux grains, en passant par le poulet désossé, le bœuf, les fruits et les légumes.

## 2. Historique

Le traitement ionisant des aliments n'est pas un procédé nouveau: en 1898, l'Allemand Reider démontre l'action létale des rayons X. En 1904, l'Américain Green précise les propriétés stérilisantes du radium. En 1930, le Français Wurtz dépose un brevet sur la stérilisation des aliments par rayons durs pénétrants.

Il faudra attendre les années 1970 pour voir apparaître un intérêt conséquent porté à ce procédé, ce qui a permis de lancer des études plus approfondies sur les effets, sur les principes nutritifs et le potentiel cancérigène et mutagène du traitement des aliments par ionisation. Cet intérêt est également marqué par la mise en place dès 1972 d'un vaste programme international en matière d'ionisation et financé par 24 pays.

De très nombreuses études ont depuis établi l'innocuité des aliments ionisés, dans un premier temps jusqu'à 10 KGy, puis sans limitation de dose commerciale (OMS, 1997).

## 3. Types de rayonnement

L'irradiation des aliments fait appel à une forme particulière d'énergie électromagnétique, l'énergie des rayonnements ionisants. Le terme « rayonnements ionisants » est utilisé pour décrire les différents types de rayons alpha, bêta et gamma car ils déterminent à l'intérieur de tout matériau qu'ils viennent bombarder, la production de particules chargées d'électricité qui sont appelés ions.

Les éléments radioactifs émettent donc des rayonnements. La particularité de ces rayonnements est de posséder une énergie suffisante pour modifier la structure atomique de la matière qu'ils traversent. Nous pouvons aussi dire que plus un rayonnement aura une petite longueur d'onde, plus il sera apte à traverser la matière : c'est le phénomène d'ionisation. Les rayonnements sont habituellement classés selon leur pouvoir de pénétration dans la matière. Le tableau 06 fait la description des rayonnements et de leur pouvoir de pénétration.

Tableau 06 : Force des rayonnements

Nom	Composition du rayonnement	Pouvoir de pénétration
Alpha $\alpha$	Flux de noyaux d'hélium (He)	Bloqué par une feuille de papier
Bêta $\beta$	Flux d'électrons	Arrêté par une feuille d'aluminium
Gamma $\gamma$ et rayons X	Flux d'ondes électromagnétiques de même nature que les ondes radio et ultraviolets mais beaucoup plus énergétiques	Arrêté par de grandes épaisseurs de plomb ou de béton
À l'origine de l'énergie nucléaire	Flux de neutrons	Susceptibles de rendre la matière instable et de la fissionner (diviser le noyau en deux ou plusieurs nucléides)
Électrons accélérés	Flux d'électrons accélérés	Pénétration très faible

Dans la section suivante, nous verrons plus en détail les types de rayonnement qui sont utiles pour l'irradiation des aliments.

- **Flux d'électrons accélérés**

On produit ces électrons accélérés dans des accélérateurs de particules. La pénétration dans les aliments (ou autres matière) est très faible. Elle est limitée aux traitements de surface ou pour des matières de faible épaisseur et de faible densité. Contrairement aux rayons gamma, on peut cesser leur production à volonté, comme pour les rayons X.

- **Flux de neutrons**

Le flux de neutrons est utilisé dans le domaine de l'industrie nucléaire. En fait, on se sert des neutrons pour bombarder des atomes d'uranium afin de rendre leur noyau encore plus instable et ainsi provoquer une fission (phénomène où le noyau se sépare pour former deux atomes plus stables). Pour l'irradiation des aliments, ce type de rayonnement n'est pas tellement utile en raison des dangers qui y sont associés et en raison du coût d'utilisation qui est beaucoup trop élevé.

- **Rayons alpha  $\alpha$**

Ce rayonnement est possible pour les atomes portant un noyau lourd instable. La particule alpha est en fait un atome d'hélium constitué de deux protons et de deux neutrons. Une fois la particule alpha expulsée, l'atome se retrouve dans un état excité et pourra émettre un rayonnement gamma par la suite. Ce sont donc les rayons les plus faibles qui sont émis lors de cette désintégration d'éléments radioactifs.

### - Rayons bêta $\beta$

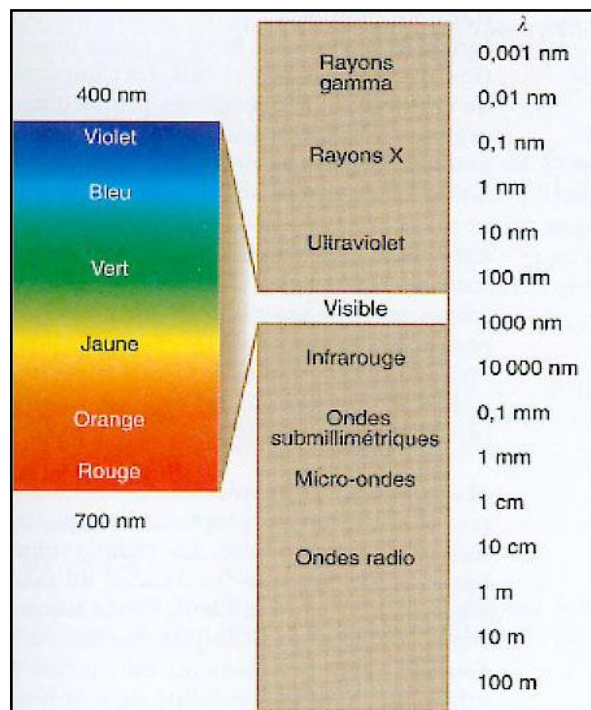
Ce rayonnement touche les atomes qui ont un surplus de neutrons. Ce sont aussi des électrons émis lors de la désintégration. Ils sont plus forts que les rayons  $\alpha$  et sont donc plus pénétrants. L'atome excité pourra, lui aussi, émettre un rayonnement gamma pour retourner à son état stable.

### - Rayons X

Les rayons X ont été découverts par Wilhelm Roentgen, en 1895, à Würzburg en Allemagne. Ce sont des rayons électromagnétiques. Les rayons X proviennent d'atomes excités par des électrons accélérés. Ils sont utilisés en imagerie médicale, pour l'inspection des bagages, pour la cristallographie, etc.

### - Rayons gamma $\gamma$

Ce type de rayonnement électronégatif est beaucoup plus fort que les rayons  $\alpha$  et  $\beta$ . Les particules émises sont des atomes d'hélium qui ont perdu leurs électrons. Ils pénètrent très fortement la matière vivante et non vivante. Il faut plusieurs couches de béton ou de plomb pour les arrêter. Ils sont analogues aux rayons X, mais sont encore plus énergétiques.



**Figure 12:** Spectre électromagnétique

#### **4. Le processus d'irradiation des aliments**

L'irradiation alimentaire est une méthode physique de traitement des aliments comparable à la pasteurisation thermique, la mise en conserve et la congélation. Il s'agit d'exposer des aliments préemballés ou en vrac à une des trois sortes d'énergie ionisante : rayons gamma, électrons produits par un appareil ou rayons X. Ce procédé est effectué dans des chambres de traitement spécial pour une période de temps précise. Le cobalt 60 représente la source de rayons gamma la plus couramment utilisée pour le traitement des aliments. Le traitement d'aliments aux rayons gamma provenant d'une source de cobalt 60 se fait dans une installation connue sous le nom d'irradiateur.

En général, la dose de radiation utilisée dans le traitement alimentaire est comprise entre 50 Gy et 10 kGy et dépend de la nature des aliments traités et de l'effet souhaité.

L'énergie gamma est constituée de radiations électromagnétiques à courte longueur d'ondes semblables aux rayons ultra-violet, visibles et infrarouges, aux micro-ondes et aux ondes radioélectriques utilisées pour la communication. Ces formes d'énergie possèdent tout un éventail d'applications, par exemple la cuisson des aliments dans un four à micro-ondes.

On utilise une forme spéciale d'énergie électromagnétique pour l'irradiation des aliments qui stimule la production des particules à charge électrique nommées « ions » par tout matériel qui entre en contact avec ces rayons, d'où le nom « radiation ionisante ».

Dans certaines situations, les rayons ionisants représentent une méthode de traitement des aliments très utile et efficace. L'énergie gamma produite par le cobalt 60 pénètre les aliments et comme la cuisson, la mise en conserve et la congélation, produit des modifications bénignes sur le plan moléculaire. En fait, l'énergie traverse tout simplement l'aliment traité. Mais, contrairement aux traitements chimiques, elle ne laisse aucun résidu. On dit que l'irradiation est un procédé « à froid » puisqu'elle ne produit aucune hausse importante de la température des aliments traités. On peut expédier, entreposer ou consommer les aliments irradiés immédiatement après le traitement.

L'irradiation dérègle l'évolution des procédés organiques qui causent la pourriture des aliments. Les molécules qui composent les aliments, par exemple les molécules d'eau, absorbent les rayons gamma, les rayons X et les électrons. Dans le cadre de ce procédé d'absorption, les cellules microbiennes, telles les bactéries, les champignons et les moisissures sont décomposés et les parasites, les insectes ou leurs œufs et larves sont soit tués, soit rendus stériles.

## 5. Les mécanismes d'action des rayonnements ionisants

### 5.1. Interaction des rayonnements et de la matière

Lors de l'application des traitements ionisants à l'assainissement et à la conservation des denrées alimentaires, on emploie des rayonnements qui possèdent une énergie suffisante pour séparer un électron orbital des milieux biologiques irradiés, convertissant ainsi ces atomes en ions positifs et générant dans la substance exposée, une ionisation.

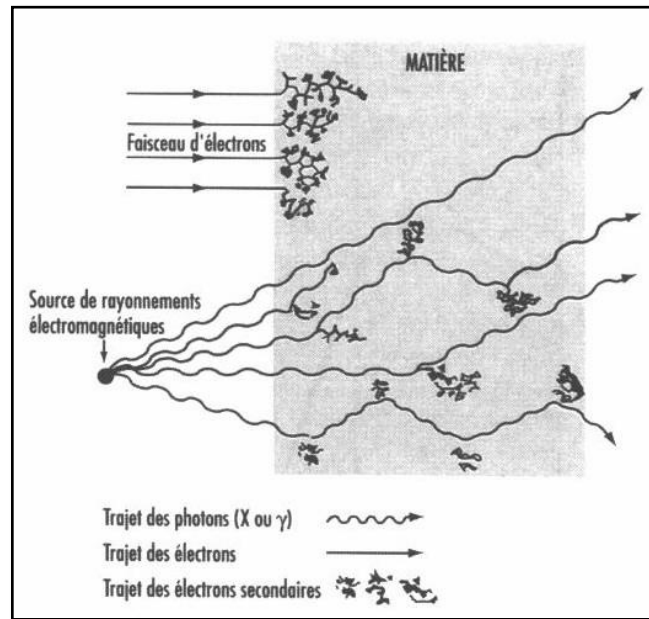
Les atomes sont globalement neutres d'un point de vue électrique. S'il manque un ou plusieurs électrons ou si, artificiellement, il en a été arraché aux couches orbitales d'un atome, cet atome est alors dit "ionisé" et sa charge électrique globale est devenue positive. Pour ioniser, il faut donc apporter une énergie suffisante pour arracher un électron. Parfois, l'énergie apportée par le rayonnement est simplement absorbée par l'atome, sans éjection d'électron. On dit alors que l'atome est excité et on parle d'excitation.

Ionisation et excitation sont deux phénomènes concomitants. Cette énergie d'ionisation et d'excitation peut se véhiculer sous la forme :

- D'ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde est de l'ordre de l'angström : 1 dix-millionième de millimètre (10<sup>-10</sup> mètre) : rayons X ou  $\gamma$ .
- De particules, essentiellement des électrons, dont l'énergie est limitée à 10 MeV (C'est l'énergie que possède un électron lorsqu'il est soumis à un potentiel de 10 millions de volts).

Les électrons et les rayons X sont produits par des accélérateurs de particules, les rayons  $\gamma$  sont fournis par des sources radioactives : <sup>60</sup>Co et <sup>137</sup>Cs.

Les énergies de ces rayonnements sont certes suffisantes pour arracher un électron aux atomes de la matière rencontrée mais se situent en dessous du seuil d'activation. Ceci veut dire qu'il est impossible d'induire le phénomène de radioactivité dans l'aliment traité. Ceci est très important, et une condition sine qua non pour l'utilisation de ce procédé de conservation.



**Figure 13:** Interaction des rayonnements ionisants avec la matière.

## 5.2. Effets du rayonnement sur le milieu

Les électrons, comme les rayonnements X ou  $\gamma$ , ont la propriété de pénétrer différents matériaux auxquels ils apportent leur énergie, provoquant ainsi l'ionisation du milieu traversé. En pénétrant dans un aliment, les électrons accélérés ou ceux formés in situ à partir de rayonnements électromagnétiques (X ou  $\gamma$ ), vont perdre leur énergie en interagissant avec les électrons des atomes du milieu traversé.

### 5.2.1. Dose et débit de dose

On définit la dose comme l'énergie déposée par les rayonnements dans un échantillon de matière. Une source radioactive émet dans toutes les directions. Une partie des rayonnements est absorbée par l'air, les écrans mis en place et les matériaux rencontrés avant d'atteindre l'échantillon. La dose de dépôt d'énergie tient compte des facteurs géométriques et des absorptions. En principe, la dose se calcule en multipliant ces facteurs par l'activité de la source et par l'énergie moyenne déposée par le rayonnement.

Ce calcul est difficile et, dans la pratique, on utilise des dosimètres pour évaluer ces doses. Le choix du dosimètre dépendra de sa gamme de lecture, de la stabilité et de la reproductibilité de sa réponse, de la simplicité de mise en oeuvre, mais également de son coût d'utilisation.

L'unité de dose est le gray (Gy), qui correspond à une énergie absorbée équivalente à un joule par kilogramme de matière. On appelle débit de dose, la dose délivrée par unité de temps qui s'exprime en gray par seconde (ou en kilogray par heure). La dose varie environ de 0,05 à 10 kGy dans le domaine alimentaire.



L'importance des transformations des aliments sera fonction de l'énergie déposée et donc de la dose absorbée.

### 5.2.2. Sources de rayonnements ionisants

Comme on l'a déjà indiqué, une condition essentielle pour qu'on puisse pratiquer l'irradiation des aliments à l'échelle industrielle est de disposer d'une source économique d'énergie radiante. Deux types de source de rayonnements répondent aujourd'hui à ce critère : des machines et des radioéléments artificiels. Malgré ces différences quant au mode de fonctionnement, ces deux types de source ont des effets identiques sur les aliments, les micro-organismes et les insectes.

Les machines appelées «accélérateurs d'électrons» produisent des électrons, lesquels constituent une forme de rayonnement ionisant. Les électrons sont des particules subatomiques qui ont une très faible masse et portent une charge électrique négative. Les faisceaux d'électrons accélérés sont utilisables pour irradier les aliments pour un coût relativement modique. Mais cet avantage est compensé par le fait que les faisceaux d'électrons accélérés ne pénètrent à l'intérieur des aliments que sur une distance maximale de l'ordre de 8 cm, ce qui n'est pas suffisant pour répondre à tous les objectifs de l'irradiation. Les électrons accélérés sont donc particulièrement utiles pour le traitement des céréales ou des aliments pour animaux qui peuvent être disposés en couches minces avant le traitement ; l'irradiation par un faisceau d'électrons convient particulièrement bien dans ces applications car la manutention des céréales implique un débit très élevé, outre qu'il est très commode de pouvoir mettre la machine en circuit ou hors circuit quand on le désire.

Une autre source de rayonnements ionisants consiste dans le générateur de rayons X. Les rayons X sont des ondes électromagnétiques semblables à la lumière. A la différence des électrons accélérés, les rayons X ont un très fort pouvoir de pénétration à l'intérieur de certains matériaux. Mais comme les premiers expérimentateurs l'ont constaté, la transformation d'électricité en rayons X donne un très mauvais rendement, de sorte qu'elle est coûteuse. Les générateurs de rayons X qu'on utilise pour le traitement des aliments sont en général une variante de ceux qu'on utilise en radiographie médicale et industrielle et sont mal adaptés pour fournir l'énergie nécessaire au traitement des aliments. Des perfectionnements récents semblent devoir déboucher sur un nouveau type de générateurs de rayons X qui ne présenteront plus ces problèmes de coût et de puissance délivrée.

Les radionucléides artificiels constituent l'autre grande source de rayonnements ionisants ; ce sont des substances radioactives qui se désintègrent en émettant des rayons gamma ionisants, utilisables pour le traitement des aliments. Un radionucléide facile à obtenir en grande quantité est le cobalt-60, obtenu par bombardement neutronique, à l'intérieur d'un



réacteur nucléaire, du cobalt-59 naturel. Un autre radioélément, le césium-137, sous-produit des réacteurs nucléaires, est disponible en moins grandes quantités et n'est guère utilisé à l'heure actuelle. 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.

### 5.3. Effets chimiques

Des processus chimiques accompagnent l'ionisation et l'excitation de la matière traversée par les rayonnements. L'importance des effets induits dépend de l'état dans lequel se trouve la substance irradiée. En phase solide où les interactions moléculaires demeurent relativement limitées, seul intervient un effet direct du rayonnement. En phase aqueuse où s'opèrent les recombinaisons liées aux propriétés diffusives du milieu, un effet indirect s'ajoute à l'effet direct.

#### - *Effet direct : mécanismes des réactions de radiolyse*

Les processus d'ionisation et d'excitation entraînent la rupture des liaisons chimiques unissant les atomes d'une molécule ainsi que l'apparition de fragments moléculaires doués d'un grand pouvoir d'oxydation et appelés radicaux libres (notés  $X \cdot$ ).

#### - *Effet indirect : radiolyse de l'eau et des solutions aqueuses*

L'interaction entre une particule chargée (ou une radiation électromagnétique) et une molécule d'eau peut conduire:

- Soit à l'ionisation de cette molécule en provoquant l'arrachement d'un électron orbital,
- Soit à l'excitation de cette molécule si l'énergie du rayonnement est trop faible pour l'ioniser.

Ceci provoque la formation de radicaux libres. Ces espèces possèdent un électron dit célibataire, c'est-à-dire non apparié à un autre électron, ce qui formerait une liaison entre deux atomes. Cela le rend très réactif parce puisqu'il essaie d'apparier cet électron célibataire avec un autre appartenant à un autre radical libre.

Il convient de noter l'importance particulière de l'oxygène en tant que soluté, car cette molécule bi radicalaire (possédant deux électrons célibataires) est très réactive avec les radicaux libres et les molécules insaturées. Elle forme avec les produits de radiolyse, entre autres, des ponts peroxydes responsables notamment du rancissement des matières grasses en réagissant avec des lipides insaturés.

Les produits de radiolyse sont donc des molécules étrangères qui ne se trouvent pas dans l'aliment avant son traitement puisqu'elles sont consécutives à l'irradiation.

Il est à noter que ces produits de radiolyse sont de même nature que les produits de thermolyse (c'est-à-dire les composés étrangers consécutifs à un traitement par la chaleur à des fins également de conservation). De plus ils sont produits par ionisation en moindre quantité que dans les « stérilisations » par chaleur.

#### 5.4. Effets biologiques

Ce sont les effets biologiques des rayonnements ionisants qui sont principalement recherchés lors de leur utilisation dans le domaine agroalimentaire, et plus précisément leur action sur les agents d'altération alimentaire : microorganismes indésirables (virus, bactéries, levures ou moisissures), parasites ou métabolismes d'altération.

L'absorption d'énergie se traduit par des effets physico-chimiques directs, et par des effets indirects résultant de la radiolyse de l'eau présente dans le milieu ionisé. L'ionisation a des effets au niveau moléculaire, cellulaire ou au niveau de l'organisme entier. Mais le principal élément visé par le traitement est l'ADN (acide désoxyribonucléique), molécule très radiosensible.

Deux éléments se dégagent des analyses expérimentales :

- la radiosensibilité augmente avec la taille et le degré d'organisation de la cellule,
- pour un type d'organisation donné, la radiosensibilité croît avec la quantité d'acide nucléique contenue dans la cellule.

Les effets biochimiques induits sur les constituants organiques du vivant par les traitements ionisants sont relativement modérés dans le domaine d'énergie utilisée. La proportion de chacun des produits de radiolyse formés est faible (0,1 à 0,2 ppm).

**Tableau 07:** Les effets biochimiques induits par les traitements ionisants.

Constituants organiques	Effets
Protéines	Négligeables
Glucides	Négligeables
Lipides	Réactions possibles sur les lipides insaturés: formation de peroxydes (rancissement)

## 6. Principales applications et limitations de l'ionisation

### 6.1. Les applications

Trois termes sont utilisés pour caractériser les différentes applications possibles :

- **la radurisation** : application de doses ionisantes réduisant sensiblement la charge microbienne du produit en vue d'allonger légèrement sa durée de vie commerciale (doses inférieures ou égales à 5kGy),
- **la radication** : application de doses d'irradiation suffisantes pour réduire le nombre de micro-organismes pathogènes de façon à ne pouvoir les mettre en évidence par aucune méthode microbiologique connue (doses inférieures ou égales à 10 kGy),
- **la radappertisation**: application de doses d'irradiation suffisantes pour réduire le nombre de microorganismes vivants de façon à ne pouvoir les mettre en évidence par aucune méthode microbiologique connue (doses comprises entre 20 et 50 kGy).

### 6.2. Les limitations

Les limitations concernent le domaine nutritif, en revanche les techniques d'ionisation peuvent entraîner des modifications au niveau de la flaveur (goût, odeur) des aliments, de leur texture et/ou de leur odeur. Ces modifications organoleptiques proviennent de la radiolyse des constituants alimentaires entraînant souvent des changements qualitativement très mineurs (mais suffisants) de la structure de certains constituants. Ceci ne présente aucun risque pour le consommateur mais rend impossible la commercialisation des produits traités.

## 7. Législation et réglementation de l'irradiation des aliments

Les pays qui autorisent l'utilisation des rayonnements ionisants pour le traitement des aliments et, dans le cadre d'une pratique sûre et efficace en matière d'irradiation, le **codex Alimentarius** (commission FAO/ OMS/ AIEA) recommande une dose moyenne de 10kGy. Aussi les aliments ainsi traités garantissent la sécurité sanitaire et la qualité des aliments. (OMS, 1999).

## Chapitre IV : Activité antioxydante

---

### Introduction

Un paradoxe du métabolisme de la vie sur terre est que la majorité des être vivants ont besoin de dioxygène pour assurer leur existence alors que le dioxygène est une molécule hautement réactive qui produit des dégradations sur les organismes vivants. Cependant, les organismes possèdent un système d'antioxydants et d'enzymes qui agissent ensemble pour empêcher l'endommagement des composants des cellules comme l'ADN, les lipides et les protéines.

Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamines A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), les polyphénols et le lycopène. Ceux-ci incluent les flavonoïdes (très répandus dans les végétaux), les tanins (dans le cacao, le café, le thé, le raisin, etc.), les anthocyanes (notamment dans les fruits rouges) et les acides phénoliques (dans les céréales, les fruits et les légumes).

Les antioxydants vont réduire les radicaux libres si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé.

### 1. Les antioxydants ou antioxygènes

#### 1.1. Définition

D'un point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances présentes à concentration faible par rapport à celle du substrat oxydable et qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques.

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (**Boyd et al., 2003**). Se sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent inoffensifs (**Vansant, 2004**).

La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives connues sous le nom d'oxygène actif (**Boyd et al., 2003**).

Un antioxydant alimentaire idéal doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose et non toxique, n'entraînant ni coloration ni odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques et stable dans le produit fini (**Pokorny et al., 2001**). Ils agissent à la

manière d'un catalyseur négatif capable d'interrompre la réaction en chaîne d'oxydation et empêchant la formation de radicaux libres.

## 1.2. Caractéristiques des antioxydants

Un composé est considéré comme antioxydant s'il requiert les propriétés suivantes :

- Le produit de la réaction de l'antioxydant avec l'oxydant ne doit pas être toxique pour l'organisme ;
- L'antioxydant doit être présent dans l'organisme en concentration suffisante ;
- La demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

Le tableau 08 regroupe les propriétés des antioxydants

**Tableau 08 : Propriété des antioxygènes (Richard et Multon, 1992).**

Nature	Solubilité	Stabilité à la chaleur	Remarques	Exemples d'application
<b>Tocophérols</b>	Liposolubles	Dégradés par la chaleur	Présents naturellement dans les huiles végétales	Matières grasses et aliments diététiques
<b>Acides ascorbique</b>	Hydrosolubles	-	-	Boissons
<b>Palmitate d'ascorbyle</b>	Peu liposolubles amélioré en présence de monoglycéride	-	-	-
<b>BHT</b>	Bonne solubilité dans les huiles et graisses	Bonne stabilité	Plus volatile que le BHA	Efficace dans les graisses
<b>BHA</b>	Très soluble dans les huiles et les graisses	Très stable	Action « carry-through » synergie avec BHT et Gallates	Huiles pour la friture, produits transformés
<b>Gallates</b>	Solubles dans les huiles et les graisses	Thermosensibles	Formation de complexes colorés avec le fer en présence d'eau	Stabilisation des huiles
<b>TBHQ</b>	Très Solubles dans les huiles et les graisses	Thermostables	Peu volatile mais sensible au pH	Stabilisation des huiles

### 1.3. Types d'antioxydants

#### 1.3.1. Classement des antioxydants selon l'origine

Il existe deux grandes familles d'antioxygènes, ceux d'origine naturelle et ceux de synthèse.

##### a. Antioxydants de synthèse

Les antioxydants de synthèse habituellement utilisés sont les composés phénoliques comme le Butyl Hydroxy Anisole (**BHA**), Butyl Hydroxy Toluène (**BHT**) et le Ter-Butyl-Hydroxy-quinone (**TBHQ**) et les esters de l'acide gallique. Les antioxydants phénoliques sont toujours substitués par les alkyls qui ont prouvé une plus grande solubilité dans les graisses et les huiles.

##### b. Antioxydants naturel

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposées. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E ... etc.

Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Svoboda et Hampson, 1999**).

*La vitamine E* est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libre et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement (**Maydani, 2000**)<sup>a</sup> et la diminution de l'athérosclérose (**Maydani, 2000**)<sup>b</sup>. Il a été déterminé que la vitamine E naturelle, semble être deux fois plus biodisponible que la vitamine E synthétique (**Burton et al., 1998**). La vitamine E est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines (**Versant, 2004**).

*Les caroténoïdes* sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, empêchent les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydant en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des oncogènes, augmentent l'activité de communication des GAP jonctions.

**La vitamine C** ou **l'acide ascorbique** est un micronutriment qui n'est pas synthétisé par l'organisme humain et doit être apporté par les aliments. Cette vitamine hydrosoluble est capable de réagir directement avec les radicaux superoxydes, hydroxyles et l'oxygène

singulet, pouvant jouer le rôle d'antioxydant. L'acide ascorbique agit comme un piègeur  $2\text{O}_2^{\cdot -} + \text{acide ascorbique} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{acide ascorbique} + 2\text{H}_2\text{O}$  (Wang *et al.*, 2000).

### 1.3.2. Classement des antioxydants selon leurs mécanismes d'action

Les antioxydants peuvent aussi être classés selon leurs mécanismes d'action :

#### a. 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 composés phénoliques naturels : tocophérols ou de synthèses : le Butyl Hydroxy Anisole (BHA) appartiennent à cette classe d'antioxydants (Kortenska *et al.*, 2002).

#### b. Antioxydant de type II

Ce type d'antioxydants prévient la formation des radicaux libres et peut intervenir par différents mécanismes. Certains chélatent les ions métalliques réduisant l'effet pro-oxydant des ions, c'est le cas des acides phosphorique et citrique, lécithines (Gunstone *et al.*, 1983).

L'acide ascorbique a une activité antioxydante à des concentrations supérieures à 0,5% tandis qu'il possède un effet pro-oxydant à faible concentration : 0.02- 0.03% (Decker *et al.*, 1998).

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 al.*, 1998).

#### c. 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'emballage des produits permet ainsi de minimiser l'exposition à l'air et à la lumière. La mise sous vide permet de limiter les réactions d'oxydation et donc de prolonger la durée de vie des produits. L'emballage peut également être réalisé sous atmosphère modifiée (azote ou  $\text{CO}_2$ ) (Eymard, 2003).

#### d. Les agents synergiques

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection. Parmi eux se trouvent : les acides lactique, tartrique, et orthophosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium.

Par ailleurs les antioxydants de synthèse sont de moins en moins utilisés dans les denrées alimentaires. Des études ont montré que certains antioxydants ne sont pas inoffensifs pour l'homme.

Le tableau 09 donne quelques exemples d'antioxydants synthétiques ainsi que les effets qu'ils provoquent :

**Tableau 09:** Quelques antioxydants synthétiques et leurs effets sur la santé humaine (Moll et al., 1998).

Antioxydant	Effet
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gallate de propyle.</li> <li>• Gallate de d'octyle.</li> <li>• Gallate de dodécyle.</li> </ul>	A forte dose, sensibilisation cutanée, notamment, réaction de la muqueuse buccale.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• BHT (Butyl Hydroxy Toluène).</li> <li>• BHA (Butyl Hydroxy Anisol).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ élévation du taux de lipides et de cholestérol dans le sang.</li> <li>▪ Hypertrophie du foie et retard de la croissance pour le BHT.</li> <li>▪ Développement de réactions allergiques.</li> <li>▪ Développement de tumeurs.</li> </ul>

#### e. Enzymes comme antioxydants

Une question qui se pose actuellement est l'utilisation des enzymes comme antioxydants. En effet, elles agissent en provoquant trois types de réactions :

- L'élimination de l'oxygène;
- L'élimination des espèces de l'oxygène actif appelés aussi les espèces réactives de l'oxygènes (ERO) comme les radicaux peroxyde et superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ );
- La réduction des hydroperoxydes des lipides.

Cette utilisation n'est pas autorisée dans l'UE (Union Européenne). La stabilité des enzymes en présence des lipides est difficile à prédire et on estime que des recherches sont nécessaires dans ce domaine (Moll et al., 1998).

#### 1.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des substances actives sont relativement peu nombreuses et font intervenir en générale la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'un agent antioxydant (substances actives).



Selon la bibliographie, les méthodes les plus utilisées sont celles de la réduction du 2,2- diphenyl -1- picryl – hydrazyl (**DPPH**), de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique (**Hussain et al., 2008**), du blanchiment du  $\beta$ - carotène dans l'acide linoléique et la chélation des métaux (**Wang et al., 2010**) et (**Nikhat et al., 2009**).

Les méthodes les plus fréquemment utilisées sont les suivantes :

#### 1.4.1. Analyses des peroxydes

##### a) Indice de peroxyde

- **Méthode iodométrique** : cette méthode consiste à réduire le peroxyde à l'aide de l'acide iodure de potassium, qui s'oxyde lui-même en iode que l'on détermine (**Moll et al., 1998**). C'est la méthode **AFNOR T60-200**.
- **Méthode colorimétrique** : les peroxydes présents dans le milieu oxydent le  $\text{Fe}^{+2}$  et  $\text{Fe}^{+3}$  qui est dosé sous forme de chlorure ou de thiocyanate ferrique (**Mitsuda et al., 1966**).

b) **Test de SWIFT ou AOM (active oxygen method)** : C'est un test accéléré qui consiste à faire barboter de l'air dans la matière grasse à 98°C. On détermine ensuite l'indice de peroxyde (**Moll et al., 1998**).

c) **Le Rancimat** : Il s'agit d'un test d'oxydation accéléré où l'on fait buller, dans la matière grasse chauffée à haute température un courant d'air, le gaz qui sort et qui transporte les produits d'oxydation est recueilli dans un bain d'eau distillée dont on mesure en continu la conductivité.

##### d) Analyse des produits secondaire de l'oxydation

- ✓ **L'indice de TBA (IUPAC 2.531)** : le teste de l'acide thiobarbiturique est l'un des plus utilisé. Cet acide réagit avec les produits de l'oxydation et donne un pigment qui absorbe à 532 nm.
- ✓ **L'indice de p-anisidine (IpA) – IUPAC 2.504** : les composés aldéhydiques  $\alpha$ -insaturés oxydés réagissent avec la para-anisidine pour former un complexe coloré qui absorbe à 530 nm, ce test est souvent associé à l'indice de peroxyde.
- ✓ **Le dosage des composés volatils** : tels que les hydrocarbures pentanes, hexane, ethane, les adéhydes pentanal, hexanal et la cetone 1,5 octadiène 3-one.

e) **Détermination des diène conjugués** : la formation des hydroperoxydes à partir des acides gras polyinsaturés conduit à la conjugaison de la structure pentadiène. Cela

représente une méthode simple et rapide pour évaluer la détérioration oxydative d'une huile.

#### 1.4.2. Mesure de l'oxydation des lipides

Pour déterminer l'état d'oxydation d'un aliment, il est nécessaire de mesurer simultanément les quantités des produits primaires et secondaires résultant de l'oxydation des lipides (Velasco et Dobargane, 2002). Parmi les méthodes utilisées on peut citer :

- **Analyse des substrats d'oxydation**

Ces méthodes sont manométriques (mesure de la pression partielle en oxygène), polarographiques (mesure de la consommation d'oxygène), chromatographiques ou gravimétriques par mesure de l'augmentation du poids consécutive à la fixation d'oxygène.

- **Mesure des acides gras non oxydés résiduels**

La mesure des acides gras non oxydés résiduels suit de façon générale la cinétique de disparition d'un ou plusieurs acides gras insaturés présents dans l'aliment, après extraction, méthylation et analyse par chromatographie en phase gazeuse.

- **Méthodes chromatographiques;** parmi les méthodes utilisées on peut citer :

- La chimiluminescence où l'on mesure les photons produits lors de la transition des électrons de l'état excité à l'état fondamental, au cours de la formation des peroxydes, en présence d'antioxydant, la quantité de la lumière détectée est toujours plus faible (Miyazawa *et al.*, 1994).
- La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) elle permet de doser séparément les hydro peroxydes produits (Koskas *et al.*, 1983).
- La thermolyse on analyse par chromatopsie en phase gazeuse les produits volatils formés par thermo décomposition des hydro peroxydes (Saidia et Hammond, 1989).

#### 1.4.3. Mesure du pouvoir chélateur et réducteur

Les principaux métaux de transitions présents aux seins des tissus biologiques sont le fer et le cuivre. Ces derniers catalysent l'oxydation des lipides par des voies enzymatiques et non enzymatiques. Ainsi parmi les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante on rencontre la mesure des pouvoirs chélateurs et réducteurs des métaux.

#### 1.4.4. Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH

L'efficacité d'un antioxydant présent dans l'aliment peut être testée par la mesure de son pouvoir à piéger les radicaux libres.

Certains dérivés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et l'acide hypochloreux (HOCl) peuvent être générés dans les aliments et les systèmes biologiques.

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-diphenyl-1-picrylhydrazyl, l'ABTS : 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) et le DMPD : N.N. dimethyl-p-phenylenediamine.

## 2. Stress oxydatif

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (**Favier, 2003**).

### 2.1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des EOR et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (**Boyd et al., 2003**). Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (**Morel et Barouki, 1999**).

### 2.2. Les espèces oxygénées réactives (EOR)

L'appellation espèces oxygénées réactives (**EOR**) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote) mais aussi certains dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote (**Bartosz, 2003. Halliwell et Whiteman 2004**).

**Tableau 10:** Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (D'après **Bartosz, 2003**).

Nom	Symbole
<b>Espèce radicalaire</b>	
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\cdot}$
<b>Espèces non radicalaire</b>	
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO^{\cdot}$

### 2.3. Les radicaux libres

#### 2.3.1. Définition

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (**Vansant, 2004**). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé *espèces réactives de l'oxygène* (**Favier, 2003**).

L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ) (**Novelli, 1997**).

#### 2.3.2. Les principaux radicaux libres

- *L'anion superoxyde* : la molécule d'oxygène mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde, cet anion intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions.



- *Le radical hydroxyle* : ( $OH^{\cdot}$ ), il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique.
- *Le radical peroxyde* : ( $ROO^{\cdot}$ )

- L'oxygène singulet ( $O_2^{\cdot}$ ), forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Hadi, 2004).

### 2.3.3. Origine des radicaux

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire les bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telles la mort cellulaire programmée ou apoptose (Favier, 2003).

Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système respiratoire, une production d'anions superoxyde se produit lors du fonctionnement de la chaîne mitochondriale.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produit directement par les cellules phagocytaires activées. Le monoxyde d'azote, est produit par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthétases, à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (Favier, 2003).

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi source de radicaux libres (Favier, 2003).

### 2.4. Stress oxydant et ses conséquences biologiques

Le stress oxydatif se réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (Sorg, 2004). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Pincemail et al., 2002 ; Sorg, 2004 ; Kochilin-Ramonatxo, 2006).

L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell et Whiteman 2004; Valko et al., 2006).

➤ **Les lipides**

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont la cible privilégiée des EOR en raison de leurs hydrogènes bis allyliques facilement oxydables. Comme ces derniers sont les lipides majeurs des membranes cellulaires et des lipoprotéines, on comprend leurs vulnérabilités particulières, la peroxydation lipidique, se déroule en trois phases suivantes :

**a. l'initiation:**

L'attaque par un radical  $\text{OH}^\bullet$  du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné  $\text{R}^\bullet$  ( $\text{OH}^\bullet$  enlève un atome d'hydrogène du  $\text{CH}_2$  puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d' $\text{O}_2$  le radical carboné est transformé en radical peroxyde  $\text{RO}^\bullet$  (Martínez-Cayuela, 1995).

**b. la propagation**

Le radical  $\text{RO}^\bullet$  enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical  $\text{R}^\bullet$  puis un radical  $\text{RO}^\bullet$ , une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transition, les hydroperoxydes formés peuvent subir un clivage au niveau des liaisons C-C pour donner naissance à divers produits de décomposition ; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal représentant les produits les plus toxiques de la peroxydation lipidique (Martínez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel, 2001).

**c. la terminaison**

Cette phase consiste à former des composés stables issus de la rencontre entre deux espèces radicalaires ou le plus souvent par la réaction d'un radical avec une molécule antioxydante dite 'briseur de chaîne (Kohen et Nyska., 2002).

➤ **Les protéines**

Les acides aminés des protéines sont la cible des EOR, soit au niveau de leur chaîne latérale, avec formation de produits d'oxydations, soit au niveau de la liaison peptidique, entraînant la fragmentation de la chaîne (Berlett et Stadtman, 1997).

Si la majorité des acides aminés peuvent être oxydés par les EOR, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles.

L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements,

antigénicités et leurs activités, (Martinez-Cayuela, 1995 ; Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007).

Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont alors dirigées vers la dégradation protéolytique au niveau du protéasome (Jung *et al.*, 2007).

➤ *Les acides nucléiques*

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR, ils sont alors transformés en produits de fragmentation et en bases oxydées (Martinez-Cayuela, 1995).

Les EOR ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres. Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleraient au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Favier, 2003 ; Valko *et al.*, 2006).

## Chapitre V : Activités antimicrobienne

---

### Introduction

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles se trouve à la base des médecines dites alternatives, de nombreux procédés utilisés dans la conservation des produits alimentaires crus ou cuits, de substances actives exploitées dans les produits pharmaceutiques. 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 et leurs composants, 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, mais cependant des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité antimicrobienne.

### 1. Principaux agents antimicrobiens

Ce sont des agents dont le contact, dans des conditions définies avec les microorganismes, entraîne, soit l'arrêt de leur multiplication, soit leur mort. Chaque agent est défini par son spectre d'activité

#### 1.1. Agents physiques

La plupart des agents antimicrobiens physiques sont efficaces sur l'ensemble des micro-organismes. Parmi ces agents, on peut citer:

➤ **La chaleur** : L'utilisation de la chaleur est un procédé très efficace pour la destruction des micro-organismes. Très utilisés au laboratoire pour les milieux de culture et le matériel, les traitements thermiques sont à la base de la conservation de nombreux aliments.

➤ **Le froid** : Le froid entraîne le ralentissement de la croissance et des transformations microbiennes. La congélation et la surgélation par exemple permettent une stabilité totale vis-à-vis des micro-organismes et entraînent une mortalité plus au moins importante.

➤ **Les radiations électromagnétiques** : Les rayonnements électromagnétiques couvrent une très large gamme de longueurs d'onde: les rayonnements infrarouges, les ultra-violets, les rayons x, les rayons γ.



### 1.2. Les agents chimiques

Ils ont un pouvoir bactéricide et fongicide lié à la présence de composés phénoliques et d'alcools.

➤ **Les alcools** : Les alcools supérieurs ont un pouvoir bactéricide qui augmente avec leur masse molaire, mais leur solubilité dans l'eau diminue en parallèle, ce qui limite leur usage.

➤ **Le phénol et ses dérivés** : Le phénol et ses dérivés sont très utilisés à cet effet, car ils agissent à des concentrations très basses. Ils sont utilisés en médecine comme désinfectants et agissent par dénaturation des protéines de la membrane cytoplasmique des bactéries (Schoderet *et al.*, 1989).

### 1.3. Agents biologiques

Ils peuvent se traduire par la production de métabolites comme les acides et les antibiotiques. Certains micro-organismes sont considérés comme prédateurs pour d'autres.

➤ **Les HE** : Elles ont un pouvoir bactéricide et fongicide lié à la présence de composés phénoliques, d'alcools, etc. Ces huiles peuvent être remplacées par leur(s) composé(s) actif(s) : thymol, carvacrol.

➤ **Les enzymes** : Divers enzymes lytiques pourraient jouer un rôle dans la protection des aliments contre les microorganismes. Elles pourraient avoir des applications dans la conservation, spécialement quand les bactéries sporulantes sont à craindre (Bourgeois *et al.*, 1996).

## 2. Détermination de l'activité antimicrobienne

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).

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés :

- Selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'HE, soit liquide, solide ou gazeux ;
- Selon la nature du contact de l'HE avec le germe: diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant.

## 2.1. Principales méthodes

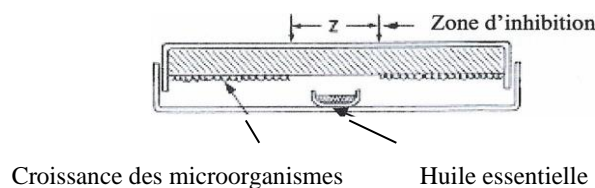
Les principales techniques actuelles de détermination du pouvoir antimicrobien des HE se divisent en deux grands groupes:

### ii. Technique de micro-atmosphère

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné d'HE au centre du couvercle d'une boîte de pétri, sans que l'HE entre en contact avec la gélose ensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée.

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non du l'inoculum.

Cependant cette méthode ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des HE, elle montre seulement l'activité des constituants volatils à la température d'incubation (**Bouchiki, 1994**).



**Figure 14:** Illustration de la méthode des microatmosphères.

### iii. Techniques par contact direct

Elles consistent à mettre en présence de l'HE les microorganismes, puis d'observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide.

L'aromatogramme ou encore méthode des disques est l'une de ces méthodes.

- **Aromatogramme**

Cette méthode a l'avantage de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement évaluée par 50 ans d'utilisation mondiale. Elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester.

Les disques sont ensuite déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les bactéries se développent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'HE suffisante pour inhiber leur croissance. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante (**Fauchère et Avril, 2002**).

- **Méthode du puits ou cylindre**

Cette méthode assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable (**Bennett et al., 1966**). Elle consiste à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution d'HE de concentration connue. L'HE diffusant radialement crée une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablementensemencée avec la suspension bactérienne (**Dorman et Deans, 2000**).

- **Méthodes de dilution et microméthode**

Les HE à traiter peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide. Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de micro-organismes et, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture; la lecture peut être visuelle ou spectrophotométrique car le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (**Giamperi et al., 2002**).

Par ailleurs, des microméthodes en milieu liquide ont été mises au point par **Delaquis et al., 2002**. Ce genre de méthode sert à la détermination des paramètres définissant l'activité antimicrobienne en introduisant des concentrations connues dans le milieu.

#### iv. La CMI et CMB

La force relative d'un antimicrobien est déterminée par des dilutions en séries. Plus le produit est dilué en restant inhibiteur de la croissance du microorganisme, plus il est puissant. La plus faible concentration qui inhibe la croissance est appelée concentration minimale inhibitrice "CMI" (**Perry et al., 2004**). Fréquemment, la CMI n'est pas totalement bactéricide, de ce fait, une partie de l'inoculum sera capable de se développer après disparition du composé inhibiteur. Ceci a amené à définir un autre paramètre, la "CMB" (concentration minimale bactéricide) qui est déterminée en milieu liquide par l'évaluation des survivants après élimination du composé inhibiteur (**Hulin et al., 1998**).

#### v. Limite de ces méthodes

Quelle que soit la méthode de contact directe choisie, ces techniques, fiables pour les agents antimicrobiens hydrosolubles, posent un problème de diffusion et d'homogénéité de dispersion avec les HE, en raison de leurs très faibles solubilités dans les milieux de culture aqueux. Un certain nombre de solutions ont été proposées. La technique de diffusion en gélose peut être améliorée par l'ajout des détergents qui facilitent la diffusion des HE dans la gélose (**Deans et Ritchie, 1987**).

Pour la méthode contact en milieu liquide, il faut disperser les HE dans une solution de détergent (Tween 80) ou solubiliser les HE dans l'éthanol avant de les introduire dans le bouillon de culture ensemencé en micro-organismes (**Kim et al., 1995**).

Avec des solvants (éthanol) ou des détergents (Tween 80), la dispersion des HE dans les milieux liquides est homogène et la diffusion dans les milieux gélosés est meilleure.

Toutefois, les CMI et les CMB obtenues dans ces conditions sont-elles dues aux HE seules, ou au mélange des HE avec les détergents ou les solvants? Selon les détergents et les solvants et selon les concentrations auxquelles ils sont employés, les CMI et les CMB varient (**Bowles et al., 1995**).

### 3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs qui la favorisent ou l'inhibent :

#### 3.1. Nature et état du micro-organisme

Toutes les espèces ne sont pas également sensibles vis-à-vis d'une substance, et dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Un agent antimicrobien est caractérisé par son spectre d'activité, c'est-à-dire le nombre d'espèces vis-à-vis desquelles son pouvoir bactériostatique ou bactéricide s'exerce (**Leclerc et al., 1995**).

L'état physiologique de la bactérie joue aussi un grand rôle: les microorganismes sont plus sensibles en phase exponentielle qu'en phase stationnaire envers les antimicrobiens chimiques, le phénomène pouvant être inverse pour des agents physiques. Les formes sporulées sont beaucoup plus résistantes aux agents physiques ou chimiques que les formes végétatives (**Guiraud, 2003**).

#### 3.2. Rôle de l'environnement

L'environnement peut influencer considérablement l'efficacité des agents antimicrobiens physiques et chimiques. Pour les agents chimiques, la solubilité dans l'eau est un facteur déterminant. La température, le pH du milieu, la turbidité, la viscosité, l'épaisseur, la dureté de l'eau et les matières organiques jouent aussi 'un rôle important.

## 4. Activité antimicrobienne des HE

Le pouvoir antimicrobien des HE et des extraits végétaux est lié à leur composition chimique, en particulier à leurs composés majeurs et sont d'ailleurs souvent remplacées par ces composés actifs.

### 4.1. Propriétés antibactériennes des HE

**Deans et al., (1987)** ont étudié l'effet de 50 HE de plantes sur 25 germes de bactéries, à quatre concentrations différentes, grâce à une méthode de contact direct en milieu solide (puits). Sous leur forme non diluée, toutes les HE inhibent un genre bactérien. Les neuf HE manifestant les propriétés inhibitrices les plus importantes sont les HE de l'angélique, du laurier, de la cannelle, du clou de girofle, du thym, de l'amande amère, de l'origan, du piment et du géranium. Elles inhibent plus de 20 genres de bactéries testés.

Après séparation et identification de différents composés de l'huile essentielle, **Kim et al.,(1995)** ; **Adam et al., (1998)** ont démontré que différents constituants des HE possèdent des activités antibactériennes et que les constituants volatils majeurs ont les propriétés antimicrobiennes les plus importantes: carvacrol (composé volatil majeur de l'HE d'origan), thymol (composé volatil majeur de l'HE de thym) , linalool (composé volatil majeur de l'HE de la coriandre), eugénol (composé volatil majeur de l'HE de poivre et du clou de girofle).

#### 4.1.1. Propriétés antibactériennes sur les bactéries pathogènes présentes parfois dans les aliments

Une étude portant sur l'activité antibactérienne des HE de onze épices turques dont l'origan, a été réalisée sur 17 bactéries pathogènes dont *Escherichia aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *P. fluorescens*, ceci par la méthode de diffusion sur disque en papier. L'activité antibactérienne des HE de six des onze épices de départ a été testée à quatre concentrations différentes (0.2, 0.4, 1 et 2%).

Les différents résultats ont montré que toutes les préparations présentaient une activité antibactérienne contre au moins une bactérie, et qu'en général, les HE testées aux concentrations de 1 et 2% étaient les plus efficaces, surtout celles de la marjolaine, du thym et de l'origan (**Özkan et al., 2003**).

#### 4.1.2. Propriétés antibactériennes sur les bactéries utiles à la transformation des aliments

Une HE utilisée comme conservateur alimentaire doit se montrer inoffensive pour les bactéries utiles à la transformation alimentaire, notamment les ferments d'acidification, d'aromatisation ou d'affinage.

**Canillac et Mouret (1996)** ont travaillé sur l'effet des HE du pin et du sapin sur des microorganismes d'affinage tels *Brevibacterium linens* et *Kluyveromyces lactis*, afin de valider leur emploi comme agents anti-*Listeria*. À 1%, l'HE du pin élimine plusieurs de ces microorganismes notamment, *Listeria sp.*, celle du sapin quant à elle est bactéricide pour *Listeria sp.* et *Micrococcus sp.* Par contre, à 0,28%, l'HE du sapin est certes, bactériostatique pour *Listeria sp.* mais n'empêche pas la multiplication d'autres microorganismes d'affinage et d'aromatisation (**Hulin et al., 1998**).

#### 4.1.3. Mécanisme d'action sur les bactéries

Plusieurs études ont montré l'apparition de fuites d'ions potassium  $K^+$  de cellules microbiennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) en contact avec du Tea-tree (*Melaleuca alternifolia*). Il s'agit de la toute première indication de dégâts irréversibles au niveau de la membrane. Des composés isolés tels le thymol et le carvacrol rendent la membrane des bactéries perméable, prémice de leur mort (**Lambert et Skandamis, 2001**). La faculté de perturber la perméabilité de la cellule membranaire, accompagnée de la perte de l'osmose chimique sont bien la preuve d'une activité létale de certaines HE (**Cox et Mann, 2000**).

#### 4.2. Propriétés antifongiques des HE

Les champignons sont des contaminants fréquents des denrées alimentaires tels les céréales, les fruits séchés et les oléagineuses. Leurs toxines secrétées occasionnent souvent de graves atteintes à la santé humaine et animale.

##### 4.2.1. Activité sur les moisissures

L'action inhibitrice de 5 HE (thym, sauge, eucalyptus, muscade, senné) a été testée à différentes concentrations (100-500 ppm) contre *Alternaria alternaria*. Les résultats obtenus ont montré que les HE de senné et de thym avaient la plus forte activité antifongique. A 500 ppm, l'HE de senné a complètement inhibé la croissance d'*Alternaria alternaria*, tandis qu'à la même concentration, celle du thym ne l'a fait qu'à 62%. Une inhibition irréversible peut être obtenue par une exposition à l'HE de senné pendant 6 jours (300ppm) ou de 3 jours (500 ppm) (**Feng et Zheng, 2007**).

Les HE de sept Labiacées marocaines ont été analysées chimiquement par CG/SM et évaluées in vitro pour leur activité antifongique contre *Botrytis cinerea*. Les HE de l'*Origanum compactum* ont totalement inhibé le développement de la moisissure et ceci à 100 ppm.

Les deux principaux composés des HE des deux plantes et qui sont le thymol et le carvacrol, sont les plus inhibiteurs (100% d'efficacité) du développement de *Botrytis cinerea*, ceci à 100 ppm (**Bouchra et al., 2003**).

Donc, les HE pourraient être proposées comme agents antifongiques dans les traitements de produits alimentaires pour prévenir la présence des aflatoxines, des ochratoxines ou des stérigmatocystines.

#### 4.2.2. Activité sur les levures

Les levures sont largement réparties dans la nature, de ce fait, elles sont capables d'altérer plusieurs types d'aliments tels: les vins, le fromage, le vinaigre, les jus, les fruits, les salades, le sucre et la viande, causant ainsi des changements de leur odeur, de leur couleur, de leur goût et de leur texture (**Souza et al., 2006**).

L'activité antifongique de l'HE d'*Origanum vulgare* L., a été évaluée en déterminant la CMI de l'HE par deux méthodes. Le test a été réalisé sur 7 levures de pourritures des aliments dont *Candida albicans* ATCC 7645, *Pichia minuscula* NI 7638 et *Rhodotorula rubra* LBFHC 1096.

Les résultats ont montré que l'HE d'*Origanum vulgare* L. inhibait le développement de toutes les levures dans les deux méthodes, mais à des CMI variables (**Souza et al., 2006**).

## 5. Activité antimicrobienne des extraits éthanoliques

Les extraits végétaux sont des polyphénols principalement composés de phénols et de flavonoïdes et selon **Biondi et al., (1993)**, les constituants phénoliques sont les principaux responsables de l'activité antimicrobienne.

Selon **Nacoulma (1996)** et **Scalbert (1991)**, La présence de tanins et de saponosides dans les extraits de plante pourrait justifier les propriétés antimicrobiennes observées car ces substances ont des propriétés antibactériennes connues.

Des propriétés antivirales chez des extraits de la plante *Detarium microcarpum* ont été rapportées (**Moore et Pizza, 1992**).

Il est bien connu que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et des espèces du genre *Bacillus*, en particulier *Bacillus cereus*, sont des agents d'intoxications alimentaires alors, selon **Burt (2004)**, il serait intéressant d'utiliser les extraits de plantes pour l'inhibition de la croissance et donc, la réduction du nombre des agents pathogènes les plus graves d'origine alimentaire.

Une étude effectuée par **Kivrak et al, 2009**, sur plusieurs souches bactériennes

parmi elles *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, a montré que l'extrait éthanolique de *Salvia potentillifolia* présente une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de ces différentes bactéries.

Cette même étude affirme que l'extrait de *Salvia potentillifolia* testé sur deux levures *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, inhibe la croissance et la prolifération de ces dernières, et donc présente une activité antifongique en plus de l'activité antibactérienne (**Kivrak et al, 2009**).

Les extraits de plante ainsi que les huiles essentielles de 10 espèces végétales parmi elles *Origanum vulgare*, ont été testés comme inhibiteurs de la croissance de *Paenibacillus larvae*, agent causal de la loque américaine ont été inclus dans l'étude. L'extrait végétal a montré la plus grande activité antibactérienne, la croissance de presque toutes les souches de *Paenibacillus larvae* testé a été inhibée par ces extraits. (**González et Marioli, 2010**)

Et selon ces travaux, les huiles essentielles ont été moins actives pour l'inhibition de la croissance des larves *Paenibacillus larvae* (**González et Marioli, 2010**).

Les activités antibactériennes des extraits pourraient justifier les indications thérapeutiques de *Detarium microcarpum* en médecine traditionnelle dans le traitement de la méningite, des diarrhées, des panaris (**Loubaki et al., 1999**).

## 6. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

Selon Hulin et al. (1998) les facteurs influençant les propriétés antimicrobiennes des HE sont:

### 6.1. Effet de la température

**Moleyar et Nasimham (1992) et Bowls et al., (1995)** ont montré respectivement que la température affecte les propriétés d'inhibition de l'aldéhyde cinnamique quand la température augmente de 20°C à 30°C et, augmente les propriétés antibactériennes des carbonyles aromatiques et aliphatiques lorsque la température baisse de 37°C à 12°C.

### 6.2. Le pH

Sur 11 composés étudiés dont l'eugénol, le maltol et le menthol, **Jay et Rivers (1984)** ont constaté une augmentation de l'activité de tous les composés à pH 6 par rapport au pH 8. À pH 5 et à la température d'incubation de 5°C, 0,01 g/l de diacétyl suffisent pour inhiber *Pseudomonas fluorescens* et *Staphylococcus faecalis*, alors qu'à 15°C, 0,078 g/l et 0,156 g/l sont respectivement nécessaires pour inhiber ces microorganismes.



## 7. Applications des HE sur les aliments

Trois HE (thym, ail, piment) ont été étudiées pour leur pouvoir antibactérien sur des saucisses de hot-dog contre *Listeria monocytogenes*. Les tests ont porté sur trois genres de saucisses: 0%, 9% et 26% de matière grasse. Les résultats obtenus montrent que le thym à une concentration de 1 ml/l inhibait parfaitement le développement dans les deux premiers genres et non dans le troisième, alors qu'à la même concentration, l'ail inhibait le développement dans les trois genres.

Les propriétés organoleptiques d'une viande de bœuf hachée contenant 1% (volume/poids) d'HE d'origan ont été améliorées durant un stockage sous un emballage sous vide et sous une atmosphère modifiée à 5°C (**Oussalah et al., 2006**).

Le développement d'*Alternaria alternaria* a été considérablement inhibé sur des tomates fraîches traitées avec de l'HE de senné et entreposées pendant 5 jours à 25°C. Le pourcentage de tomates pourries traitées avec 500 ppm d'HE était de 19,1% (**Feng et Zheng, 2007**).

Un concentré de tomate inoculé avec *Aspergillus flavus* puis traité avec 500 ppm d'HE de thym et entreposé à 25°C pendant deux mois gardait tout son goût et son arôme en plus de l'inhibition d'*Aspergillus flavus* (**Omidbeygi et al., 2007**).

En présence d'eugénol, composé majeur de l'HE du clou de girofle, la production d'aflatoxines dans les grains de maïs traités diminue d'environ 60 % par rapport aux témoins (**Hulin, 1998**).

## Chapitre VI : Activités insecticide

---

### Introduction

Depuis que les grains sont stockés par l'homme, le problème de leur conservation est posé. Il consiste à mettre hors d'atteinte des intempéries, des déprédateurs et des parasites, des masses de grains plus ou moins importantes pour des durées variables.

Le stock de graines constitue une entité formée d'une part des graines à stocker et d'autre part de l'environnement dans lequel il évolue et où il subit diverses agressions.

Ces agressions se répartissent en quatre groupes principaux :

- Les agressions d'origine mécanique sont dues à des chocs entraînant des fissures ou des brisures.
- Les agressions d'origine biochimique et chimique ; sont très variées : réaction de Maillard, dénaturation des protéines, dégradation et destruction des amidons.
- Les agressions d'origine enzymatique sont dues à des hydrolases qui dégradent les réserves biochimiques du grain.
- Les agressions d'origines biologiques sont dues à des êtres vivants (rongeurs, oiseaux, insectes, acariens et microorganismes), ce sont les insectes et les acariens en particulier, qui causent le plus de dégâts aux denrées stockées.

Les insectes présentent comme effet direct sur le grain entreposé une perte de poids, de la valeur nutritive et du pouvoir germinatif. De plus, l'humidité issue du métabolisme de leurs pullulations et les produits d'excrétion azotés favorise l'apparition de moisissures dans les lieux de stockage.

### 1. Historique

De nombreuses molécules qui présentent une action défensive du végétal contre les ravageurs ont été identifiées depuis longtemps. Ainsi plus de 2000 espèces végétales dotées de propriété insecticides ont été répertoriées. C'est donc à partir d'observation empiriques, constatant que certaines plantes se protégeaient mieux que d'autres contre des prédateurs qui importunaient aussi les hommes, que se sont développés les premiers usages phytosanitaires des végétaux (**Regnault-Roger, 2008**). Dès l'Antiquité, les Chinois, les Grecs et les Romains utilisaient des plantes ou extraits de plantes avec du soufre et de l'arsenic comme insecticides. Celles-ci ont également joué un rôle important pour la préservation des denrées stockées dans les greniers traditionnels en Afrique. Les biologistes et les grands naturalistes d'aujourd'hui, ont fondé de nouvelles approches de lutte contre les ravageurs des denrées entreposées, sur les bases de leurs connaissances scientifiques dans le domaine de biopesticides développées à

partir des utilisations ancestrales des plantes aromatiques en profitant notamment des améliorations des techniques d'analyses (Philogène, 2008).

## 2. Pouvoir insecticide des extraits végétaux

Plusieurs plantes aromatiques méditerranéennes présentent des propriétés insecticides, en exerçant un effet protecteur à double niveau : en provoquant la mort de l'insecte et en inhibant sa reproduction. Cet effet est prouvé chez de nombreuses espèces végétales appartenant à différentes familles botaniques : *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Umbelliferae*, *Lauraceae*, *Myristicaceae*,...etc. Celles qui sont le plus actives appartiennent aux *Lamiaceae* (labiées), parmi lesquelles on distingue l'efficacité du thym et du serpolet (*Thymus vulgaris* et *T. serpyllum*), du romarin (*Rosmarinus officinalis*), de l'origan (*Origanum vulgare*) (Regnault-Roger et Hamraoui, 1995).

Les huiles essentielles extraites de plantes aromatiques sont considérées comme des fumigants naturels. Elles présentent une forte toxicité chez les insectes qui sont des invertébrés (Negahban et al., 2007), alors qu'elles sont surtout connues comme présentant une faible toxicité vis-à-vis des vertébrés par US Food and Drug Administration. Cette différence de toxicité chez les vertébrés et les invertébrés est liée à la structure de leurs récepteurs octopaminergiques qui constituent les voies d'entrée des HE dans l'organisme (Enan, 2000).

### 2.1. Action des huiles essentielles

Les huiles ont des effets anti-appétant, affectant ainsi la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes.

Il y a eu également inhibition complète de la pénétration des larves dans les graines traitées avec du linalool et du thymol. De plus, ce dernier produit s'est avéré inhibiteur de l'émergence des adultes (Regnault-Roger et Hamraoui, 1995).

#### ➤ Effet sur l'octopamine

L'octopamine est un neuro modulateur spécifique des invertébrés, cette molécule a un effet régulateur sur les battements de cœur, la motricité, la ventilation, le vol et le métabolisme des invertébrés.

Enan (2000) et Isman (2000) font le lien entre l'application de l'eugénol, de l' $\alpha$ -terpinéol et de l'alcool cinnamique et le blocage des sites accepteurs de l'octopamine. Ils

concluent que l'effet peut varier d'un terpène à l'autre et que les huiles essentielles peuvent agir en tant qu'agonistes ou antagonistes du neuro transmetteur.

En général, les huiles essentielles sont connues comme des neurotoxiques à effets aigus interférant avec le transmetteur octopaminergique des arthropodes. Ces huiles sont donc peu toxiques pour les animaux à sang chaud.

#### ➤ Effet sur le système nerveux

Les huiles essentielles sont riches en monoterpènes et causent la mort des insectes par inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase au niveau du système nerveux (**Houghton et al., 2006**).

#### ➤ Effets physiques des HE

Les huiles essentielles agissent directement sur la cuticule des arthropodes à corps mou. **Isman (2000)** fait cette hypothèse car, plusieurs huiles essentielles semblent plus efficaces sur les arthropodes à corps mou.

La nature lipophile de l'huile essentielle peut dégrader la couche cireuse de la cuticule et causer des pertes en eau. Les tranchées et sacs d'air des insectes sont enduits de cette couche cireuse et sont affectés par l'huile essentielle ce qui peut entraîner l'asphyxie.

D'autres travaux ont démontré que l'huile essentielle de *Thymus persicus* possède un effet repulsif et toxique vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* et *Tribolium castaneum*. Les doses létales à 50% de cette huile contre les deux ravageurs étaient respectivement de 2.39  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  et de 234.42  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (**Moharramipour et al., 2008**).

Les huiles essentielles de trois plantes de la famille de Zingiberaceae ont montré une forte activité toxique contre *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais* (**Suthisut et al., 2011**).

Deux lépidoptères (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller et *Ephestia kuehmilla* Zeller) sont avérés très sensibles aux traitements avec de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*.

Les auteurs ont aussi détectés une réduction de la fécondité et du taux d'émérgence des ravageurs (**Bachrouh et al., 2010**).

## 2.2. Modes de pénétration des HE dans l'insecte

### ➤ Par contact

Plus récemment, il a été démontré que de nombreux constituants terpénoïdes d'huiles essentielles végétales sont toxiques au contact pour un large éventail d'insectes et peuvent être utilisés comme insecticides.

### ➤ Par inhalation

Certains Monoterpènes entraînent une toxicité inhalatoire chez certains insectes, tel que le carvacrol, linalool, eugénol, thymol, terpinéol, cuminaldéhyde,  $\rho$ -cymène, anéthole, cinnamaldéhyde,

### ➤ Par ingestion

L'ingestion de certains composés des huiles essentielles entraîne des signes d'intoxication chez l'insecte (neurotoxicité, effet anti-appétant).

## 2.3. Moyens de lutte

Les méthodes de gestion des stocks généralement utilisées sont les méthodes traditionnelles, la lutte chimique et la lutte biologique.

### 2.3.1 Les méthodes traditionnelles

D'après (Amevoin, 1998) diverses méthodes traditionnelles ont été répertoriées :

- L'utilisation de nombreuses espèces végétales ou certaines de leurs parties à activités insecticide.
- L'utilisation de la fumée ou le séchage au soleil (utilisation de la température et de l'humidité)
- L'utilisation des substances comme l'argile et le sable

### 2.3.2 La lutte chimique

Parmi les moyens utilisés, la lutte chimique qui reste à court et à moyen terme, efficace pour assurer une protection effective des stocks :

a) Insecticides de contact: sont des produits de synthèse qui pénètrent dans les tissus de l'insecte et ont un effet toxique par contact, ils sont commercialisés sous forme de poudre, de solution à pulvériser (Crus *et al.*, 1988)

b) Les produits de fumigation: sont des insecticides à haute tension de vapeur qui agissent à l'état de gaz mais sont commercialisés sous formes de pastilles comme la phosphine et le bromure de méthyle (Singh *et al.*, 1990). La fumigation est la mieux adaptée pour traiter à la fois des formes externes (adultes et œufs) et les formes qui se développent à l'intérieur de la graine (Zlter *et Arthur*, 2000).

### 2.3.3. La lutte biologique

Ce mode de lutte s'articule dans la majeure partie des cas sur l'utilisation de parasites, introduire ou réintroduire des parasitoïdes et des prédateurs comme agent de régulation des ravageurs (**Proctor, 1995**). Des efforts ont été fournis pour développer de nouveaux composés pour, les substituer à ceux couramment utilisés. L'exploitation de matières premières renouvelables d'origine végétale pour la fabrication de bio-insecticides correspond à la nécessité de répondre aux réalités environnementales actuelles telles que la lutte contre l'effet de serre, la réduction de la pollution, un faible effet toxicologique et la biodégradabilité du produit (**Hernandez-Ochoa, 2005**). Parmi les molécules à fortes valeurs ajoutées, mais présentes en faibles quantités et dotées d'une activité biologique et olfactive, citons les huiles essentielles (**Jouault, 2012**).

## 2.4. Aperçu bioécologiques des insectes

### 2.4.1. La Bruche de Niébé « *Callosobruchus maculatus* F.»

#### ➤ Caractères généraux de la famille des Bruchidae

Les Bruchidae constituent un groupe homogène d'insectes cléthrophages dont le développement se déroule en général à l'intérieur d'une même graine (**Delobel et Tran, 1993**). Ils sont pour la plupart des petits coléoptères de couleur terne (à dominante brunâtre). Un grand nombre d'espèces appartenant à cette famille sont des déprédateurs majeurs des stocks de légumineuses (**Nyamador, 2009**). Ils sont caractérisés par une forme courte, ramassée globuleuse ou sub-parallélépipédique dont la taille oscille de 3,5 à 5mm. La tête est prolongée en avant en un museau élargi et muni de deux gros yeux réniformes (**Mallamaire, 1962**).

#### ➤ Description de la Bruche de Niébé « *Callosobruchus maculatus* F. »

C'est un insecte de petite taille (2,8 - 3,5 mm) ; dont le corps est de forme oblongue de couleur brun rougeâtre à gris, les femelles ont une taille plus importante que les mâles. A l'état adulte, *Callosobruchus maculatus* est une espèce dimorphique. Il existe deux formes en fonction de la coloration et les motifs des élytres et du pygidium, l'aptitude au vol et la fécondation. Ce sont la forme volière ou active et la forme non volière ou normale (**Caswell, 1961 ; Utida, 1981**).

La forme volière ou active à fécondité faible (10 à 15 œufs) par femelle (**Glitho et al., 1988 ; Delobel et Tran, 1993**). Elle est capable de voler et est responsable de l'infestation des cultures. Généralement elle est grande de taille et la coloration rousse est souvent absente,

les facteurs déterminant l'apparition de cette forme (température, qualité du substrat trophique, humidité des graines) (Ouedrago, 1996).

La forme non volière ou normale à fécondité élevée, est caractérisée par son incapacité au vol due à ses muscles alaires atrophiés (Ouedrago et al., 1996). Cette forme est adaptée aux conditions de stockage.

#### ➤ Cycle de Développement

Le cycle de développement de *Callosobruchus maculatus* dépend de la température et de l'humidité (30 °C et 70 %) du milieu. Après l'accouplement, les femelles pondent sur les gousses en voie de maturation ou directement sur les graines. Les œufs pondus seront fixés par les femelles avec une substance gélatineuse. Lors de la ponte, une phéromone de marquage est déposée en même temps que l'œuf, elle permet à la femelle d'éviter les grains fortement infestés, et de réduire ainsi les compétitions inter-larvaires (Delobel et Tran, 1993). La moyenne des pontes par femelle varie entre 75 et 100 œufs (Larson, 1924).

L'éclosion des œufs survient 5 à 7 jours après la ponte dans des conditions favorables. La larve qui ne possède pas encore de pattes motrices perce la paroi externe de l'enveloppe de la gousse ou du tégument de la graine et rentre à l'intérieur (Fox, 1994).

La larve peut accéder directement aux réserves nutritives de la graine au niveau des gousses, comme elle peut échouer dans le vide (espaces inter-grains) ou déboucher, au cours de son transit trophique, sur un petit grain à faible réserve ne pouvant lui permettre d'atteindre le stade final de développement.

La nymphose dure 7 jours chez *Callosobruchus maculatus* (Delobel et Tran, 1993).

Elle se déroule à l'intérieur d'un seul grain. L'adulte émerge de la graine pour commencer un nouveau cycle de vie après avoir traversé la fenêtre de sortie préparée par la larve.

#### ➤ Position Systématique

C'est en 1775 que Fabricius a décrit pour la première fois la bruche du niébé sous le nom de *Bruchus maculatus*.

- **Classe :** Insecta
- **Ordre:** Coleoptéra.
- **Sous ordre:** Phytophagoida.
- **Famille:** Chrysomelidae.
- **Sous famille:** Bruchinae.
- **Genre:** *Callosobruchus*.

- **Espèce:** *Callosobruchus maculatus* F. (Southgate, 1979).

➤ **Origine et répartition géographique**

*Callosobruchus maculatus* est une espèce cosmopolite, originaire du continent Africain (Southgate, 1978). Les échanges commerciaux seraient à l'origine de sa distribution actuelle. Elle est surtout abondante en Amérique mais également sur tout le pourtour méditerranéen dans l'ouest africain à Madagascar, en Chine, au Japon et Hawaï (Lepesme, 1944).

➤ **Pertes et dégâts occasionnés par « *Callosobruchus maculatus* F.»**

D'après (Ngamo et Hance, 2007) ont rapporté que les insectes ravageurs des denrées stockées, majoritairement des coléoptères peuvent causer des pertes qualitatives et quantitatives, non seulement une réduction des graines, mais également une diminution de la qualité des graines et de la viabilité des semences, compromettant leur consommation et leur semis et ces pertes interviennent à tous les stades, de la récolte à la consommation, plus de 30% de la production est perdue (Alzouma, 1995), cette proportion est plus forte en région sahélienne du fait de la longue période de stockage (Ngamo et Hance, 2007). Si aucune protection n'est faite après sept mois de stockage, la perte des denrées peut être totale.

(Caswell, 1961) a estimé qu'au Nigeria, les pertes en poids sec dues à *Callosobruchus maculatus* excèdent les 2900 tonnes par année. (Singh et al., 1978) estiment que la totalité des graines de niébé infestées par *Callosobruchus maculatus* après une période 3 à 5 mois de stockage. Au Sénégal, les dommages en terme de graines peuvent atteindre les 99%, après 6 mois de stockages (Seck et al., 1991). Les pertes occasionnées par *Callosobruchus maculatus* avoisinent les 800 à 900 g/ kg.

D'après (Ouederago et al., 1996) en plus des pertes en poids, l'infestation par *Callosobruchus maculatus* affecte la qualité des graines, en réduisant leur capacité germinative, des pertes en éléments nutritifs, une diminution de la teneur en thiamine, une augmentation de l'acidité des gousses et une dénaturation des protéines (Southgate, 1978).



#### 2.4.2. Dendroctone de la farine « *Tribolium confusum* Duval »

##### ➤ Caractères généraux de la famille des Tenebrionidae

Les tenebrionidae constituent l'une des plus vastes familles du règne animal, ils représentent l'ordre des coléoptères avec plus de **19 000** espèces décrites. Leur répartition mondiale est principalement dans les régions désertiques (**Delobel et Tran, 1993**).

Les tenebrionidae sont des coléoptères de taille comprise entre 2 mm. et 80 mm, de forme très variée, à téguments le plus souvent rigides, épais, noir mat ou luisant, de teinte sombre, coloré ou « métallique » par interférence, avec des yeux généralement grands, ovales ou ronds chez certaines sous-familles. Antennes de 11 articles, plus rarement 10. aptères ou ailées, avec nervation alaire du type primitif, 5 sternites abdominaux, pattes longs ou tout au contraire, contractées, souvent fouisseuses (**Balachowsky, 1962**).

##### ➤ Description du Dendroctone de la farine « *Tribolium confusum* Duval »

Au stade adulte le tribolium brun de la farine est un petit coléoptère brun rougeâtre de 3,5 mm de long. Son corps est lisse et allongé. La larve vermiforme peut atteindre 6 mm de longueur à son plein développement. Elle se distingue par les deux courtes pointes qui terminent son abdomen.

Le tribolium brun de la farine est un insecte qui se déplace rapidement lorsqu'il est dérangé, mais il ne vole pas. Sa petite taille et ses pièces buccales de broyeur lui permettent de s'infiltrer dans les contenants et les emballages fermés. Les adultes et les larves se nourrissent de farines de céréales; ils sont incapables de perforer les grains non moulus. On les retrouve dans les minoteries, les usines alimentaires, les boulangeries et les habitations où ils infestent les céréales et autres produits de mouture. Lorsqu'ils se retrouvent en grand nombre, la farine prend un aspect grisâtre et moisit rapidement. Ils laissent une odeur désagréable dans les aliments, les rendant impropres à la consommation (**Anonyme 3**).

##### ➤ Cycle de Développement

###### a) L'œuf

L'œuf est oblong et blanchâtre, presque transparent à surface lisse recouverte d'une substance visqueuse qui lui permet d'adhérer à la denrée infestée il mesure en moyenne 0.6 x 0.3 mm (**Lepesme, 1944**) (**Figure 15**).

**b) La larve**

L'éclosion de l'œuf donne naissance à une larve néonate et de couleur blanche, de petite taille ne dépassant pas 1.4 mm. Elle passe par plusieurs stades dont le nombre varie de 5 à 12 selon la température, l'humidité relative et la qualité de l'alimentation.

La larve de dernier stade est cylindrique mesure environ 7 mm de long et 0,8 mm de large, sa couleur est d'un jaune pâle. Son corps presque glabre, se termine par deux paires urogomphes (**Figure 15**).

**c) La nymphe**

Est blanche et nue, les segments de son abdomen sont explantés latéralement en lames rectangulaires à bords crénelés (**Balachowsky, 1936**). La nymphe reste sans protection et est incapable de se déplacer (**Figure 15**).

**d) L'imago**

L'imago est d'un blanc jaunâtre, son tégument se sclérotinise et se pigmente 2 à 3 jours après son émergence. La couleur devient brun rouge, sa taille atteint 3 à 4 mm. Ces élytres allongés, parallèles et arrondis à l'extrémité postérieure, portent des lignes régulières de ponctuation séparées par des cotés très fins (**Lepesme, 1944**). Les pattes sont courbées, les tarses postérieurs sont formés de quatre articles (**Figure 15**).



**Figure 15** : Différents états de *T. confusum* Duval.  
a) : l'œuf ; b) : larve, c) : nymphe, d) : adulte.

➤ **Position Systématique du *Tribolium confusum* Duval.**

Selon **Lepesme (1944)** la classification de cette espèce est la suivante :

- **Embranchement:** Arthropoda.
- **Classe:** Insecta.
- **Ordre:** Coleoptera.
- **Sous Ordre:** Polyphaga.
- **Famille:** Tenebrionidae.
- **Sous Famille:** Ulominae.
- **Genre:** Tribolium.
- **Espèce:** *Tribolium confusum* Duval.

➤ **Origine et répartition géographique**

Le ver de la farine est cosmopolite, d'origine indo-australienne (**Smith et Whitman, 1992**). Il se rencontre généralement dans les boulangeries et les minoteries. Ce *Tribolium* est très nuisibles aux produits céréaliers, y compris les grains, la farine, les flocons d'avoine et le son. Il est essentiellement une espèce des pays froids, et est trouvé dans des secteurs tempérés, mais survivra l'hiver dans les endroits protégés, particulièrement où il y a de la chaleur centrale (**Tripathi et al., 2001**). En Afrique le *Tribolium* à une distribution différente en ce que se produit dans le monde entier dans les climats les plus frais (**Smith et Whitman, 1992**).

D'après, **Lepesme (1944)**, cet insecte préfère les régions tempérées et remonte assez loin dans le nord de l'Europe et de l'Amérique.

➤ **Régime alimentaire et dégâts occasionnés par « *Tribolium confusum* Duval »**

Le *Tribolium* recherche surtout les denrées amylacées pulvérulentes comme la farine, le son (**Lepesme, 1944**). Les adultes sécrètent une substance nauséabonde, riche en quinones qui donne au lot infesté une odeur particulièrement désagréable.

D'après **Steffan in Scotti (1978)**, ils sont très polyphages, ce sont des cléthrophiages secondaires, car les larves et les adultes se nourrissent surtout de brisures, elles attaquent les grains endommagés, escortent souvent les charançons ou parachèvent leurs dégâts.

## Chapitre I : Matériels et Méthodes

---

### 1. Matériels

#### 1.1. Matériel végétal

Les plantes (tableau 11) que nous avons utilisées lors de notre expérimentation sont: le Fenouil marin (*Crithmum maritimum* L.) provenant des environs de Hammamet et Ain Benian, la Mélisse (*Melissa officinalis* L.) originaire de la région de Sétif et le Thym (*Thymus pallescens* de Noé) provenant de la région d'El Kadiria wilaya de Bouira.

**Tableau 11:** Le matériel végétal utilisé.

Espèces	Parties utilisées	Etat	Date de récolte
<i>Crithmum maritimum</i> L.	Feuilles et fleurs	Frais	Aout 2015
<i>Melissa officinalis</i> L.	Feuilles et tiges	Frais	Mars 2015
<i>Thymus pallescens</i> de Noé	Feuilles	Frais	Juin 2014

#### 1.2. Matériel microbiologique

L'activité antimicrobienne des HE étudiées a été testée sur sept micro-organismes (05 bactéries pathogènes et 02 levures), qui sont tous de souches pures et issues de la collection du **CRD-SAIDAL**. Le tableau 12 illustre les principales infections causées par ces micro-organismes.

Tableau 12: Caractéristiques des souches microbiennes testées.

Souche	n° ATCC	Gram	Famille	Principales infections causées	Milieux de culture
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae	- Gastro-entérites ; - Infections urinaires ; - L'ostéomyélite et l'arthrite.	Mueller-Hinton
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	-Crampes abdominales; - Troubles digestifs.	Mueller-Hinton
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae	- Diarrhées dysentériques. - Gastro-entérites.	Mueller-Hinton
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacillaceae	-Gastro-entérites.	Mueller-Hinton
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	Enterobacteriaceae	- infections respiratoires - Infections nosocomiales : cystite, pneumopathie, septicémies	Mueller-Hinton
<i>Candida albicans</i>	24433	/	Cryptococcaceae	- Lésions cutanées ; - Infections œsophagiennes - Infections génitales.	Sabouraud
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	Saccharomycetaceae	- La fongémie - Infection urinaire - Péritonite	Sabouraud

### 1.3. Matériel entomologiques

Les espèces étudiées «*Callosobruchus maculatus* F.» et «*Tribolium confusum* Duv.» ont été acquises et identifiées dans le laboratoire de phytopharmacie du département de Zoologie de l'École Nationale Supérieure Agronomique. Elles sont entretenues par des élevages de masse dans des bocaux en verre de 16 cm de hauteur et 8 cm de diamètre au niveau du laboratoire de phytopharmacie.

Pour la bruche du Niébé la multiplication de masse est conduite dans les bocaux en verre contenant chacun 100 g de pois chiche commercial, chaque bocal est ensuite infesté par 20 couples d'insectes adultes.

Concernant l'espèce *T. confusum* l'élevage est conduit dans des bocaux en verre contenant chacun 250g de farine commerciale plus 5% levure boulangère, chaque bocal est bien mélangé puis infesté par 40 insectes adultes.

L'ensemble des bocaux contenant les élevages des deux insectes sont placés dans une étuve obscure à une température de  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  et une humidité relative de  $70\% \pm 5\%$  afin d'assurer une reproduction rapide.

## 2. Méthodes

### 2.1. Procédé d'irradiation des échantillons de thym

Au cours de ce procédé, une source de rayonnement Gamma de  $^{60}\text{Co}$  est utilisée sur les feuilles de thym séchées. L'irradiateur pilote du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) est composé de trois sources cylindriques de  $^{60}\text{Co}$  de type COP<sub>4</sub> fabriquées par ORIS (France). Elles sont disposées verticalement dans un porte-source en acier inoxydable (Figure 16). Les sources de dimension 384mm de hauteur et de 26,6mm de diamètre ainsi disposées forment une hauteur active de 1152mm. Pour des raisons pratiques une cale de 85mm a été déposée sous la source du bas. En position d'irradiation, la partie inférieure de cette source se trouve à 350 mm au-dessus de la platine. L'activité initiale au 08.10.2002 date d'installation de la source, était de  $13,32.10^{14}\text{Bq}$  soit 35990 Ci. L'activité de la source était de 6565,33 Ci au mois de Mai 2015.

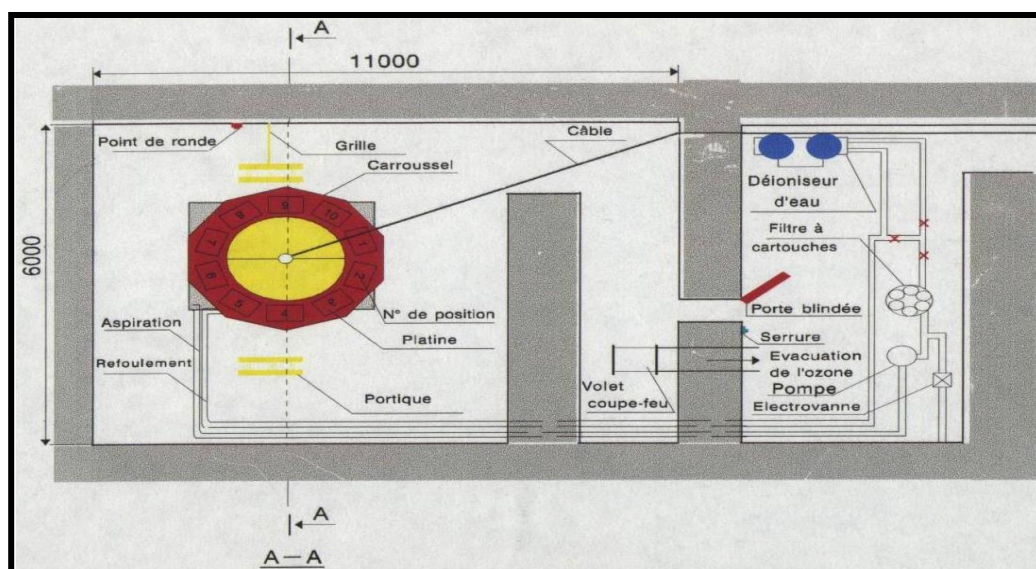


Figure 16: Schéma de l'irradiateur pilote du CRNA.

## 2.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des HE a été réalisée au laboratoire de chimie à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique par hydrodistillation au moyen d'un appareil de Clevenger modifié.

### 2.2.1. Protocole expérimental d'extraction

100 g de matière végétale constituée des parties aériennes séchées, sont introduits dans un ballon de 2 litres rempli d'eau aux 2/3 de son volume.

Le ballon chauffé produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact du réfrigérant. Le condensât est recueilli 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, séparée du sulfate de sodium par filtration sur de la laine de verre, est conservée à 6°C dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement en vue de son analyse.

### 2.2.2. Rendement de l'extraction

On définit le rendement en HE de différentes manières. Dans ce travail nous avons considéré celui du rapport entre le volume de l'huile récupérée ( $V_{\text{HE}}$ ) et la masse de la matière végétale sèche ( $M_v$ ).

Le rendement en HE exprimé en pourcentage est donné par la relation suivante:

$$\text{Rdt}\% = \frac{V_{\text{HE}}}{100 \text{ grammes de la matière végétale}}$$

Avec:

Rdt%: Rendement en HE.

$V_{\text{HE}}$  : Volume de l'HE obtenue (ml)

Cette relation est actuellement la plus utilisée du fait de sa simplicité.

## 2.3. Extraction des composés phénoliques

L'objectif de cette extraction est de libérer les polyphénols présents dans les feuilles et tiges des plantes. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'extraction solide-liquide par Soxhlet.



### 2.3.1. Mode opératoire

Les plantes séchées sont finement broyées en poudre, on introduit dans une cartouche en cellulose 20g de poudre de chaque plante, puis le solvant d'extraction (Ethanol absolu) versé dans le ballon à raison de 150 ml, l'extraction solide-liquide par Soxhlet dure 6 heures (Figure 17) et elle répétée jusqu'à obtention d'un solvant incolore.



**Figure 17:** Montage de l'extraction solide-liquide par Soxhlet.

Le solvant récupéré après l'extraction (contenant les polyphénols) est évaporé à sec dans un Rotavapor pendant environ une heure, les ballons secs contenant les extraits de chaque plante sont déposés dans un dessiccateur pour éliminer une éventuelle humidité résiduelle. Enfin, les ballons renfermant les extraits sont pesés.

### 2.3.2. Le taux d'extraction

Le taux d'extraction est donné par l'expression suivante:

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

**P<sub>0</sub>** : Poids du ballon vide (g).

**P<sub>1</sub>** : Poids du ballon après l'évaporation du solvant (g).

**E** : Poids de la poudre de plante (g).



## 2.4. Caractéristiques des HE

La caractérisation d'une essence consiste à :

- ✓ Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur, saveur) ;
- ✓ Déterminer ses indices physico-chimiques (densité et indice de réfraction...) ;
- ✓ Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

### 2.4.1. Propriétés organoleptiques

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles nécessite l'utilisation de nos sens afin d'évaluer l'aspect, l'odeur, la couleur ainsi que la saveur.

### 2.4.2. Indices physique

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

#### 2.4.3. Densité relative à 20°C: Norme NF T 75 – 111

#### 2.4.4. Indice de réfraction à 20°C: Norme NF T 75 -112

## 2.5. Analyse qualitative et semi-quantitative des HE par CPG et CPG/SM

Les HE extraites des trois plantes étudiées ont été soumises à des analyses qualitatives et semi-quantitatives par chromatographie.

### 2.5.1. Analyse qualitative des HE par chromatographie en phase gazeuse seule

L'analyse qualitative par CPG des échantillons d'huiles essentielles a été effectuée au laboratoire d'analyse instrumentale du département de Technologie Alimentaire de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique selon les conditions opératoires suivantes : Appareil du type HP6890 GC-FID. Colonne capillaire HP 5-MS. Longueur 30 m; diamètre interne 0.25 mm. Programmation de la température 60°C en isotherme pendant 8 minutes puis augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 280°C; Mode d'injection split avec un rapport de division de 1/25 ; Température de détection 320°C; Gaz vecteur Azote « N<sub>2</sub> »; Débit du gaz vecteur 0.5 ml/min ; Volume injecté 0.2 µl.

### ❖ Mode d'identification

L'identification des composés se fait par comparaison de leurs indices de rétention (indice de Kovats) à ceux cités par la littérature et à ceux de certains étalons disponibles dans notre laboratoire. Pour le calcul de ces indices, un mélange d'alcanes (C6 - C24) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon.

Les indices de Kovats (IK) sont calculés selon la formule suivante :

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

Avec:

$TR_c$ : temps de rétention du composé étudié (mn).

$TR_z$ : temps de rétention de l'alcane à  $z$  atomes de carbone qui précède le composé étudié (mn).

$TR_{z+n}$  : 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.

#### 2.5.2. Analyse semi-quantitative des HE par CG/SM

Cette analyse a été faite au laboratoire de chromatographie à l'institut de chimie (Université Science et Technique de Houari Boumediene « USTHB ») selon les conditions opératoires suivantes:

##### ➤ Chromatographie phase gazeuse

- Appareil du type **HP6890 N** (HP Agilent technologies) ;
- **Colonne: HP5MS** (5% Polymethylsiloxane) ;
- **Longueur** : 30 mètres ;
- **Diamètre interne**: 0,250 mm ;
- **Epaisseur du film de la phase**: 0,25 µm ;
- **Programmation de la température**: 35° C en isotherme pendant 2 min, puis augmentation de la température à raison de 5° C/min jusqu'à 320° C ;
- **Mode d'injection**: Split à T= 250° C ;
- **Température de détection**: 280° C « interface » ;
- **Pression**: 6,75 psi ;
- **Gaz vecteur**: hélium ;
- **Débit du gaz vecteur**: 1 ml/ min ;
- **Volume injecté**: 0,2 µl.

➤ **Spectrométrie de masse**

- **Mode de détection:** Scan ;
- **Appareil:** MS-5973 N (HP Agilent Technologies) ;
- **Potentiel d'ionisation:** 70EV ;
- **Pression (Source, analyseur):** 6 psi ;

❖ **Mode d'identification**

L'identification se fait en correspondant les spectres de masse des composés enregistrés avec la banque de données spectres de masse (bibliothèques Wiley 7N et NIST 2005) et celle de la littérature des spectres de masse (**Adams, 2007**) et aussi par comparaison de leurs indices de rétention relatif au n-alcane en C8 à C16 (**Hazzit et al., 2009, Adams, 2007, Babushok et al., 2011**). Certaines structures ont été confirmées par les normes disponibles analysées sous les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus.

## 2.6. Dosage des composés phénoliques

### 2.6.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrite en 1965 par **Singleton et Rossi**. Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines plus diverses.

❖ **Principe**

Le **réactif de Folin-Ciocalteu (FCR)** ou **réactif de phénol de Folin** ou **réactif de Folin-Denis**, est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). En milieu basique, le réactif de Folin Ciocalteu oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'échantillon. Les produits de réduction (oxydes métalliques  $W_8O_{23}/Mo_8O_{23}$ ) de couleur bleue, présentent un maximum d'absorption dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de phénols présents dans l'échantillon.

La quantification des phénols totaux a été établie par rapport à une courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ) réalisée avec l'acide gallique (polyphénol). La teneur en phénols totaux a été exprimée en **mg équivalent d'acide gallique / g d'extrait**.

### 2.6.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode au trichlorure d'aluminium (**Lamaison et Carnet, 1990**) a été employée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes des extraits étudiés.

Une courbe d'étalonnage réalisée avec la Quercétine à différentes concentrations a servi à la quantification des flavonoïdes. Les résultats sont exprimés en **mg équivalent Quercétine par g d'extrait**.

### 2.7. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par quatre méthodes parmi celles citées dans la littérature. En général, le pouvoir antioxydant des HE testées est estimé par comparaison avec des antioxydants de synthèse (BHT, Tocopherol, Trolox). Le test a été répété 3fois pour chaque concentration de chaque échantillon étudié.

#### 2.7.1. Activité de piégeage du radical DPPH (2,2-Diphényl-1- picrylhydrazyl)

##### ➤ Principe

Le piégeage des radicaux libres est le principal mécanisme suivant lequel les antioxydants agissent dans les aliments. La capacité de donation des électrons par les HE, est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique en suivant la disparition de la couleur violette d'un solvant polaire comme l'éthanol contenant le radical libre DPPH<sup>\*</sup> (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) à température ambiante.

Dans ce test le piégeage du radical DPPH<sup>\*</sup> est suivi de la diminution de l'absorbance à 517nm qui est due à la réduction du radical par l'antioxydant (AH) contenu dans les échantillons.

La concentration en antioxydant nécessaire pour piéger 50% des radicaux **IC<sub>50</sub>** est souvent utilisée.

##### ➤ Mode opératoire

Le test du DPPH a été réalisé sur un spectrophotomètre UV-visible de type UNICAM HELIOS  $\lambda$  à la longueur d'onde de 517 nm.

La solution de DPPH a été préparée à une concentration de 60  $\mu$ M dans de l'éthanol absolu. Le test du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Cuendet et al. (1997)**, **Burits et Bucar (2000)**, où 25  $\mu$ l de chacune des dilutions des échantillons testés sont mélangés avec 975  $\mu$ l de la solution éthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de

30 mn à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage d'activité (I %) est donné par la formule suivante :

$$I (\%) = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{ech}}) / (A_{\text{blanc}})] \cdot 100$$

Où:

$A_{\text{blanc}}$  : Absorbance du témoin (Solution de DPPH).

$A_{\text{ech}}$  : Absorbance de l'échantillon.

L'étude de la variation de l'activité anti radicalaire en fonction de la concentration des HE permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition ( $IC_{50}$ ). Plus la valeur d' $IC_{50}$  est faible plus la substance active est puissante vis à vis des radicaux libres.

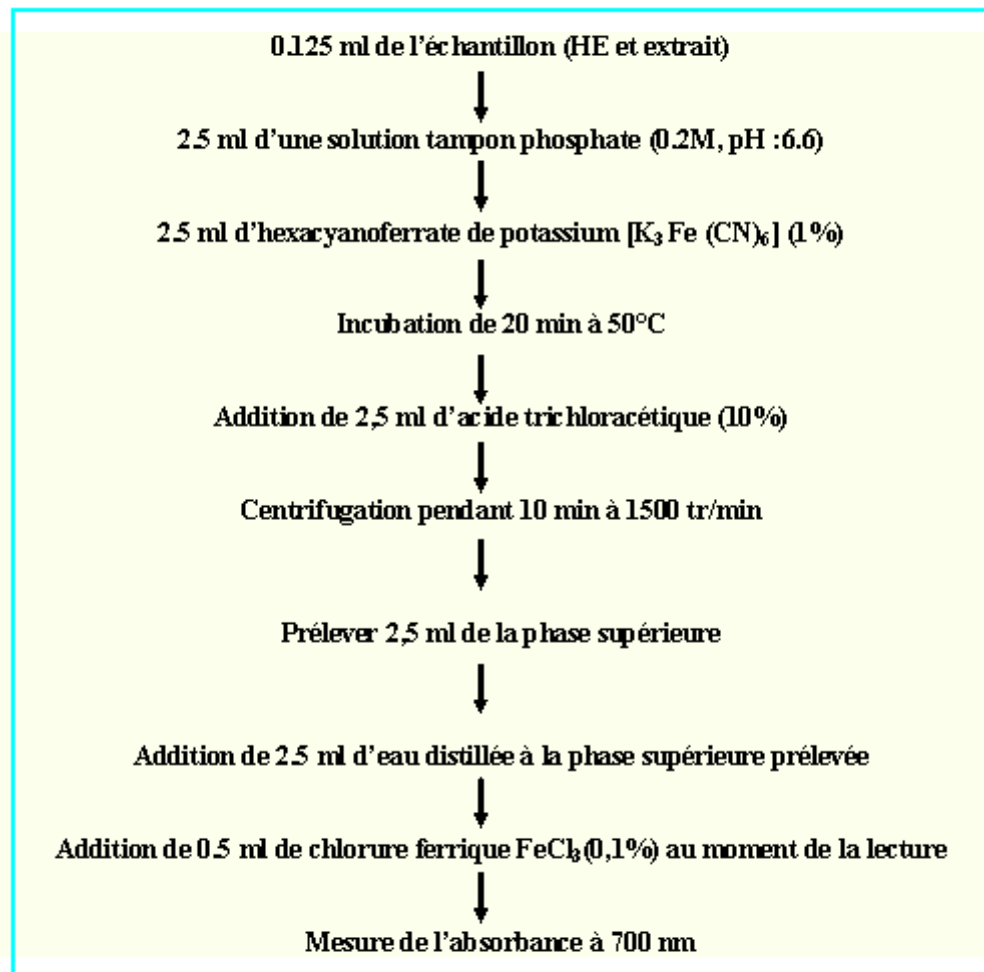
### 2.7.2. Pouvoir réducteur

#### ➤ Principe

L'aptitude des HE à réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure- $Fe^{+3}$  en fer ferreux, est évaluée selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**.

#### ➤ Mode opératoire

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés est obtenue selon le protocole expérimental représenté sur la figure 18:

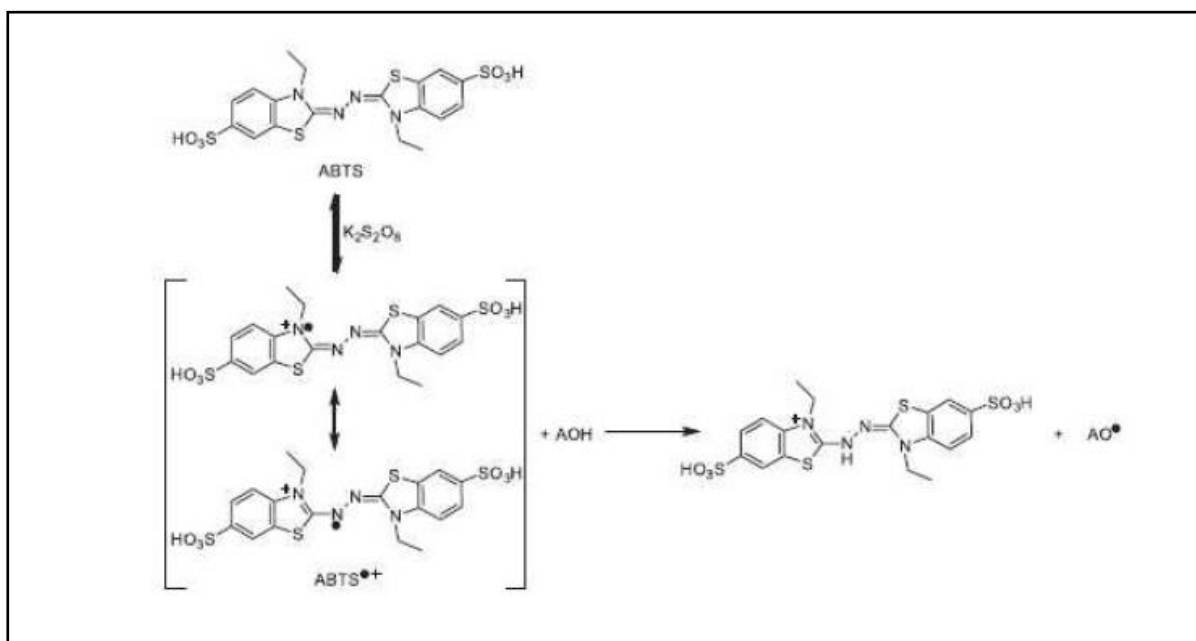


**Figure 18:** Protocole de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.

### 2.7.3. Piégeage du radical-cation ABTS<sup>•+</sup>

#### ➤ Principe

Cette méthode est basée sur la capacité des HE à piéger le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> (Sel d'ammonium de l'acide 2,2'azinobis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonique) (**Figure 19**). En réagissant avec le persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), l'ABTS forme le radical ABTS<sup>•+</sup>, de couleur bleu à vert, l'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. Ce test est réalisé selon la méthode décrite par (**Re et al., 1999**).



**Figure 19 :** Génération du radical-cation  $ABTS^{\bullet+}$  avec le persulfate de potassium et sa réaction avec un antioxydant (AOH) (De Oliveira *et al.*, 2014).

#### ➤ Mode opératoire

Une solution mère d'ABTS est préparée en mélangeant 7 mM d'une solution d'ABTS avec 2.45 mM d'une solution de persulfate de potassium. Le mélange est laissé dans l'obscurité et à température ambiante pendant 12 à 16 h avant utilisation. Cette solution est par la suite diluée avec l'éthanol afin d'avoir une absorbance de  $0.7 \pm 0.02$  à 734 nm. 1ml de la solution d'ABTS est ajouté à 25  $\mu$ l d'échantillon ou le témoin positif (Trolox et BHT), après 7 min on note l'absorbance à 734 nm (Lien *et al.*, 1999).

#### 2.7.4. Test des substances réactives à l'aide de l'acide thiobarbiturique « TBARS »

##### ➤ Principe

L'acide thiobarbiturique réagit avec le malonaldéhyde pour former un composé qui absorbe à 532-535 nm, ce test a été réalisé selon la méthode décrite par (Benchabane *et al.*, 2015, Benchabane *et al.*, 2012), où le jaune d'œuf est utilisé comme substrat riche en lipide. L'acide thiobarbiturique réagit avec les produits de l'oxydation en donnant un pigment qui absorbe à 532 nm. (Figure 20).

La capacité d'inhibition de la peroxydation I en % (pourcentage d'activité anti oxydante) est calculée selon la formule suivante :

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

**A<sub>0</sub>** : absorbance du témoin complètement oxydé (absorbance du témoin négatif).

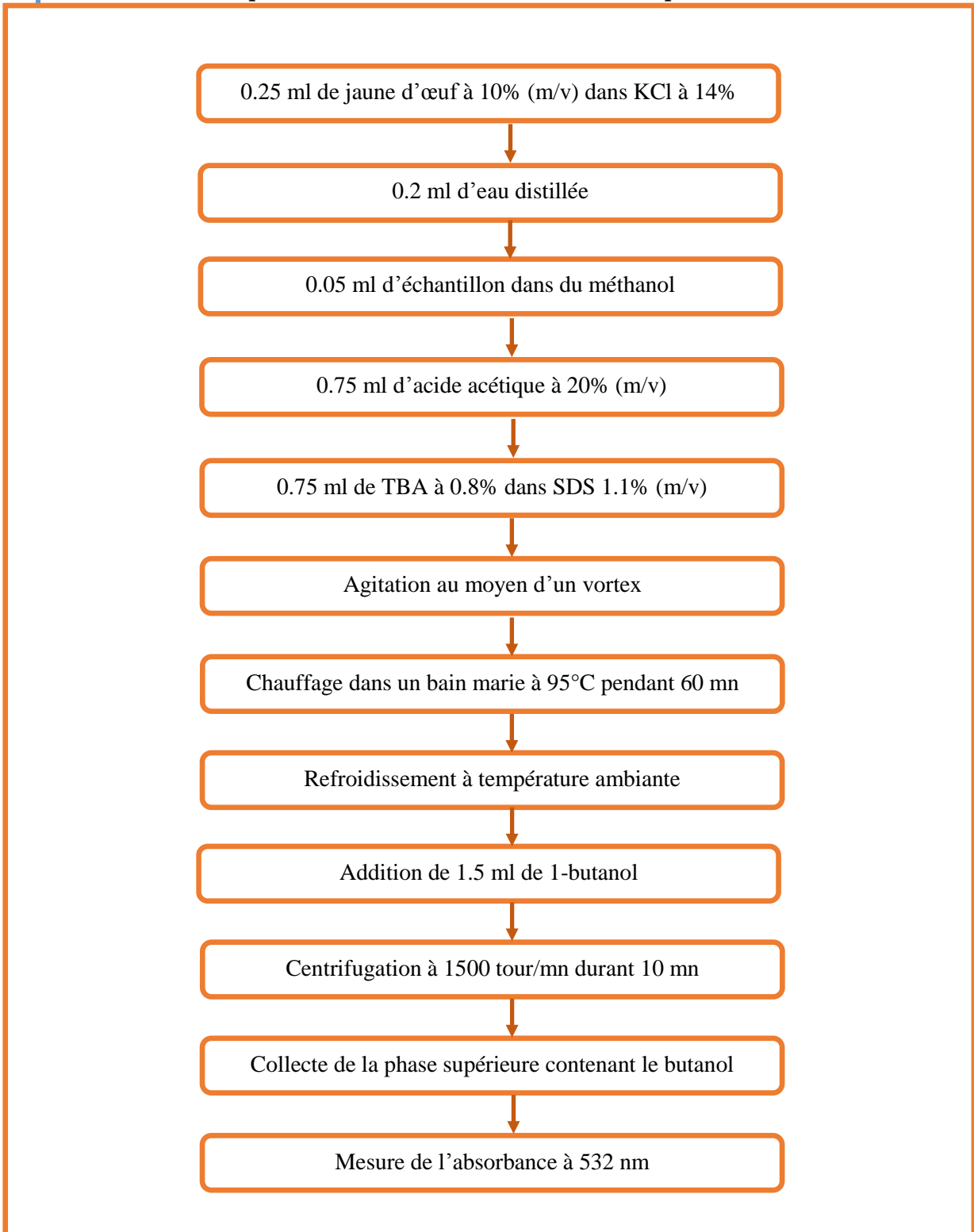
**A<sub>1</sub>** : absorbance de l'échantillon testé.

Le mélange réactionnel relatif au témoin négatif est constitué de tous les réactifs à l'exception de la solution d'HE, tandis que celui des témoins positifs contient les substances choisies comme références de comparaison (BHT et Trolox) à la place de la solution d'HE.

➤ **Mode opératoire**

Les différentes étapes du test de TBARS suivent le schéma opératoire suivant :





**Figure 20:** Protocole de mise en œuvre du test TBARS.

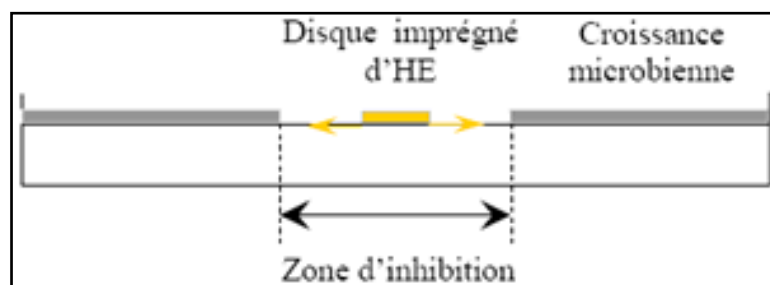
## 2.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne

### 2.8.1. Etude qualitative : détermination de l'effet inhibiteur des HE étudiées

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE testées, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose appelés aromatoigrammes. Les tests ont été réalisés au niveau du CRD-SAIDAL (El Harrach, Alger). Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des ATB «Pharmacopée Européenne, 2002 ». La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée auparavant par plusieurs chercheurs, **Chao et al. (2000)** et **Ozcan et al., (2003)**.

#### ❖ Principe

La méthode des aromatoigrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose (dans notre cas: disque de 6 mm de diamètre) imprégné d'une quantité bien définie d'HE à tester, à 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 autour du disque, appelée: zone d'inhibition (Figure 21).



**Figure 21:** Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatoigrammes.

#### ❖ Protocole expérimental

##### a. Préparation de la première couche de milieu

On fait fondre les milieux Mueller-Hinton et Sabouraud dans un bain marie à 95°C, après on verse aseptiquement une première couche des deux milieux dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte, on laisse refroidir et solidifier sur paillasse.

##### b. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et de 48h pour les levures, on réalise des suspensions troubles en prélevant 3 à 4 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. On réalise une première

lecture de la concentration de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre en estimant la transmittance qui doit être comprise entre 22 et 32% pour les bactéries et entre 2 et 3% pour les levures et cela à une longueur d'onde de 620 nm.

Les valeurs comprises dans les intervalles cités ci-dessus correspondent à une concentration optimale de  $10^7$ - $10^8$  germes/ml. Si une des valeurs trouvées à la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle, on l'ajuste soit en ajoutant de l'eau physiologique (à 9% de NaCl) si elle est inférieure à la valeur minimale, ou en ajoutant des colonies si elle est supérieure à la valeur maximale. A chaque fois une nouvelle lecture de transmittance est réalisée jusqu'à l'ajustement de la suspension aux valeurs désirées. L'inoculum doit être utilisé dans les 15mn suivant sa préparation.

### **c. Préparation de la deuxième couche du milieu**

On fait fondre les deux milieux MH et SAB, on les laisse refroidir jusqu'à une température de 45°C et on transvase 50 ml de chaque milieu dans des flacons stériles. On ensemence les milieux avec 200 µl de chaque suspension et on agite manuellement, puis on dépose rapidement 4 ml de chaque milieu ensemencé 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 paille.

### **d. Dépôt des disques**

À l'aide d'une micropipette, en utilisant des cônes stériles, on prélève 20 à 30 µl d'HE, on dépose chaque quantité prélevée sur le disque posé préalablement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose ensemencée, on laisse diffuser pendant 30 min. Enfin, incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

### **e. Lecture des résultats**

- Zones claires autour du disque : présence d'une activité inhibitrice.
- Absence de zones claires autour du disque : pas d'effet inhibiteur.

## **2.8.2. Etude quantitative : détermination de la CMI & CMB de l'HE de mélisse**

### **A. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

#### **❖ Principe**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la dernière ou la plus basse concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un micro-organisme après 24 h pour les bactéries et 48h pour les levures.

Son but est d'établir le niveau de sensibilité des pathogènes envers les agents anti microbien en l'occurrence les HE dans ce cas.

Cette CMI est déterminée selon la méthode des dilutions sur milieu gélosé : MH pour les bactéries et SAB pour les levures.

### ❖ Protocole expérimental

#### a. Préparation de l'inoculum microbien

A partir d'une culture jeune de 18h pour les bactéries et de 48h pour les levures, on prépare les solutions mères des souches à étudier en lisant l'absorbance à une longueur d'onde de 620 nm, qui doit correspondre à une DO entre 0.2 et 0.3 pour *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Basillus subtilis*, à une DO entre 0.3 et 0.4 pour *Staphylococcus aureus*, et une DO comprise entre 2-3 pour *Candida albicans*.

Préparer une séries de dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ , en prélevant 1 ml de la solution mère auquel on ajoute 9 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution  $10^{-2}$ , procéder de la même façon jusqu'à la dilution  $10^{-4}$ , c'est cette dernière qui sera utilisée pour la détermination de la CMI.

#### b. Préparation des dilutions d'HE de 2% à 0.03%

On prépare une dilution d'HE à 2%, en diluant 1 ml d'HE pure (100%) dans 50 ml de milieu (MH et/ou SAB) liquide additionné de Tween 80 stérile dans le premier flacon.

On réalise des dilutions de  $\frac{1}{2}$  au  $\frac{1}{2}$ , en versant la moitié de la dilution 2% dans le deuxième flacon et compléter avec 25 ml de milieu ce qui donne la dilution 1%.

On procède de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution 0.03%.

Couler chaque dilution dans les boites de petri, laisser solidifier. (Pour les bactéries, chaque boite est divisée en 4 correspondants aux quatre souches bactériennes).

Déposer à la surface de la gélose les disques stériles, ensuite ensemercer au moyen d'une micropipette chaque suspension microbienne à raison de 3 $\mu$ l.

N.B : un témoin positif (+) ne contenant que le milieu (MH et/ou SAB) additionné de Tween 80 plus 3 $\mu$ l l'inoculum doit être prévu pour chaque série de dilution d'HE.

Un témoin négatif (-) ne contenant que le milieu (MH et/ou SAB) additionné de Tween 80 est également prévu.

### c. Incubation

Les boîtes de petriensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

### d. Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait à l'œil nu, en indiquant la plus faible concentration inhibitrice des substances actives, se traduisant par l'absence de toute croissance bactérienne visible.

La figure 22 illustre le protocole expérimental utilisé pour la détermination de CMI.

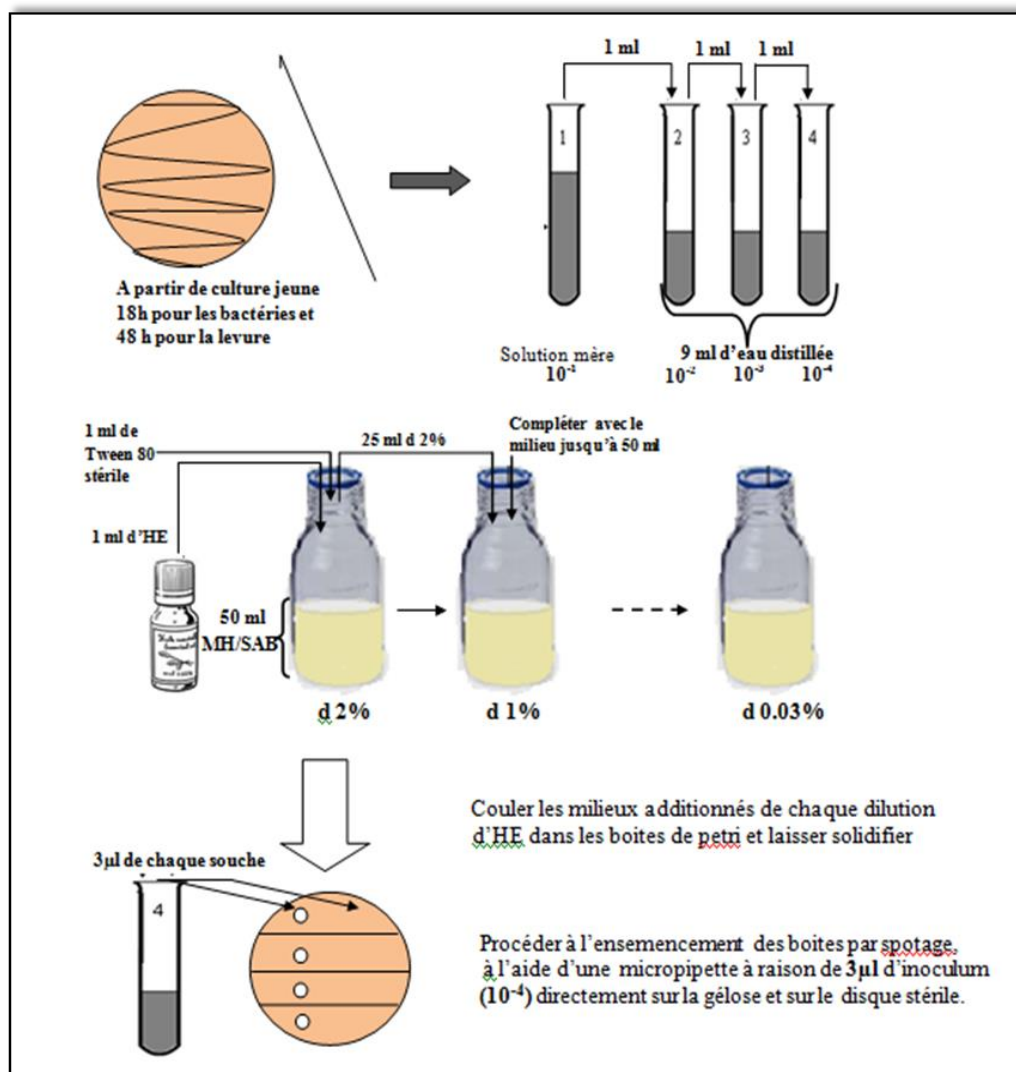


Figure 22: Méthode de détermination de la CMI en milieu solide.

**B. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)****❖ Principe**

Le caractère bactéricide des HE par la détermination de la CMB, correspond à la concentration minimale en HE pour obtenir la destruction de 99,99% de l'inoculum initial (soit moins de 0.01% des survivants) en 24 heures pour les bactéries et 48h pour les levures.

**❖ Protocole expérimentale**

La détermination de la CMB se fait comme suit :

- A partir de la CMI déterminée pour l'HE testée, on prélève les disquesensemencés qu'on va repiquer sur le milieu TSA et/ou SAB en utilisant la même gamme de concentration utilisée pour l'évaluation de la CMI. (on dépose 2 disques par boîte).
- Incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.
- La lecture des résultats se fait à l'œil nu, indiquée par la plus faible concentration d'HE se traduisant par l'absence de toute croissance bactérienne visible.

**N.B** : la CMB  $\leq$  la CMI.

Pour chaque expérience, 3 répétitions ont été réalisées.

**2.9. Evaluation de l'activité insecticide****2.9.1. Estimation de la toxicité des HE par contact****❖ Choix des concentrations et du solvant**

- Les concentrations utilisées ont été fixées sur la base de plusieurs essais préliminaires, pour déterminer une série de doses permettant une toxicité importante dans un temps très court.
- Les doses 8, 16 et 32  $\mu\text{l/ml}$  ont été choisies pour les HE de thym et de mélisse. Les doses 15, 30 et 60  $\mu\text{l/ml}$  ont été retenues pour l'HE du fenouil marin.
- Les solutions d'HE sont préparées en utilisant l'acétone comme solvant, pour ces propriétés d'évaporation rapide, l'absence d'effet résiduel et d'interactions avec les composants d'HE.

**❖ Mode opératoire**

- Les solutions d'HE a tester sont préparées en mélangeant 1ml d'acétone aux doses d'HE préalablement retenues.

- Après l'homogénéisation du mélange, on prélève 1 ml de chaque solution qu'on va répartir uniformément sur un disque de papier filtre de 9 cm de diamètre, placé dans le fond des boîtes de pétri en verre (9cm de diamètre).
- On laisse sécher pendant 10 min à la température ambiante pour une évaporation totale du solvant.
- Les témoins sont traités uniquement avec 01 ml d'acétone.
- Les boîtes de pétri sont ensuite infestées par 20 individus adultes âgés de 24h et de sexe hétérogène, puis recouvertes à l'aide d'une moustiquaire fine et déposées dans une étuve obscure réglée à une température de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $75 \pm 1\%$ .
- Le comptage des individus morts est noté toute les 6h. Pour chaque concentration, les tests ont été répétés 3 fois.

### 2.9.2. Estimation de la toxicité des HE par inhalation

- Dans ce test la dose est fixée à **8  $\mu\text{l}$**  pour les HE de thym et de mélisse et à **15  $\mu\text{l}$**  pour l'HE de fenouil marin, mais le temps est variable.
- Le test est réalisé dans des pots cylindriques en plastique d'un volume de  $69.50 \text{ cm}^3$ , dont les atmosphères sont saturées par les HE étudiées, grâce à l'imprégnation par ces même HE de cotons tiges d'un (1) cm de long collés sur les couvercles des pots. Les tests ont été répétés 3 fois, les témoins sont réalisés sans aucun traitement (les cotons tiges non imbibés par HE).
- Afin de saturer l'ambiance interne, on garde les pots cylindriques contenant les cotons tiges d'HE, fermés pendant 10mn, ensuite on ouvre rapidement pour mettre 20 insectes adultes âgés de 24h et de sexe hétérogènes. Les pots sont déposés dans une étuve obscure réglée à une température de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $75 \pm 1\%$ .
- On a choisi quatre temps de lecture 24h, 48h, 72h et 96h pour l'HE de *C.maritimum*, 6h, 12h, 18h et 24h pour l'HE de *M.officinalis*, 3h, 6h, 9h, 12h et 15h pour les échantillons de thym. Le comptage des individus morts est noté pour chaque temps choisi ainsi que pour les témoins.

### 2.9.3. Expression des résultats

Une mortalité naturelle et inévitable vient s'ajouter à la mortalité issue de l'intoxication due aux HE. Pour cela **Abbott (1925)** attribut une formule de correction des pourcentages de mortalités comme suit :

$$M_c \% = [M_o - M_e / 100 - M_e] * 100$$

Où : **M<sub>o</sub>** : mortalité enregistrée dans les lots traités (%)

**M<sub>e</sub>** : mortalité enregistrée chez le témoin (%)

**M<sub>c</sub>** : mortalité corrigée (%)

La DL<sub>50</sub> et le TL<sub>50</sub>, sont définis comme la dose et le temps létal de 50 % de la population expérimentale, qui sont déterminés par la méthode des log-Probit (**Finney, 1971**).

Ces différentes concentrations et temps sont obtenus à la suite de la résolution de l'équation

$$Y = ax + b$$

Y étant le taux de mortalité exprimé en valeur probit dont la fonction correspondante est

**Y = f [log (dose et/ou temps)].**

### 2.10. Analyse statistique

L'estimation de l'activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des HE étudiées ont fait l'objet d'une étude statistique par l'analyse de la variance à un facteur (ANOVA 1) et l'analyse par le test de *Tuckey*, avec un niveau de signification de 5%, au moyen du logiciel statistique **SPSS 18.0**.

Tous les graphes et les histogrammes obtenus ont été réalisés en utilisant le logiciel **Excel** (Microsoft Office 2007).



## Chapitre II : Résultats et Discussion

### 1. Rendement d'extraction en HE des plantes étudiées

L'extraction des HE de Fenouil marin, de mélisse et des échantillons de thym témoin et irradiés ; a fourni les rendements reportés dans le tableau 13 et exprimés en ml pour 100 grammes de matière sèche.

**Tableau 13:** Rendement en HE des espèces étudiées (ml/100 g. matière végétale).

Espèces	Rendement (%)
<i>Crithmum maritimum</i>	0.45
<i>Melissa officinalis</i>	0.77
<i>Thymus pallescens</i> <0 kGy>	1.70
<i>Thymus pallescens</i> <5 kGy>	1.70
<i>Thymus pallescens</i> <10 kGy>	1.75
<i>Thymus pallescens</i> <20 kGy>	1.80
<i>Thymus pallescens</i> <30 kGy>	1.80

#### ❖ HE de *Crithmum maritimum* L.

Le rendement de notre échantillon (**0.45%**) est supérieur à ceux rapportés par **Senatore et al., (2000)** ; où l'étude portant sur deux échantillons de *Crithmum maritimum* provenant de deux régions de Turquie : Antalya et Mersin , enregistre un rendement de 0.17% et 0.19% respectivement pour ces deux régions.

Selon **Baser et al., (2000)**, l'hydrodistillation des parties aériennes de *Crithmum maritimum* collectées dans la région de Bolu Abant en Turquie, a donné un rendement en HE de 0.85%.

L'étude menée par **Ruberto et al., (2000)**, sur un échantillon de *Crithmum maritimum* L. originaire de Sicile en Italie rapporte un rendement en HE de 0.18%.

D'autre part, le travail mené par **Houta et al., 2015**, sur l'espèce *Crithmum maritimum* cultivée dans les zones aride de Tunisie montre que le rendement en HE varie de 0.28% à 3.60% suivant les différentes parties de la plante (Tige, fleur, feuille et graine). Le rendement le plus important est celui obtenu à partir des graines de fenouil marin (3.60%).

❖ HE de *Melissa officinalis* L.

Le rendement en HE de notre échantillon de Mélisse est de **0.77 %** ; les études menées sur la même espèce issues de régions différentes sont consignées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 14:** Rendements d'extraction en HE de mélisse selon la provenance.

Espèce	Rdt	Régions	Référence de l'étude
Rdt en HE de <i>Melissa officinalis</i> L.	0.40 %	Maroc	<b>Jalal et al., 2015</b>
	0.34 %	Alger	<b>Abdellatif et al., 2014</b>
	0.44 %	Varsovie (Pologne)	<b>Seidler- Lozykowska et al., 2013</b>
	0.30 %	Allemagne	<b>Argyropoulos et Müller, 2011</b>
	0.97 %	Brésil	<b>Carvalho de Soussa et al., 2004</b>

D'après le tableau ci-dessus nous pouvons constater que les rendements d'extraction varient considérablement de 0.30 % à 0.97 % suivant les différentes régions d'Algérie et autres pays.

On remarque que l'échantillon de *Melissa officinalis* étudié provenant de la région de Sétif, possède un rendement beaucoup plus élevé (**0.77%**) par rapport à d'autres échantillons de *Melissa officinalis* originaire d'Algérie (0.34% pour l'échantillon d'Alger). Cette différence peut être attribuée aux conditions édaphoclimatiques.

Selon **Wichti et Anton, 2003**, le rendement, la composition et la qualité de l'HE de mélisse dépendent fortement du site de production, des conditions climatiques, de la période de récolte et du stade ontogénétique.

Le rendement en HE de mélisse obtenu par deux méthodes d'extraction : par entraînement à la vapeur d'eau et distillation par solvant organique est respectivement de 0.42% et 0.56% (**Abdellatif et Hassani, 2015**). La méthode d'extraction pourrait elle aussi influencer sur les rendements d'extraction.

### ❖ HE de *Thymus pallescens* de Noé

Il est important de noter que l'utilisation des feuilles dans ce travail est un choix stratégique. En effet, dans une étude précédente (**Hazzit et Baaliouamer, 2009**), il a été démontré que les huiles issues séparément des feuilles et des inflorescences sont qualitativement identiques mais présentent des différences significatives sur le plan quantitatif pour certains composés et pour le rendement en huile.

La non-homogénéité des échantillons due à l'instabilité des quantités dans les feuilles et les fleurs peut conduire à des différences dans les rendements, la composition et les activités biologiques des huiles qui pourraient être interprétées à tort comme dues à l'irradiation, le choix d'un seul organe (feuilles seulement) a pour but d'éliminer l'influence de la non-homogénéité des échantillons.

Le pourcentage de rendements en huile volatile des échantillons non irradiés et irradiés sont rapportés dans le tableau 13, ils varient de 1,7 à 1,8%, on peut donc déduire que les doses d'irradiation n'ont pas influé significativement sur le rendement d'extraction.

Les résultats des rendements obtenus par l'hydrodistillation des parties aériennes de *Thymus pallescens* de Noé originaire de Tablat (Médeä) est de l'ordre de 4,2%, c'est un rendement très élevé que celui des autres espèces. Mais, cette teneur est moins élevée par rapport à celle citée pour la même espèce provenant de Oued Rhiou qui équivaut à 6.2% (**Hazzit, 2008**). En effet, **Hazzit (2008)** a démontré que *T. pallescens* et *T. numidicus* semblent être parmi les espèces de thym les plus riches en HE. Tandis que dans d'autres régions d'Algérie, un rendement relativement moyen en HE (3,3 %) a été enregistré à partir des échantillons de *Thymus pallescens* récoltés à Kadiria (Bouira). Toutefois la teneur en HE obtenue au cours du mois de juin (avoisine 3,2 %) pour *Thymus pallescens* de Sidi Aissa (Djebel Kef Ennaga) est plus élevée que celle rapporté pour la même plante dans la région de Bousâada (M'sila), de El Asnam (Bouira) qui est respectivement de 2,8 et 2,7 % (**Hazzit, 2008**).

**Hazzit et Baalioumer (2009)**, qui ont travaillé sur l'espèce *Thymus pallescens* de Noé provenant de plusieurs régions d'Algérie notent des rendements qui varient entre 4.2% et 4.6% pendant la période de floraison, ce qui est nettement inférieur aux résultats de nos échantillons, cette différence peut être attribuée à l'origine géographique de la plante et à la période de récolte.

## 2. Taux d'extraction des composés phénoliques

L'extrait éthanolique récupéré après évaporations à sec et sous pression réduite a été pesé pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les composés phénoliques et les flavonoïdes. Le rendement est exprimé en g/100g de matière végétale sèche, il est représenté dans le tableau 15.

**Tableau 15:** Rendement en extrait végétal des plantes étudiées (g/100 g. matière végétale).

Plantes	Rendement (%)
<i>Crithmum maritimum</i>	18.40
<i>Melissa officinalis</i>	12.15
<i>Thymus pallescens</i> <0 Kgy>	22.80
<i>Thymus pallescens</i> <5 Kgy>	18.23
<i>Thymus pallescens</i> <10 Kgy>	20.78
<i>Thymus pallescens</i> <20 Kgy>	16.91
<i>Thymus pallescens</i> <30 Kgy>	21.33

### ❖ Extrait de *Crithmum maritimum* L.

Le rendement en extrait de notre échantillon est supérieur à celui obtenu par **Generalic Mekinić et al., 2016**, où ils notent des rendements de 0.7 et 8.1 mg/g de matière sèche obtenue respectivement à partir de tiges et de feuilles de *Crithmum maritimum* L. collectées dans le centre de Dalmatia en Croatie.

Selon **Nabet (2017)**, le rendement en extrait sec obtenu à partir d'un échantillon de *Crithmum maritimum* L. originaire de la région de Bejaia (Algérie) est de 25%.

Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux cités dans la littérature à cause de la grande variabilité des facteurs extrinsèques comme le solvant d'extraction employé ou la méthode d'extraction.

**❖ Extrait de *Melissa officinalis* L.**

Le rendement d'extraction obtenu à partir de notre échantillon originaire de Sétif est très inférieur à ceux rapportés par les études de **Dastmalchi et al., 2007** (Iran) et **Penhev, 2010** (Bulgarie) qui mentionnent respectivement des rendements de 30.87 et 20g/ 100 g de matière sèche.

D'après **Penhev, 2010**, le solvant d'extraction influence significativement le rendement d'extraction où ils notent un rendement de 20% avec l'éthanol, de 7% avec l'hexane et enfin de 2.5% avec l'acétone. On constate que l'éthanol est le solvant qui permet d'obtenir le rendement le plus important, ce qui est en accord avec nos résultats.

La variabilité du rendement d'extraction peut être expliqué par plusieurs facteurs extrinsèques notamment les conditions édapho-climatiques, mais aussi l'influence du solvant utilisé pour l'extraction.

**❖ Extrait de *Thymus pallescens* de Noé**

D'après **Fatemi et al., (2014)**, le rendement en extrait hydro-alcoolique de la menthe poivrée qui a subi des doses d'irradiation  $\gamma$  de 10 et 25 kGy comparé avec l'échantillon témoin non irradié avoisine les 8% pour tous les extraits testés indépendamment de l'irradiation, cette valeur est très inférieure aux rendements de nos échantillons de *Thymus pallescens* de Noé où les rendements varient de 16.91 à 22.80%.

### 3. Caractéristiques physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques des huiles essentielles des espèces étudiées sont reportés dans le tableau 16.

**Tableau 16:** Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques des HE de *Crithmum maritimum*, *Melissa officinalis* et des échantillons *Thymus pallescens*

Caractéristiques des HE	Aspect	Densité relative à 20°C	Indice de réfraction à 20°C
<i>Crithmum maritimum</i> L.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liquide mobile limpide ;</li> <li>• Incolore à jaune claire ;</li> <li>• Odeur iodée, anisée de fenouil, légèrement citronnée.</li> </ul>	0,850	1,488
<i>Melissa officinalis</i> L.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liquide mobile;</li> <li>• Couleur jaune pale à orangé ;</li> <li>• Odeur caractéristique, parfum frais, citronné et herbacé.</li> </ul>	0,859	1,460
<i>Thymus pallescens</i> de Noé	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liquide mobile</li> <li>• Couleur orange</li> <li>• Odeur caractéristique, aromatiques, phénoliques, agréables avec un fond légèrement épicé</li> </ul>	0.897 à 0.909	1.488 à 1.508

#### 4. Analyse qualitative et semi-quantitative des HE étudiées

L'étude de la composition des sept (7) échantillons d'HE étudiés a été conduite à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse, les conditions opératoires sont détaillées dans le chapitre matériels et méthodes.

L'identification des composés des HE étudiées par CG/SM a été essentiellement basée sur la comparaison des spectres de masse de la molécule inconnue à celui d'un composé pur fourni par la base des données informatiques.

##### 4.1. L'analyse qualitative et semi-quantitative de l'HE du fenouil marin

L'analyse par CPG seule et CG/SM de l'HE du fenouil marin provenant des environs de Hammamet et Ain Benian nous a permis d'identifier **51** composés représentant 99,1% de la composition totale.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 17 et le chromatogramme sont représentés dans les figures 23, 24, 25, 26 et 27.

**Tableau 17:** Composition chimique de l'HE de *Crithmum maritimum* L.

N°	<sup>1</sup> Composés	<sup>2</sup> IR	%	<sup>3</sup> identification
1	Heptanal	902	t	IR-SM
2	$\alpha$ -Thujene	928	0.8	IR-SM
3	$\alpha$ -Pinene	937	<b>3.9</b>	IR-SM-Et
4	Camphene	951	0.1	IR-SM-Et
5	Sabinene	973	<b>6.4</b>	IR-SM-Et
6	$\beta$ -Pinene	978	0.4	IR-SM-Et
7	$\beta$ -Myrcene	989	1.3	IR-SM-Et
8	$\alpha$ -Phellandrene	1004	0.2	IR-SM-Et
9	$\delta$ -3-Carene	1012	0.1	IR-SM-Et
10	$\alpha$ -Terpinene	1017	0.9	IR-SM-Et
11	p-Cymene	1025	<b>10.2</b>	IR-SM-Et
12	$\beta$ -Phellandrene	1030	3.2	IR-SM
13	cis- $\beta$ -Ocimene	1038	1.6	IR-SM
14	trans- $\beta$ -Ocimene	1048	0.1	IR-SM
15	$\gamma$ -Terpinene	1060	<b>39.6</b>	IR-SM-Et
16	cis-Sabinene hydrate	1067	0.1	IR-SM
17	Terpinolene	1087	0.2	IR-SM-Et
18	2-Nonanone	1093	t	IR-SM
19	trans-Sabinene hydrate	1098	0.1	IR-SM
20	Linalool	1099	0.1	IR-SM-Et
21	Nonanal	1103	t	IR-SM
22	1,3,8-p-Menthatriene	1112	t	IR-SM

23	cis-p-Menth-2-en-1-ol	1123	t	IR-SM
24	Allo-ocimene	1130	t	IR-SM
25	cis-p-Menth-2-en-1-ol	1123	t	IR-SM
26	Terpine-4-ol	1177	0.9	IR-SM-Et
27	p-Cymen-8-ol	1184	t	IR-SM
28	$\alpha$ -Terpineol	1190	0.1	IR-SM-Et
29	Thymol methyl ether	1234	<b>26.9</b>	IR-SM
30	Carvacrol methyl ether	1243	0.1	IR-SM
31	(E)-2-Decenal	1264	t	IR-SM
32	Bornyl acetate	1284	0.1	IR-SM-Et
33	Thymol	1290	0.1	IR-SM-Et
34	Carvacrol	1301	0.1	IR-SM-Et
35	$\beta$ -Caryophyllene	1420	t	IR-SM
36	trans- $\alpha$ -Bergamotene	1435	0.1	IR-SM
37	trans- $\beta$ -Farnesene	1456	t	IR-SM
38	Germacrene D	1481	t	IR-SM
39	Ar-Curcumene	1482	0.1	IR-SM
40	Bicyclogermacrene	1494	t	IR-SM
41	$\alpha$ -Zingiberene	1495	0.2	IR-SM
42	$\beta$ -Bisabolene	1509	0.2	IR-SM
43	$\beta$ -Sesquiphellandrene	1524	0.4	IR-SM
44	$\gamma$ -Bisabolene, (E)-	1533	t	IR-SM
45	Germacrene B	1551	t	IR-SM
46	Elemicin	1554	t	IR-SM
47	Nerolidol (E)	1561	t	IR-SM-Et
48	Spathulenol	1576	0.1	IR-SM
49	Dill apiole	1622	0.4	IR-SM
5	Isospathuleol	1634	t	IR-SM
51	$\beta$ -Eudesmol	1650	t	IR-SM
<b>Total (%)</b>		<b>99.1</b>		
Monoterpènes		69.0		
Monoterpènes oxygénés		28.6		
Sesquiterpènes		1.0		
Sesquiterpènes oxygénés		0.5		

<sup>1</sup> Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; <sup>2</sup>Indices de rétention relatifs aux n-alcane C<sub>7</sub>-C<sub>23</sub> ; <sup>3</sup>identification : **SM** : comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; **Et** : comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; **IR** : comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisée; **t** : trace (<0,1 %).



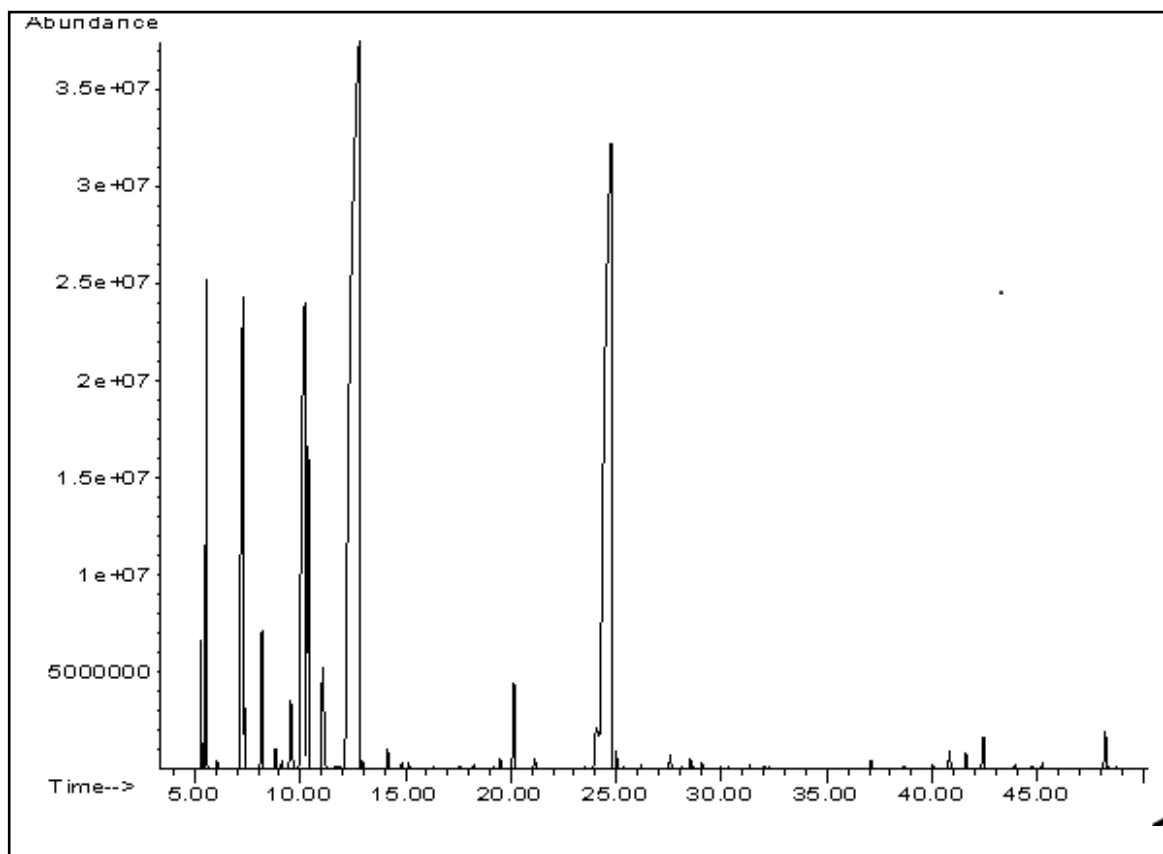


Figure 23 : Chromatogramme CG-SM de l'HE de *Crithmum maritimum* L.

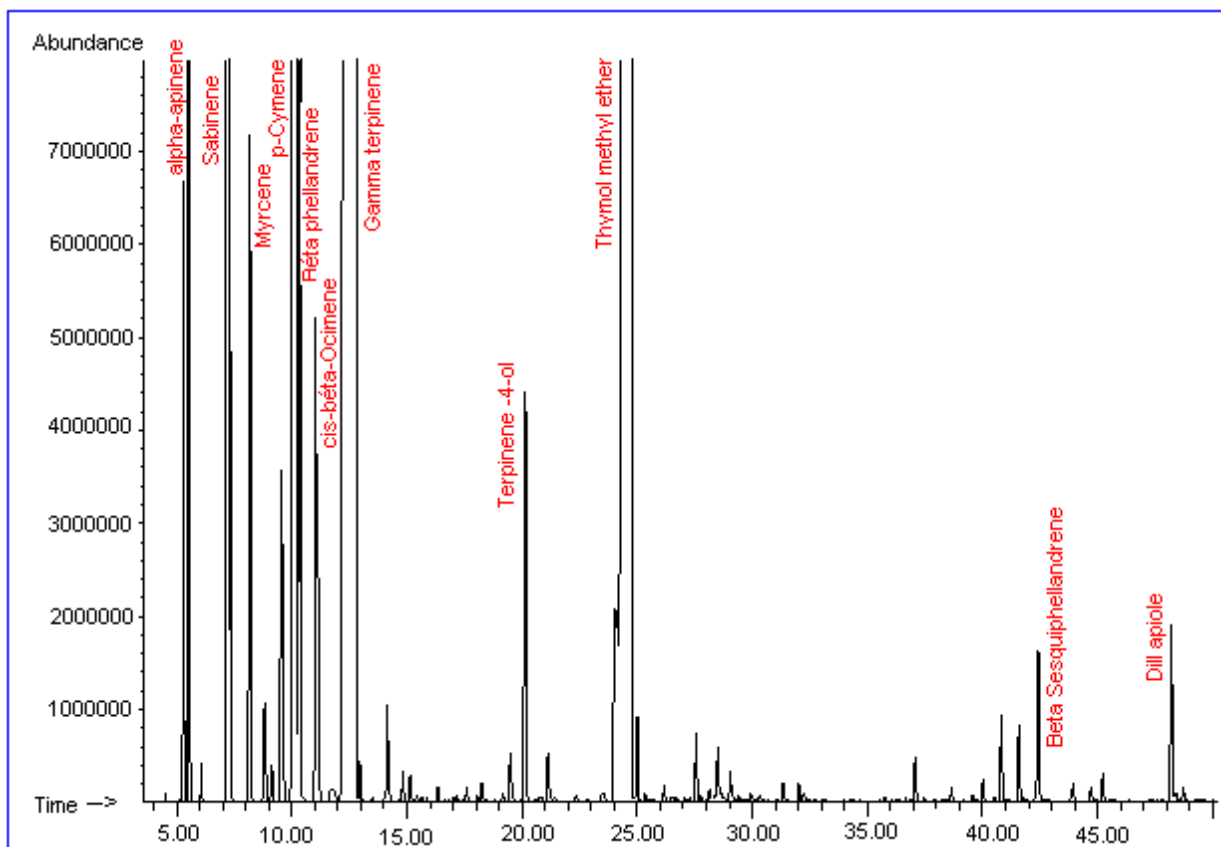


Figure 24 : Chromatogramme CG-SM agrandi de l'HE de *Crithmum maritimum* L.

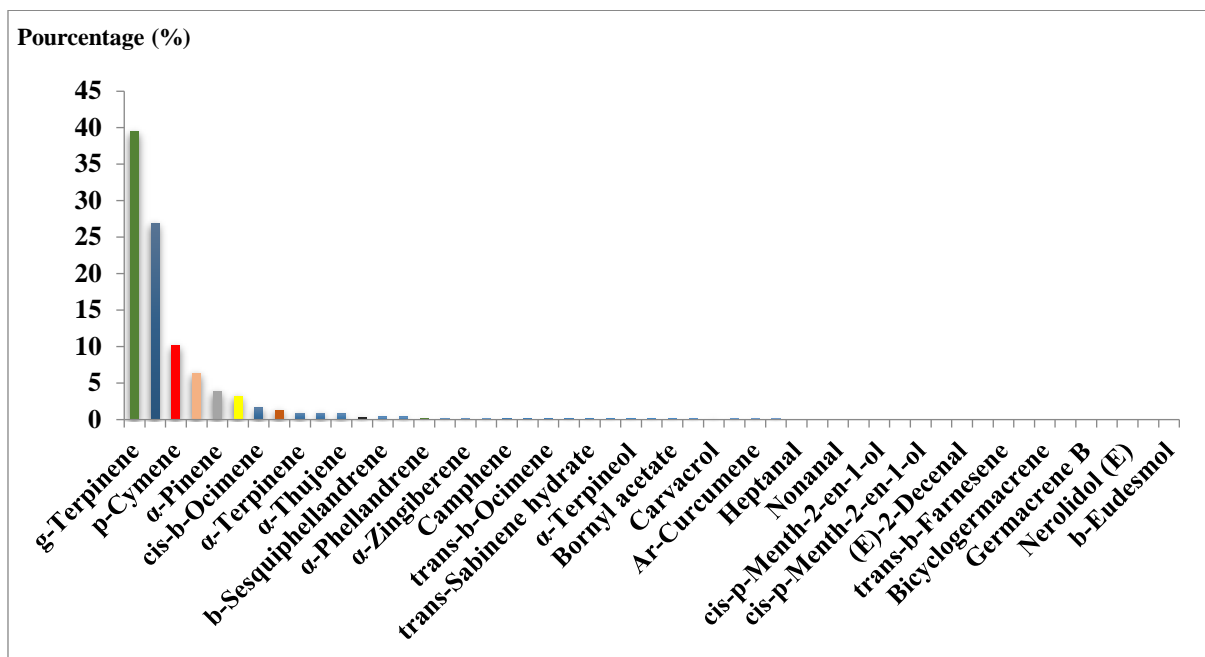


Figure 25: Histogramme des différents constituants de l'HE de *C. maritimum* L.

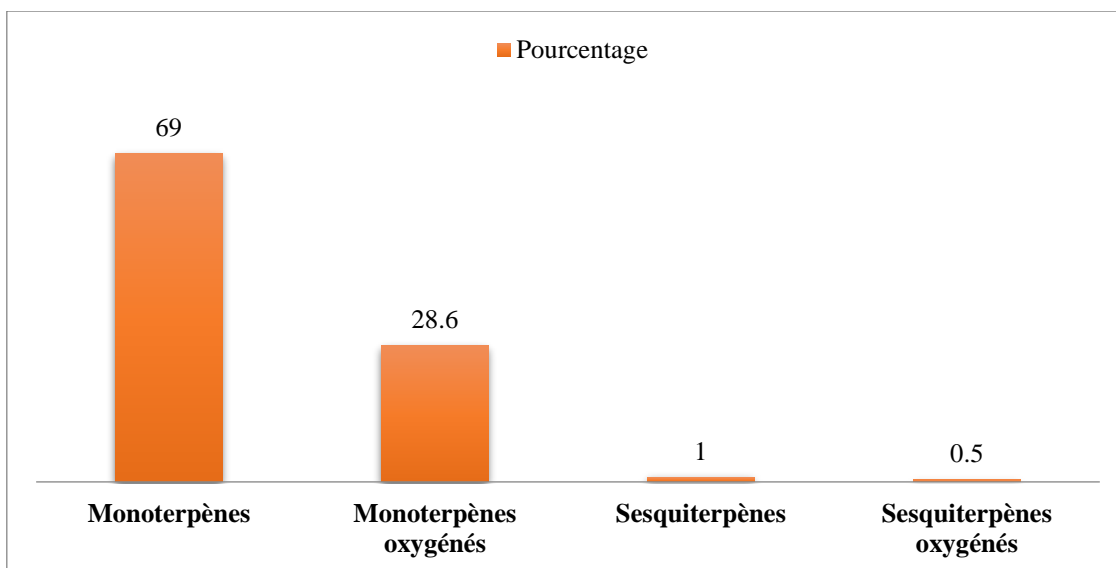
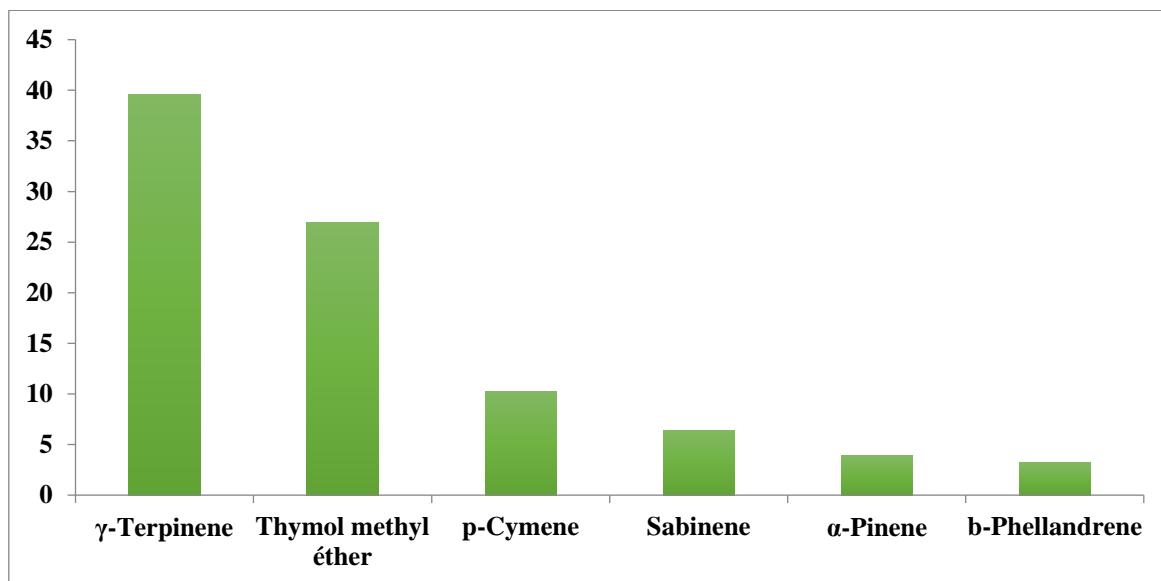


Figure 26: Histogramme des différentes classes chimiques de l'HE de *C. maritimum* L.



**Figure 27:** Histogramme des constituants majoritaires de l'HE de *C. maritimum* L.

D'après nos résultats, nous constatons que le composé principal est un monoterpène  $\gamma$ -Terpinene qui a une teneur de **39,6 %**, suivi du **Thymol méthyl éther (26,9%)**, **p-Cymene (10,2%)** et **Sabinene (6.4%)**.

Les travaux de **Houta et al., 2015** ont révélé la présence de 11 composés pour les quatre échantillons d'HE extraites à partir des différentes parties de la plante. Le composé majoritaire identifié dans les HE extraites à partir des tiges, des fleurs et des graines est le  $\gamma$ -Terpinene dont la teneur est respectivement de **32.78%**, **43.29%** et **39.74%**. Ce qui concorde avec nos résultats.

L'étude réalisée par **Tsoukatou et al., (2001)**, qui a porté sur six échantillons d'HE de *Crithmum maritimum* provenant de diverses zones géographiques le long de la Méditerranée, sont composés essentiellement de : **Dillapiole**,  **$\gamma$ -Terpinene**, **Sabinene**, **Limonene** et  **$\beta$  phellandrene**. Les conclusions de leurs travaux montrent que les échantillons issus des zones ouest sont riches en **Dillapiole** tandis que ceux provenant des régions sud sont riches en **Thymol méthyl éther** et  **$\gamma$ -Terpinene**.

#### 4.2. L'analyse qualitative et semi-quantitative de l'HE de Mélisse

L'analyse par CPG seule et CG/SM de l'HE de Mélisse provenant de la région de Sétif nous a permis d'identifier **64** composés représentant **90.3%** de la composition totale de l'huile, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 18 et les figures 28, 29, 30, 31 et 32.

Tableau 18: Composition chimique de l'HE de *Melissa officinalis* L.

N°	Composés	IR	%	identification
1	(E)-2-Hexenal	854	t	IR-SM
2	2,5-Diethyltetrahydrofuran	884	t	IR-SM
3	Tricyclene	924	t	IR-SM
4	$\alpha$ -Thujene	928	0.1	IR-SM
5	$\alpha$ -Pinene	937	1.0	IR-SM-Et
6	Camphene	951	0.2	IR-SM-Et
7	Sabinene	973	0.5	IR-SM-Et
8	$\beta$ -Pinene	978	1.3	IR-SM-Et
9	1-Octen-3-ol	980	t	IR-SM
10	3-Octanone	986	t	IR-SM
11	$\beta$ -Myrcene	989	0.7	IR-SM-Et
12	3-Octanol	993	0.1	IR-SM
13	$\delta$ -3-Carene	1012	0.1	IR-SM-Et
14	$\alpha$ -Terpinene	1017	0.3	IR-SM-Et
15	p-Cymene	1025	1.2	IR-SM-Et
16	<b>Limonene</b>	1029	<b>6.4</b>	IR-SM-Et
17	1,8-Cineole	1032	0.1	IR-SM-Et
18	cis- $\beta$ -Ocimene	1038	0.2	IR-SM
19	trans- $\beta$ -Ocimene	1048	0.1	IR-SM
20	$\gamma$ -Terpinene	1060	0.7	IR-SM-Et
21	cis-Sabinene hydrate	1067	0.3	IR-SM
22	Terpinolene	1087	0.2	IR-SM-Et
23	p-Cymenene	1089	t	IR-SM
24	trans-Sabinene hydrate	1098	0.1	IR-SM
25	Linalool	1099	1.6	IR-SM-Et
26	cis-Thujone	1102	t	IR-SM
27	3-Octanyl acetate	1111	0.1	IR-SM
28	Isomenthone	1162	2.2	IR-SM
29	trans-Isopulegone	1176	0.5	IR-SM
30	Terpine-4-ol	1177	1.0	IR-SM-Et
31	p-Cymen-8-ol	1184	0.1	IR-SM
32	$\alpha$ -Terpineol	1190	0.3	IR-SM-Et
33	<b>Pulegone</b>	1237	<b>14.0</b>	IR-SM-Et
34	<b>Piperitone</b>	1252	<b>5.3</b>	IR-SM
35	Linanyl acetate	1255	1.3	IR-SM-Et
36	Piperitenone	1343	0.4	IR-SM
37	Bornyl acetate	1285	0.5	IR-SM-Et
38	Thymol	1290	0.7	IR-SM-Et
39	Carvacrol	1301	1.6	IR-SM-Et
40	Piperitenone	1343	0.8	IR-SM
41	$\alpha$ -Cubebene	1351	0.1	IR-SM
42	<b>Piperitenone oxide</b>	1366	<b>32.0</b>	IR-SM
43	$\beta$ -Bourbonene	1384	0.1	IR-SM
44	Methyl eugenol	1402	t	IR-SM
45	$\beta$ -Caryophyllene	1420	2.4	IR-SM
46	Aromadendrene	1439	t	IR-SM

47	$\alpha$ -Humulene	1453	0.3	IR-SM
48	Alloaromadendrene	1461	0.1	IR-SM
49	Geranyl acetone	1465	0.1	IR-SM
50	Germacrene D	1481	1.3	IR-SM
51	(E)- $\beta$ -Ionone	1485	t	IR-SM
52	Bicyclogermacrene	1494	0.5	IR-SM
53	$\gamma$ -Cadinene	1513	0.1	IR-SM
54	$\delta$ -Cadinene	1524	0.2	IR-SM
55	Spathulenol	1576	t	IR-SM
56	<b>Cyclohexanecarboxylic acid, 1-methyl-2-oxo ethyl ester*</b>	1579	<b>7.1</b>	<b>SM</b>
57	Caryophyllene oxide	1581	1.2	IR-SM
58	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5a-ol	1640	0.1	IR-SM
59	Isospathulenol	1637	0.2	IR-SM
60	t-Muurolol	1645	0.1	IR-SM
61	ar-Tumerone	1664	0.2	IR-SM
62	Benzyl benzoate	1762	t	IR-SM
63	Hexahydrofarnesyl acetone	1845	t	IR-SM
64	Palmitic acid	1968	0.2	IR-SM
	<b>Total (%)</b>		<b>90.3</b>	
	Monoterpènes		12.9	
	Monoterpènes oxygénés		62.9	
	Sesquiterpènes		5.1	
	Sesquiterpènes oxygénés		1.8	
	Autres		12.7	

<sup>1</sup> Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne non polaire HP5MS ; <sup>2</sup>Indices de rétention relatifs aux n-alcanes C<sub>7</sub>-C<sub>23</sub> ; <sup>3</sup>identification : **SM** : comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; **Et** : comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; **IR** : comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisée.

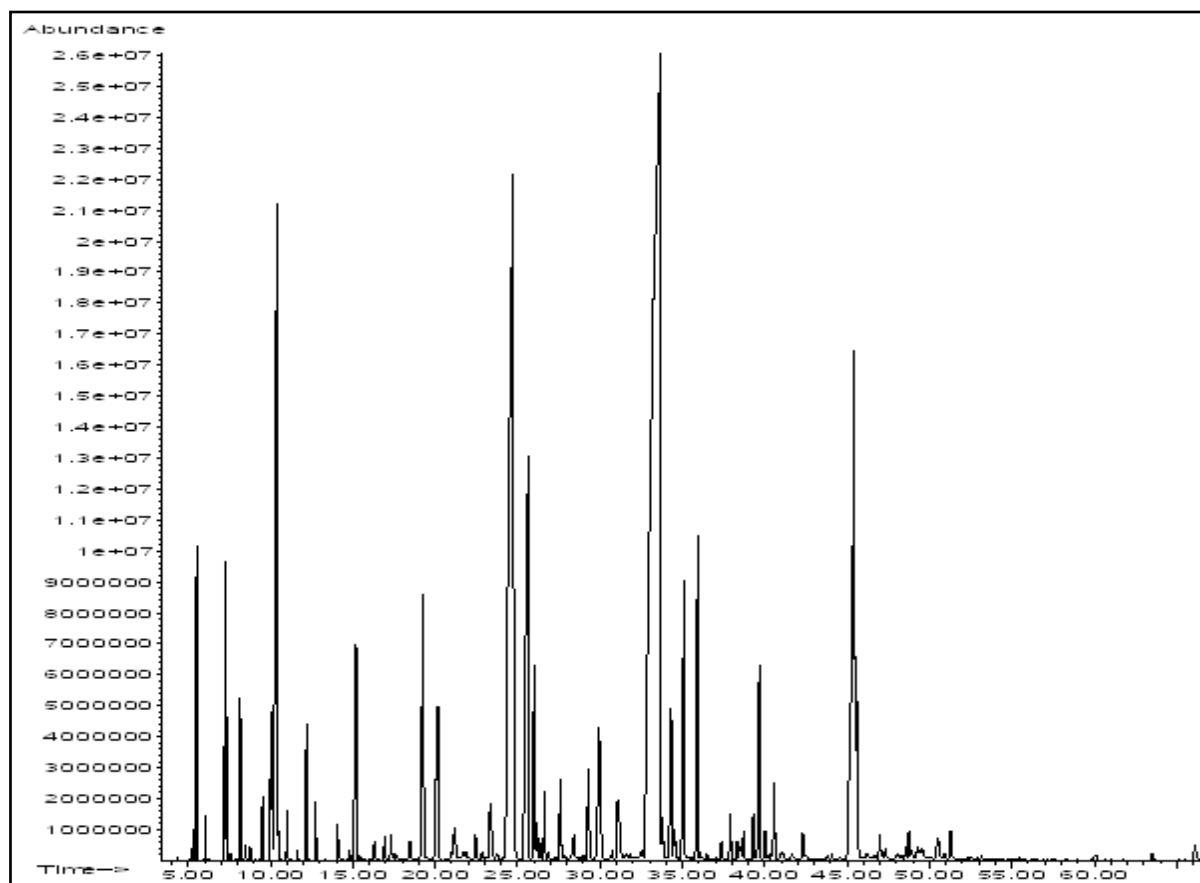


Figure 28: Chromatogramme CG-SM de l'HE de *Melissa officinalis* L.

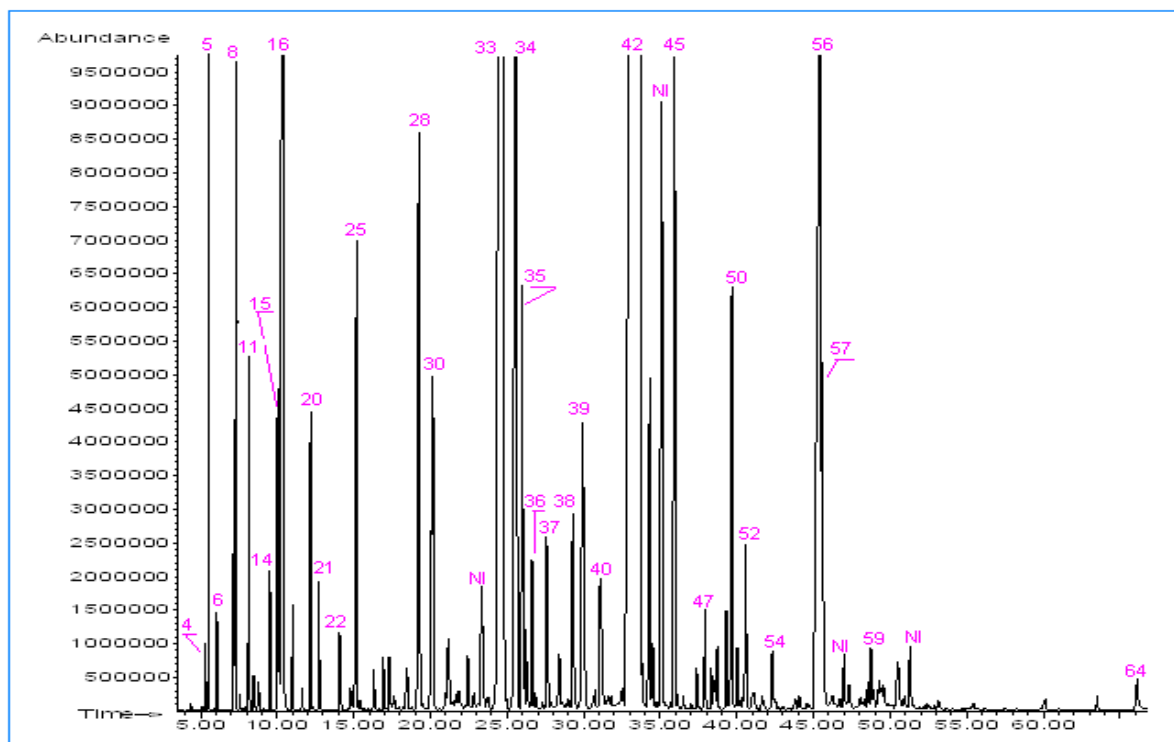


Figure 29: Chromatogramme CG-SM agrandi de l'HE de *Melissa officinalis* L.

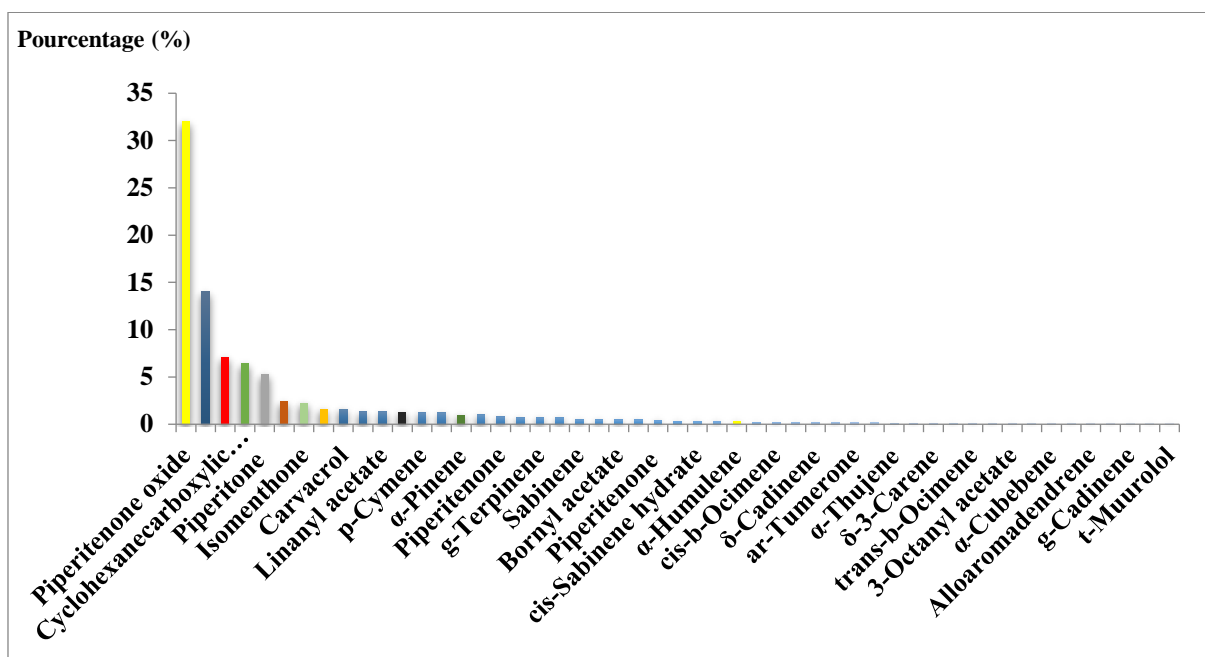


Figure 30: Histogramme des différents constituants de l'HE de *Melissa officinalis* L.

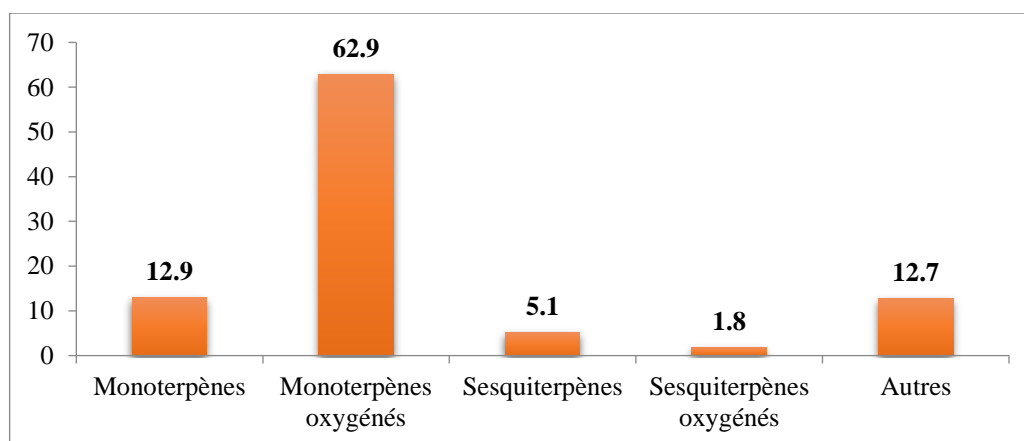
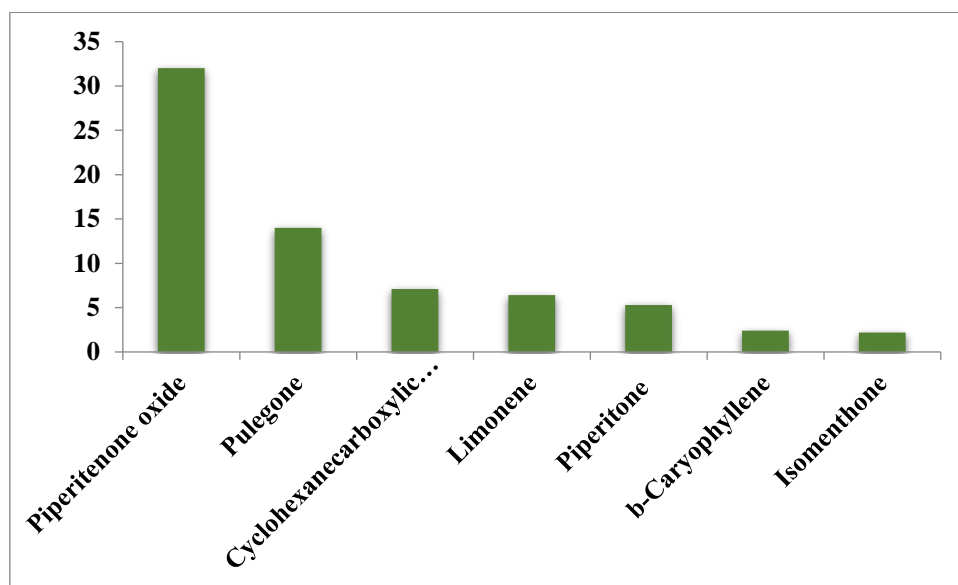


Figure 31 : Histogramme des différentes classes chimiques de l'HE de *M. officinalis* L.



**Figure 32:** Histogramme des constituants majoritaires de l'HE de *M. officinalis* L.

D'après les résultats obtenus, on observe que l'HE est riche en les **monoterpènes oxygénés (62.9%)** ce qui caractérisent les HE des espèces appartenant aux familles des Lamiacées, Apiacées et Astéracées.

Du point de vue composition on retrouve parmi les composés majoritaires : **Piperitenone oxide (32%), Pulegone (14%),** Cyclohexanecarboxylic acid, 1-methyl-2-oxo ethyl ester (7.1%), Limonène (6.4%), Piperitone (5.3%).

Une comparaison des teneurs en constituants majoritaires des HE de *Melissa officinalis* L. et provenant de diverses régions est reportée dans le tableau 19.



**Tableau 19** : Comparaison des teneurs en constituants majoritaire de l'HE de mélisse selon la provenance.

Espèce	Composés majoritaires	Région	Référence de l'étude
<i>Melissa officinalis</i> L.	- <b>Citrals 39.9%</b> - <b>Citronellal 13.7%</b> - $\beta$ -Caryophyllene 4.6% - Géraniol 3.4% - Germacrène D 2.4% - Limonène 2.2% - Caryophyllene oxide 1.7%	<b>Vojvodina (Serbie)</b>	<b>Mimica-Dukic et al., 2004</b>
	- <b>Géranial 47.32%</b> - <b>Néral 39.28%</b>	<b>Brésil</b>	<b>Carvalho de Sousse et al., 2004</b>
	- <b>Neral 43.8%</b> - <b><math>\beta</math>-Caryophyllene 13.5%</b> - Thymol 7.9% - Géraniol 5.3% - Géranial 5.2%	<b>Uremia (Iran)</b>	<b>Meftahizade et al., 2010</b>
	- <b>Geranial 44.2%</b> - <b>Neral 30.2%</b> - Citronellal 6.3% - $\alpha$ -copaene 1.8% - $\beta$ -Caryophyllene 1.3% - Caryophyllene oxide 1.3%	<b>Alger</b>	<b>Abdellatif et al., 2014</b>
	- <b>Citronellal 14.4 %</b> - <b>Caryophyllene oxide 11%</b> - <b>Géranial acétate 10.20 %</b> - Caryophyllene 8.10 % - Isogéranol 6.4 % - Nérol acétate 5.1 %	<b>Maroc</b>	<b>Jalal et al., 2015</b>
	- <b>Citronellal 18.45%</b> - <b>Géranial 15.22%</b> - Geranyl acétate 7.24% - Géranial 5.88% - $\alpha$ -elemol 5.85% - $\alpha$ -cadinal 3.59% - $\beta$ -Caryophyllene 2.88%	<b>Plovdiv (Bulgarie)</b>	<b>Popova et al., 2016</b>

Il ressort du tableau 19 que la composition de notre échantillon de Mélisse originaire de la région de Sétif présente une large variabilité par rapport aux différentes études menées sur la même espèce en Algérie et à travers le monde.

Cette large différence au sein de la même espèce peut être due à la région géographique, à la période de récolte et aux techniques culturelles utilisées.

### 4.3. L'analyse qualitative et semi-quantitative des échantillons de l'HE du Thym

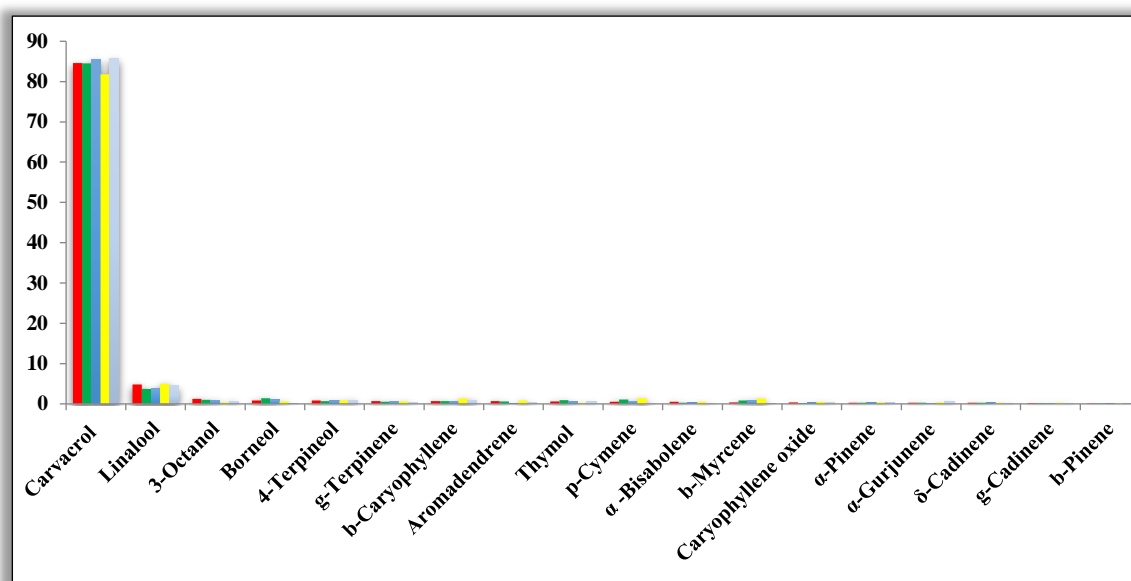
L'analyse par CPG seule et CG/SM des échantillons de thym témoin et irradiés provenant de la région d'El Kadiria wilaya de Bouira nous a permis d'identifier **28** composés représentant **97,9% à 98,9%** de l'ensemble des composés des HE analysées.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 20 et les figures 33 et 34.

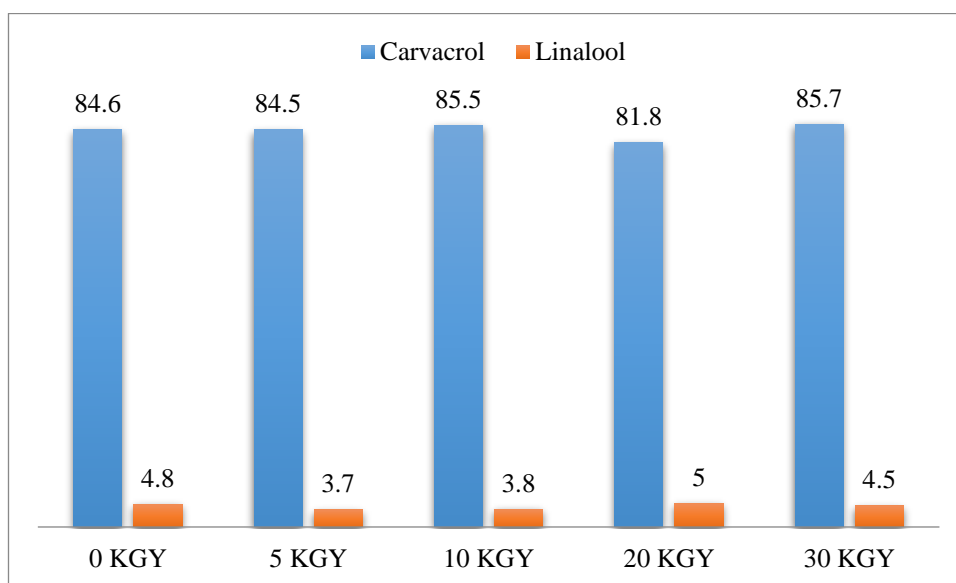
**Tableau 20:** Composition chimique des HE de *Thymus pallescens* de Noé non irradiés et irradiés

N°	Composés	IR	0 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	30 kGy
1	$\alpha$ -Pinene	937	0.3	0.3	0.3	0.4	0.3
2	$\beta$ -Pinene	978	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
3	$\beta$ -Myrcene	990	0.4	0.8	0.9	1.3	0.1
4	3-Octanol	993	1.2	1.0	0.9	0.4	0.7
5	p-Cymene	1025	0.5	1.1	0.7	1.4	0.2
6	$\gamma$ -Terpinene	1059	0.7	0.5	0.6	0.6	0.4
7	1-Nonen-3-ol	1085	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
8	Terpinolene	1087	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
9	Linalool	1099	<b>4.8</b>	<b>3.7</b>	<b>3.8</b>	<b>5.0</b>	<b>4.5</b>
10	Borneol	1157	0.8	1.4	1.0	0.6	0.1
11	4-Terpineol	1177	0.8	0.7	0.8	0.8	0.9
12	$\alpha$ -Terpineol	1190	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1
13	Carvacrol methyl ether	1244	0.1	0.1	0.1	0.1	0.7
14	Thymol	1291	0.6	0.9	0.6	0.3	0.5
15	Carvacrol	1299	<b>84.6</b>	<b>84.5</b>	<b>85.5</b>	<b>81.8</b>	<b>85.7</b>
16	$\alpha$ -Gurjunene	1409	0.3	0.3	0.2	0.4	0.5
17	$\beta$ -Caryophyllene	1418	0.7	0.7	0.6	1.3	0.9
18	Aromadendrene	1439	0.7	0.6	0.1	0.8	0.4
19	$\alpha$ -Humulene	1453	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
20	Alloaromadendrene	1460	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
21	$\gamma$ -Muurolene	1476	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
22	Ledene	1486	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
23	$\alpha$ -Muurolene	1498	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2
24	$\beta$ -Bisabolene	1508	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
25	$\gamma$ -Cadinene	1513	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2
26	$\delta$ -Cadinene	1523	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
27	$\alpha$ -Bisabolene	1550	0.5	0.3	0.3	0.5	0.2
28	Caryophyllene oxide	1573	0.4	0.2	0.3	0.5	0.4
	<b>Total (%)</b>		<b>98.9</b>	<b>98.8</b>	<b>98.7</b>	<b>97.9</b>	<b>98.0</b>
	Monoterpènes		2.1	2.9	2.7	3.9	1.2
	Monoterpènes oxygénés		91.8	91.4	92.2	88.7	92.5
	Sesquiterpènes		3.3	3.2	2.5	4.3	3.1
	Sesquiterpènes oxygénés		0.4	0.2	0.3	0.4	0.4
	Autres		1.3	1.1	1.0	0.5	0.8

<sup>1</sup> Composés classés dans l'ordre d'élution sur la colonne non polaire HP5MS ; <sup>2</sup>Indices de rétention relatifs aux n-alcane C<sub>7</sub>-C<sub>23</sub> ; **IR** : comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique à celle que nous avons utilisée.



**Figure 33:** Histogramme des constituants des différents échantillons de *Thymus pallescens* de Noé.



**Figure 34 :** Histogramme des constituants majoritaires des différents échantillons de *Thymus pallescens* de Noé.

L'analyse chromatographique des échantillons étudiés n'a montré aucun changement qualitatif entre les échantillons témoins et irradiés. Les huiles ont été caractérisées par une teneur élevée en **carvacrol (81,8-85,7%)** suivie de **linalool (3,7-5,0%)**. Ces résultats sont en désaccord avec ceux rapportés dans les travaux [ (**Hazzit et al., 2009**) , (**Benchabane et al.,**

2015), (Hazzit et Baaliouamer, 2009)<sup>a</sup> et (Hazzit et Baaliouamer, 2009)<sup>b</sup>]; où des composants comme le **p-cymène** et le **γ-terpinène** sont les plus abondants avec respectivement des taux de 6.2-17.4 % contre 0,2-1,1% et 6,9-14,2% contre 0,4-0,7%.

L'origine agro-climatique est connue pour influencer sur les tissus contenant l'huile essentielle.

À l'exception de l'échantillon irradié à 20 kGy, l'analyse chromatographique a montré que les composés des échantillons testés ne changeaient pas considérablement après l'irradiation. Selon nos résultats, la plupart des changements ont été enregistrés après irradiation à 20 kGy pour β-myrcène (+0,9%), 3-octanol (-0,8%), p-cymène (+0,9%), carvacrol (-2,8%) et β-caryophyllène (+0,7%). L'augmentation de la teneur en p-cymène jusqu'à 20% a été notée par d'autres auteurs dans la muscade irradiée (10 kGy) (Klaus et Wilhelm, 1990). La diminution de la quantité en carvacrol pour l'échantillon irradié à la dose de 20 kGy ne concorde pas avec les résultats obtenus par Zantar et al., 2015, qui rapportent l'augmentation de ce composé à cette même dose pour *Thymus vulgaris*. Pour tous les autres échantillons, les changements, lorsqu'ils existent, vont de ± 0,2 à ± 0,7% avec une diminution remarquable du linalool pour les échantillons irradiés à 5 et 10 kGy respectivement de 1,0 et 1,1%. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui indiquent que le linalool a montré une grande sensibilité au rayonnement gamma (Antonelli et al., 1998). Le mécanisme par lequel le rayonnement induit des changements dans la composition des HE n'est pas encore bien compris, mais les variations de la teneur des constituants lors de l'irradiation gamma observées dans cette étude pourraient être dues à la sensibilité des composés de cette l'huile aux radiations. Ainsi, la teneur en linalool qui change pour 5 et 10 kGy est devenue stable pour 20 et 30 kGy. Les teneurs en groupes fonctionnels dans les échantillons non irradiés sont équivalentes, sauf pour l'échantillon irradié à 20 kGy qui enregistre un léger déficit en monoterpènes oxygénés (88,7%) compensé par une légère augmentation des hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpéniques notamment en raison de l'augmentation précédemment signalée β-myrcène, p-cymène et β-caryophyllène. Nous pensons que l'irradiation a eu un effet sur les groupements oxygénés et favorisé un mécanisme radicalaire, avec élimination de l'oxygène sous forme de dioxygène O<sub>2</sub> et transformé une infime partie de mono. et de sesquiterpènes en hydrocarbure mono et sesquiterpéniques.

## 5. Dosage des Polyphénols des extraits étudiés

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des parties aériennes des espèces étudiées, un dosage des phénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et insecticides des plantes leur sont attribuées. La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). L'acide gallique a été utilisé comme standard. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (Bahorun *et al.*, 1996) en utilisant comme standard la quercétine.

### 5.1. Les phénols totaux

La valeur moyenne de la concentration en polyphénols totaux des extraits de criste marine, de mélisse et des échantillons de thym est calculée à partir des valeurs des absorbances à une longueur de 765 nm en utilisant la courbe d'étalonnage de l'acide gallique représenté par la figure 35.

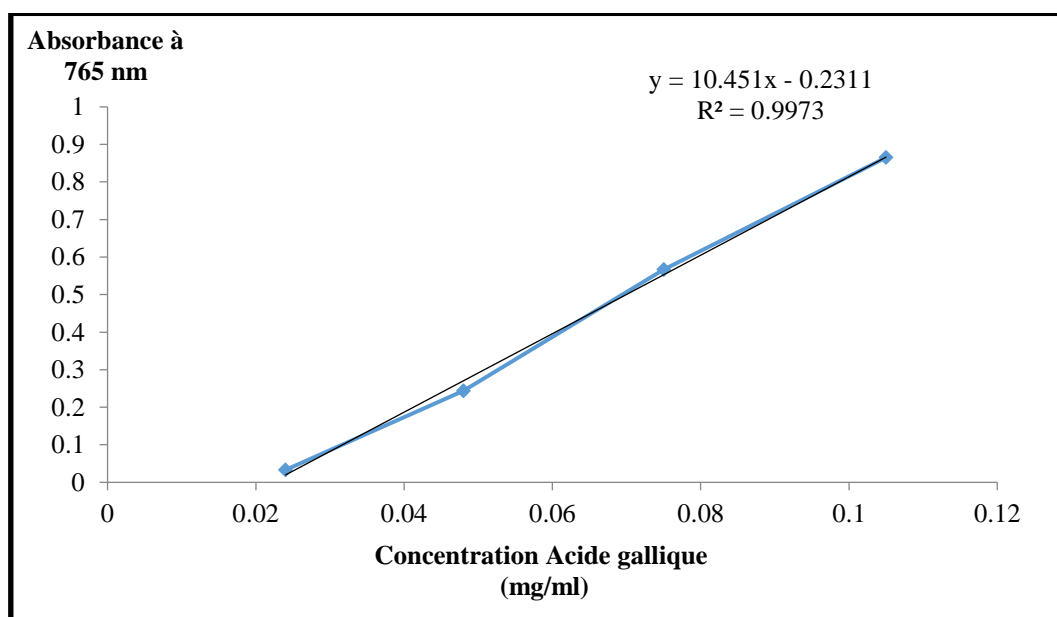


Figure 35: Courbe d'étalonnage des phénols totaux.

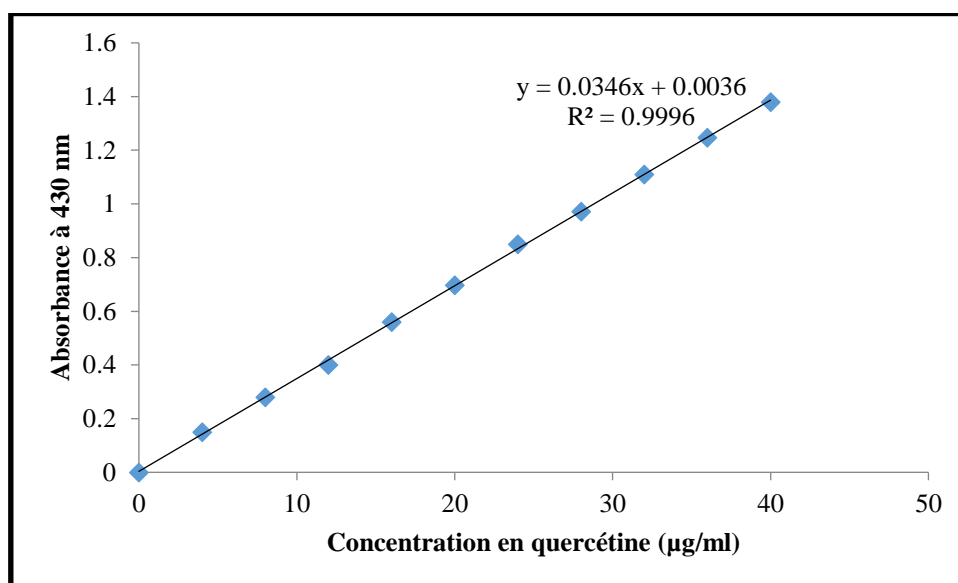
Les résultats de la teneur en phénols totaux des extraits de *Crithmum maritimum* L., de *Melissa officinalis* L. et des échantillons de *Thymus pallescens* de Noé sont regroupés dans le tableau 21.

**Tableau 21** : Teneur en polyphénols totaux des extraits étudiés.

Espèces	Teneur en phénols totaux (mg EAG /g d'extrait sec)
<i>Crithmum maritimum</i> L.	41.06
<i>Melissa officinalis</i> L.	61.20
<i>Thymus pallescens</i> <0 kGy>	45.33
<i>Thymus pallescens</i> <5 kGy>	44.71
<i>Thymus pallescens</i> <10 kGy>	38.64
<i>Thymus pallescens</i> <20 kGy>	38.81
<i>Thymus pallescens</i> <30 kGy>	38.27

## 5.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes a été estimée par une méthode spectrophotométrique en utilisant la courbe d'étalonnage suivante.

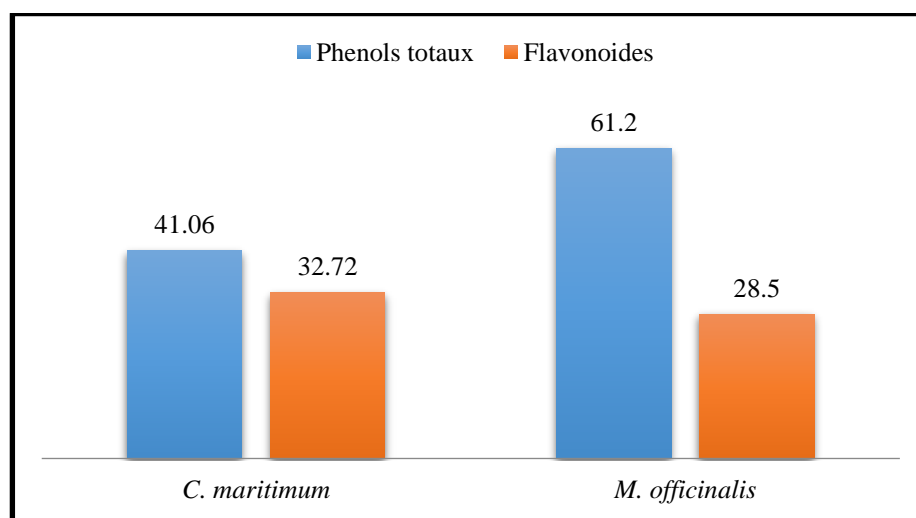
**Figure 36**: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

Les résultats de la teneur en flavonoïdes des extraits de *Crithmum maritimum* L., de *Melissa officinalis* L. et des échantillons de *Thymus pallescens* de Noé sont regroupés dans le tableau 22.

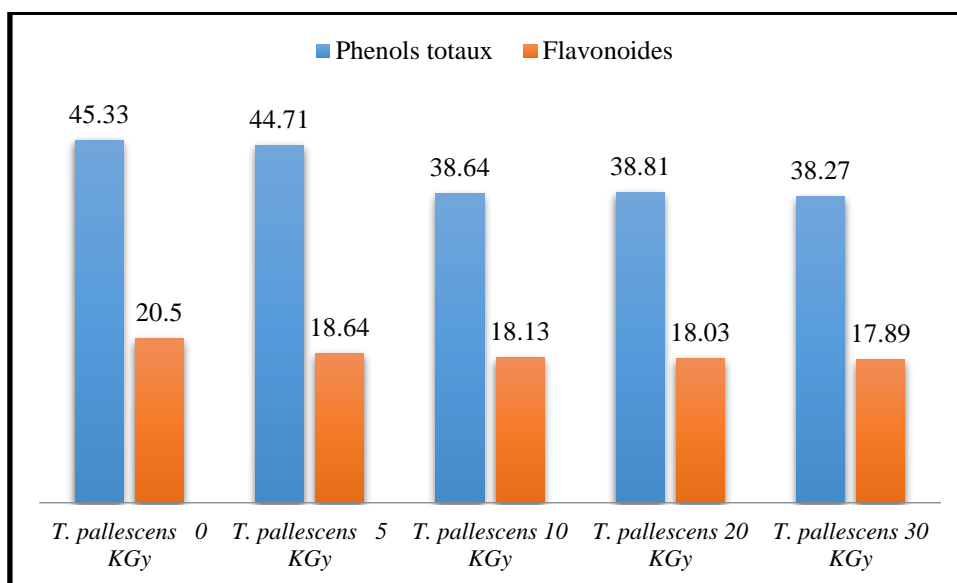
**Tableau 22:** Teneur en flavonoïdes des extraits étudiés.

Espèces	Teneur en flavonoïdes (mg Equivalent Quercétine /g d'extrait sec)
<i>Crithmum maritimum</i> L.	32.72
<i>Melissa officinalis</i> L.	28.50
<i>Thymus pallescens</i> <0 kGy>	20.50
<i>Thymus pallescens</i> <5 kGy>	18.64
<i>Thymus pallescens</i> <10 kGy>	18.13
<i>Thymus pallescens</i> <20 kGy>	18.03
<i>Thymus pallescens</i> <30 kGy>	17.89

Les figures 35 et 36 représentent deux histogrammes qui récapitulent les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits étudiés.



**Figure 37:** Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits de *Crithmum maritimum* L. et *Melissa officinalis* L. (mg équivalent étalon/g d'extrait sec).



**Figure 38:** Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits des échantillons de *Thymus pallescens* de Noé. (mg équivalent étalon/g d'extrait sec).

Concernant la teneur en polyphénols totaux, on a enregistré en équivalent d'acide gallique de 41,06 mg et 61,2 mg /g d'extrait sec respectivement pour les extraits éthanoliques de fenouil marin et de Mélisse. Pour les échantillons de thym on a noté une légère diminution de la teneur en phénols totaux avec l'augmentation de la dose d'irradiation.

La détermination quantitative des flavonoïdes révèle que l'extrait éthanolique de fenouil marin est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 32,72 mg EQ/g d'extrait sec alors qu'une teneur de 28,5 mg EQ/g d'extrait sec est trouvée dans l'extrait éthanolique de la mélisse.

En ce qui concerne les extraits éthanoliques de *Thymus pallescens*, l'échantillon non irradié présente une meilleure teneur en flavonoïdes qui équivaut à 20.5 mg EQ/g d'extrait sec, tandis que les échantillons soumis aux différentes doses d'irradiations montrent un rendement inférieur par rapport à l'échantillon non irradié et ces rendements varient très peu avec les doses d'irradiation.



❖ **Extrait de *Crithmum maritimum* L.**

Le tableau 23 rapporte les teneurs de phénols totaux et flavonoïdes de deux échantillons de fenouil marin

**Tableau 23:** Teneur en composés phénoliques de deux échantillons de *C. maritimum* L.

Espèce	Phénols totaux (mg EAG/g)	Flavonoïdes (mg EQ /g)	Provenance
<i>Crithmum maritimum</i> L.	35.10	ND	Split, Croatie <sup>(1)</sup>
	47.00	ND	Bejaia, Algérie <sup>(2)</sup>

(1): Generalić Mekinić et al., 2016 ; (2) : Nabet, 2017 ; ND : Non déterminé

La teneur en phénol totaux de notre échantillon de *Crithmum maritimum* (41.06 mg EAG/g d'extrait sec) est comprise entre les teneurs rapportées par **Generalić Mekinić et al., 2016** et **Nabet, 2017**. On peut donc conclure que nos résultats sont en accord avec ceux mentionnés dans la littérature.

A fin de comparer la teneur en flavonoïdes de notre échantillon avec celle de la littérature, nos recherches n'ont pas abouti sur des études comparatives.

❖ **Extrait de *Melissa officinalis* L.**

Le tableau 24 regroupe le résultat des teneurs en polyphénols de trois extraits de Mélisse.

**Tableau 24 :** Comparaison des teneurs en phénols totaux de trois extraits de *M.officinalis*

Espèce	Phénols totaux (mg EAG/g)	Solvant d'extraction	Référence de l'étude
<i>Melissa officinalis</i> L.	48.86	Méthanol	<b>Atanassova et al., 2011</b>
	14.19	Eau	<b>Mihaylova et Georgieva, 2013</b>
	43.51	Eau	<b>Popova et al., 2016</b>

On peut constater que notre échantillon a montré une teneur en phénols totaux plus importante par rapport aux teneurs présentées dans tableau 24. Il est aussi important de souligner l'influence du solvant d'extraction. Selon **Hayouni (2007)**, l'utilisation des solvants polaires conduit à une teneur élevée en composés phénoliques.

### ❖ Extrait de *Thymus pallescens* de Noé

**Barros et al., (2010)**, mentionnent dans leur étude portant sur un extrait méthanolique de *Thymus mastichina* une teneur en phénols totaux égale à 165.29 mg/EAG d'extrait sec.

D'après **Delgado et al., 2014**, le contenu en polyphénols de vingt extraits méthanolique de *Thymus mastichina* s'échelonne entre 2.90 à 9.15 mg//EAG d'extrait sec.

En ce qui concerne la comparaison des teneurs en flavonoïdes obtenus avec celles citées par la littérature, nos recherches n'ont pas abouties à des travaux portant sur la même espèce, cependant **Fatemi et al., 2014**, dans leur étude sur des échantillons de menthe poivrée irradiés à 10 et 25 kGy comparé à l'échantillon témoin 0 kGy mentionnent une teneur en flavonoïdes de 23.01 mg EQ / g d'extraits sec qui varie très peu avec les dose d'irradiation.

Les variations des teneurs en composés phénoliques sont souvent considérables d'une espèce à l'autre et à l'intérieur même d'une même espèce, selon les écotypes. En général, la teneur en polyphénols d'un extrait dépend de la méthode d'extraction utilisée, de la nature du solvant ainsi que du matériel végétal utilisé (**Hayouni et al., 2007**).

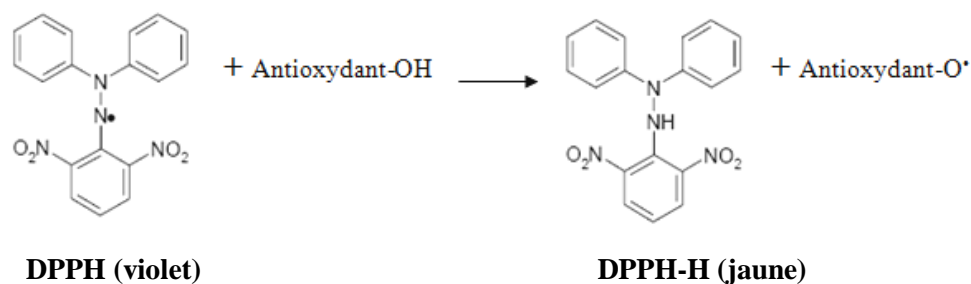
## 6. Activités biologiques

### 6.1. Activité antioxydante des HE étudiées

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par quatre méthodes : le test du DPPH, la mesure du pouvoir réducteur, l'ABTS et le TBARS. A des fins comparatives trois antioxydants de synthèses: le BHT (Butyl Hydroxy Toluène), le TROLOX et le tocophérol sont pris comme références.

#### 6.1.1. Résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH par des HE de *Crithmum maritimum* L. et de *Melissa officinalis* L.

L'activité antioxydante des différents échantillons de *Crithmum maritimum* et de *Melissa officinalis* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm (**Figure 39**).



**Figure 39:** Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH par les HE de *Crithmum maritimum* et de *Melissa officinalis* ainsi que ceux du BHT et du tocophérol sont donnés dans le tableau 25.

**Tableau 25:** Activité de piégeage du radical DPPH par les HE étudiées, le BHT et du tocophérol.

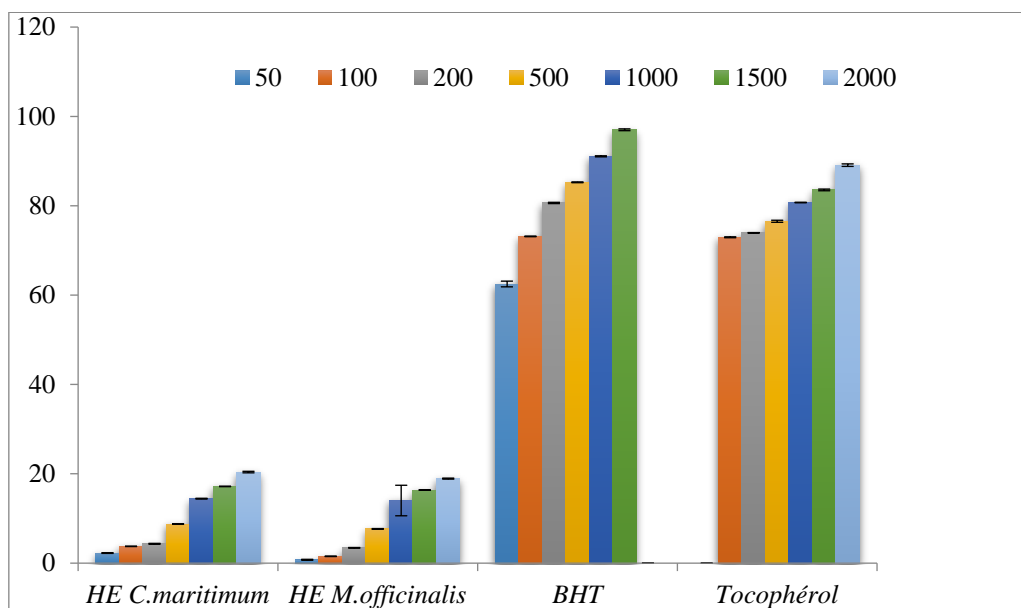
Concentration en mg/l	Activité de piégeage du radical DPPH <sup>a</sup> en %			
	HE de Fenouil marin	HE de Mélisse	Tocophérol	BHT
50	2.26 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.11 <sup>a</sup>	ND	62.49 ± 0.64 <sup>a</sup>
100	3.76 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.05 <sup>b</sup>	72.95 ± 0.10 <sup>a</sup>	73.15 ± 0.07 <sup>b</sup>
200	4.33 ± 0.10 <sup>c</sup>	3.44 ± 0.06 <sup>c</sup>	73.95 ± 0.05 <sup>b</sup>	80.63 ± 0.14 <sup>c</sup>
500	8.75 ± 0.06 <sup>d</sup>	7.66 ± 0.09 <sup>d</sup>	76.53 ± 0.23 <sup>c</sup>	85.25 ± 0.09 <sup>d</sup>
1000	14.44 ± 0.08 <sup>e</sup>	14.02 ± 3.42 <sup>e</sup>	80.73 ± 0.06 <sup>d</sup>	91.07 ± 0.12 <sup>ef</sup>
1500	17.18 ± 1.06 <sup>f</sup>	16.37 ± 0.06 <sup>f</sup>	83.55 ± 0.19 <sup>e</sup>	97.01 ± 0.20 <sup>ef</sup>
2000	20.39 ± 0.17 <sup>g</sup>	18.93 ± 0.11 <sup>g</sup>	89.09 ± 0.28 <sup>f</sup>	ND

<sup>a</sup> Les résultats sont moyennes ± écart type de trois mesures.

ND : Non déterminé

- Le tableau ci-dessus montre que les HE du fenouil marin et de la mélisse présentent un pouvoir de piégeage du radical DPPH nettement inférieur à celui du BHT et du tocophérol quelque soit la concentration utilisée.
- Malgré une concentration maximale de 2000 mg/l l'activité de piégeage du radical DPPH ne dépasse pas 20.39% et 18.93% respectivement pour l'HE de *Crithmum maritimum* et de *Melissa officinalis*, par conséquent il nous a été impossible de déterminer les concentrations inhibitrices de 50% des radicaux.

La figure 40 récapitule le pouvoir de piégeage du radical DPPH par les HE de *Crithmum maritimum* et de *Melissa officinalis*, le BHT et du tocophérol.



**Figure 40:** Résultats du piégeage du radical DPPH par le BHT, le tocophérol et les HE testées.

### 6.1.2. Résultats du test du pouvoir réducteur des HE de *Crithmum maritimum* L. et de *Melissa officinalis* L.

Le pouvoir réducteur mesure l'aptitude des HE de *Crithmum maritimum* et de *Melissa officinalis*, à réduire le fer  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{+2}$ .

Le BHT a été pris comme antioxydant de référence.

Les résultats du pouvoir réducteur des HE étudiées et du BHT exprimés par l'absorbance à 700 nm, sont résumés dans le tableau 26 et la figure 41:

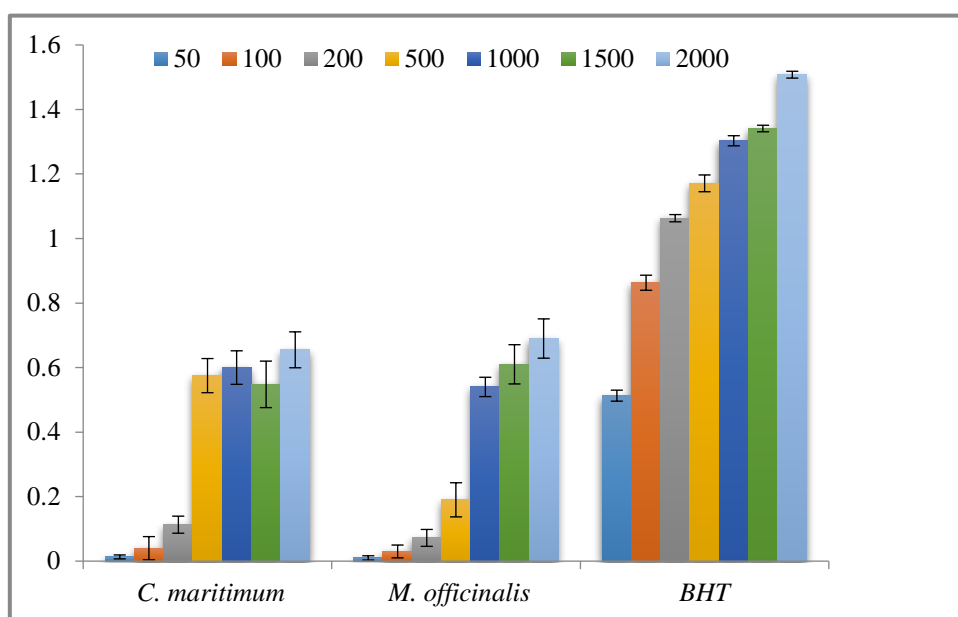
**Tableau 26:** Résultats du test du pouvoir réducteur du BHT et des HE étudiées.

Concentration en mg/l	<sup>a</sup> Absorbance à 700nm		
	HE de Fenouil marin	HE de Mélisse	BHT
50	0.013 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.513 ± 0.009 <sup>a</sup>
100	0.040 ± 0.001 <sup>b</sup>	0.030 ± 0.009 <sup>b</sup>	0.863 ± 0.011 <sup>b</sup>
200	0.113 ± 0.003 <sup>c</sup>	0.072 ± 0.002 <sup>c</sup>	1.063 ± 0.024 <sup>c</sup>
500	0.575 ± 0.010 <sup>d</sup>	0.190 ± 0.002 <sup>d</sup>	1.171 ± 0.005 <sup>d</sup>
1000	0.600 ± 0.010 <sup>e</sup>	0.540 ± 0.007 <sup>e</sup>	1.303 ± 0.003 <sup>e</sup>
1500	0.628 ± 0.008 <sup>f</sup>	0.610 ± 0.006 <sup>f</sup>	1.341 ± 0.017 <sup>f</sup>
2000	0.655 ± 0.005 <sup>g</sup>	0.690 ± 0.005 <sup>g</sup>	1.508 ± 0.005 <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Les résultats sont moyennes ± écart type de trois mesures.

D'après les résultats obtenus on constate que le pouvoir réducteur augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration, que ce soit pour les HE ou le BHT. En effet, l'HE du fenouil marin entraîne une absorbance moyenne de 0.013 à une concentration de 50 mg/l, cette valeur passe progressivement à 0.655 à la concentration 2000 mg/l. De même, l'HE de la mélisse passe de 0.01 à 0.69 pour les concentrations utilisées.

Le BHT présente une absorbance de 0.513 à la plus faible concentration utilisée (50 mg/l), ce qui est légèrement inférieur aux valeurs atteintes par les deux HE à la concentration la plus élevée, ce qui indique un très grand pouvoir réducteur du BHT.



**Figure 41:** Résultats du test du pouvoir réducteur du BHT et des HE étudiées.

### 6.1.3. Résultats de l'activité de piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> par les HE de *Crithmum maritimum* L. et de *Melissa officinalis* L.

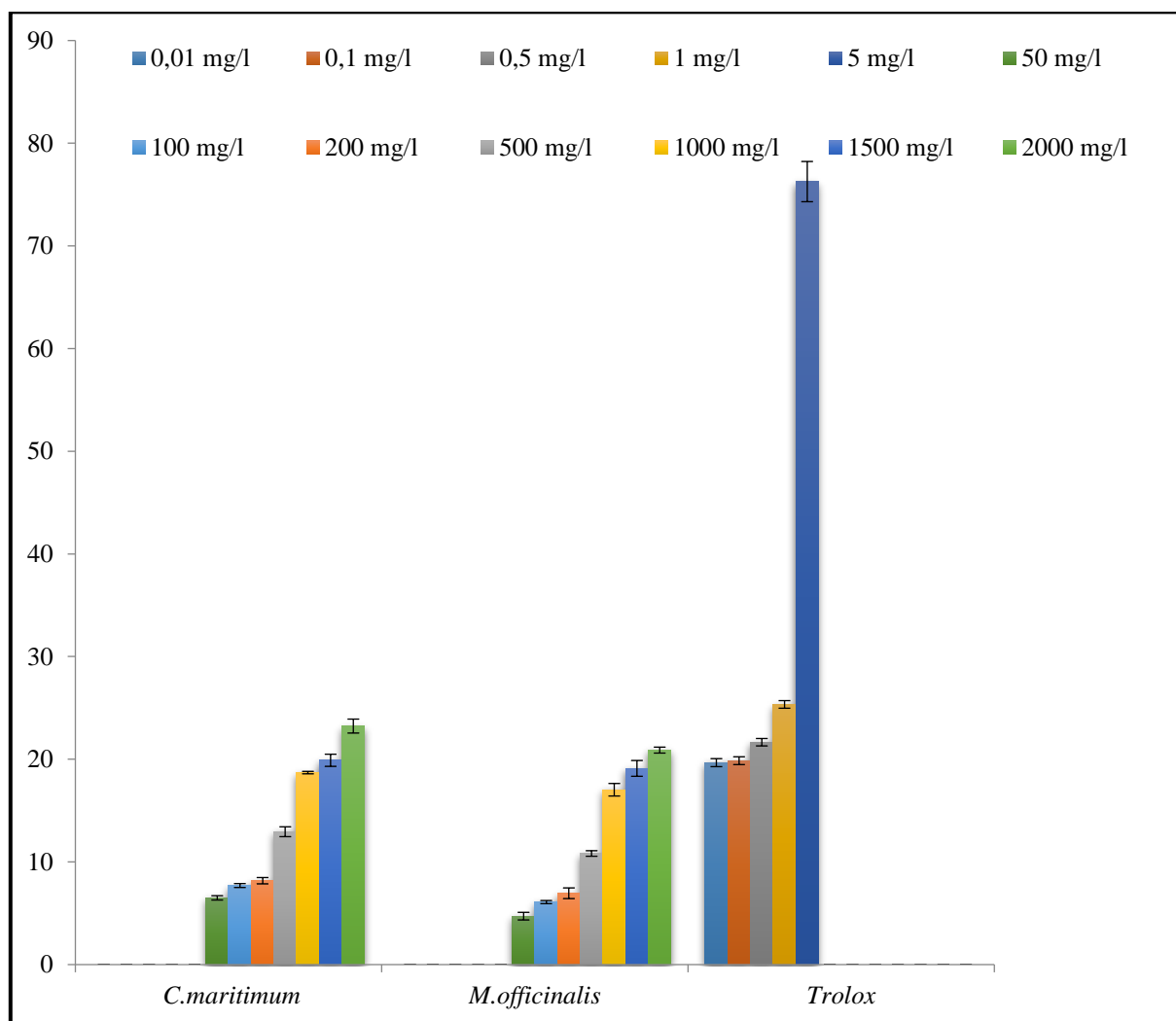
**Tableau 27:** Résultats du test d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> par les HE étudiées et le TROLOX.

Concentration en mg/l	Activité de piégeage du radical ABTS <sup>•+</sup> en %		
	HE de Fenouil marin	HE de Mélisse	TROLOX
0.01	ND	ND	19.67 ± 0.39 <sup>a</sup>
0.1	ND	ND	19.86 ± 0.38 <sup>b</sup>
0.5	ND	ND	21.66 ± 0.36 <sup>c</sup>
2.5	ND	ND	25.34 ± 0.37 <sup>d</sup>
5	ND	ND	96.26 ± 1.96 <sup>e</sup>
50	6.50 ± 0.21 <sup>a</sup>	4.72 ± 0.37 <sup>a</sup>	ND
100	7.70 ± 0.19 <sup>b</sup>	6.09 ± 0.15 <sup>b</sup>	ND
200	18.17 ± 0.31 <sup>c</sup>	6.95 ± 0.52 <sup>c</sup>	ND
500	12.93 ± 0.48 <sup>d</sup>	10.82 ± 0.27 <sup>c</sup>	ND
1000	18.70 ± 0.12 <sup>e</sup>	17.03 ± 0.61 <sup>e</sup>	ND
1500	19.09 ± 0.59 <sup>f</sup>	19.11 ± 0.77 <sup>f</sup>	ND
2000	23.23 ± 0.68 <sup>g</sup>	20.89 ± 0.29 <sup>g</sup>	ND

<sup>a</sup> Les résultats sont moyennes ± écart type de trois mesures.

ND : Non déterminé

- L'activité de piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> augmente progressivement avec l'élévation de la concentration en HE pour atteindre des valeurs maximales de 23.23% et 20.89% respectivement pour l'HE de fenouil marin et de mélisse. Ces résultats confirment leurs faible capacité à réduire le radical ABTS<sup>•+</sup> par rapport à l'antioxydant de synthèse « TROLOX » choisi comme standard. Les concentrations inhibitrices de 50% des radicaux n'ont pas été atteintes même aux concentrations maximales, alors que celle du TROLOX est estimée aux alentours de 3 mg/l.



**Figure 42:** Résultats du piégeage du radical ABTS par les HE testées et le TROLOX.

#### 6.1.4. Discussion sur l'activité antioxydante des HE *Crithmum maritimum* L. et de *Melissa officinalis* L.

##### ❖ HE de *Crithmum maritimum* L.

- Selon **Ruberto et al., (2000)**, l'activité antioxydante de l'HE de fenouil marin mesurée par le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) s'est avérée être plus active par rapport aux antioxydants de références (BHT & Tocophérol).
- La capacité de réduction du radical DPPH par l'HE de *Crithmum maritimum* citée par **Kulisic-Bilusic et al., (2009)** est relativement faible, ce qui concorde avec les résultats de notre échantillon ;
- Cependant, le test de blanchiment du  $\beta$ -Carotène/ acide linoléique montre que l'HE du fenouil marin empêche le processus d'oxydation des lipides et donc retarde la détérioration des aliments. (**Kulisic-Bilusic et al., 2010**).

- D'après les travaux menés par **Nguir et al., (2011)**, sur deux échantillons d'HE de *Crithmum maritimum* L. originaire de Tunisie extraites des parties aériennes et de la racine de cette plante ; on constate une activité de piégeage du radical ABTS modérée ( $IC_{50} = 0.643$  mg/ml et  $0.0514$  mg/ml respectivement pour l'HE issue de la racine et des parties aériennes), cette étude montre une activité antioxydante relativement élevée par rapport à celles citées dans la littérature (**Meot-Duros et al., 2008 ; Kulisic-Bilusic et al., 2010**), Ceci peut s'expliquer par la composition chimique de cette huile en constituants majoritaires, notamment en  $\gamma$ -Terpinène (21.9% - 39.3%) et particulièrement en **Dillapiole** (19.7% - 26.8%).
- L'ensemble des méthodes testées pour évaluer l'activité antioxydante de notre échantillon confirme un pouvoir antioxydant relativement moyen de cette huile.

#### ❖ HE de *Melissa officinalis* L.

- D'après **Mimica-Dukic et al., (2004)**, l'estimation de l'activité antioxydante testée par la méthode de piégeage du radical DPPH par l'HE de *Melissa officinalis* a montré une bonne capacité de réduction du radical DPPH qui se traduit par une concentration inhibitrice de 50% des radicaux de  $7.58$   $\mu$ g/ml. Cette valeur est très proche de celle obtenue avec le BHT choisi comme antioxydant de synthèse pour réduire 50% des radicaux ( $5.38$   $\mu$ g/ml).
- Les résultats du pouvoir antioxydant de l'HE de *Melissa officinalis* obtenu par **Carvalho de Sousa et al., (2004)** en vue de son application en tant qu'anti-tumoral sont nettement supérieurs à ceux de notre échantillon, où ils notent des  $IC_{50\%} = 2$   $\mu$ l.
- L'étude menée par **Mefthahizade et al., 2010**, révèle que l'HE de *Melissa officinalis* présente un potentiel antioxydant comparable à ceux du BHT et BHA, cette équivalence est liée aux composés phénoliques contenus dans cette huile tels que : Citronellal et Neral.
- **Popova et al., (2016)** dans leur étude portant sur l'HE et les extraits de *M. officinalis*, mettent en évidence les propriétés antioxydantes très satisfaisantes des extraits de Mélisse, ces propriétés sont attribuées aux composés phénoliques.
- En générale, notre échantillon originaire de la région de Sétif (Algérie) a manifesté une activité antioxydante nettement inférieure à celle rapportée par la littérature, ceci peut s'expliquer par la grande variabilité de la composition chimique de cette huile qui est fortement dépendante des conditions édapho-climatiques.



### 6.1.5. Activité antioxydante des HE de *Thymus pallescens* de Noé

Les résultats du pouvoir antioxydant de l'HE de *T.pallescens* exprimés en valeurs d'IC<sub>50</sub> présentés dans le tableau 28 indiquent, que les huiles irradiées à 20 et 30 KGy sont les plus actives pour tous les tests étudiés, mais restent en général moins efficaces que les témoins positifs. Nos résultats montrent que les doses d'irradiation à 20 et 30 KGy affectent positivement l'activité antioxydante de *T.pallescens*. Pour les autres doses (5 et 10 KGy), l'activité antioxydante diminue ou augmente selon chaque test utilisé, mais les changements enregistrés entre ces deux doses ne sont généralement pas significatifs.

**Tableau 28:** Résultats des concentrations inhibitrices de 50% des radicaux des HE étudiées, du BHT et du TROLOX.

Echantillon et/ou témoin	DPPH	ABTS	TBARS	Pouvoir réducteur
<b>0 KGy</b>	574.0±3.6 <sup>c</sup>	21.1±3.9 <sup>c</sup>	387±7 <sup>c</sup>	255±1.9 <sup>cd</sup>
<b>5 KGy</b>	631.6±1.4 <sup>cd</sup>	18.2±0.1 <sup>d</sup>	378.7±10.8 <sup>c</sup>	249.6±4.6 <sup>d</sup>
<b>10 KGy</b>	627±8.6 <sup>cd</sup>	18.3±3.3 <sup>d</sup>	375.1±6.7 <sup>c</sup>	330.2±3.4 <sup>e</sup>
<b>20 KGy</b>	286.7±5.9 <sup>b</sup>	17.9±4.9 <sup>cd</sup>	104.5±1.8 <sup>b</sup>	240.4±3.1 <sup>c</sup>
<b>30 KGy</b>	609±3.3 <sup>c</sup>	17.3±0.04 <sup>c</sup>	20.3±0.6 <sup>a</sup>	204.1±3.1 <sup>b</sup>
<b>BHT</b>	28.0±0.7 <sup>a</sup>	5.3±0.01 <sup>b</sup>	98.4±1.7 <sup>b</sup>	64.8±0.8 <sup>a</sup>
<b>TROLOX</b>	ND	2.0±0.1 <sup>a</sup>	ND	ND

ND : Non Déterminé

Les données bibliographiques concernant l'influence de l'irradiation par rayons X sur l'activités antioxydante des herbes ou des épices concernent principalement les extraits non volatils alors que celles sur les huiles essentielles sont plutôt rares (**Zantar et al., 2015 ; Abdeldaiem et al., 2009; Fatemi et al., 2014**).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés pour l'HE de *Rosmarinus officinalis* pour laquelle l'activité antioxydante mesurée par des tests de clavenging du DPPH et des tests de décoloration du β-carotène, l'activité antioxydante augmente avec la dose d'irradiation 10-15 KGy (**Fatemi et al., 2014**). Pour les mêmes tests, aucun changement significatif de l'activité antioxydante n'a été noté pour l'huile essentielle de *Mentha piperita* irradiée à 10 et 20 kGy (**Fatemi et al., 2014**). L'huiles essentielle de *T. vulgaris* originaire du Maroc qui est riche en carvacrol a montré une importante augmentation du pouvoir de piégeage du radical DPPH qui se stabilise entre 20 et 30 KGy (**Zantar et al., 2015 ; Horváthová et al., 2007**).

## 6.2. Activité antimicrobienne

Les mesures de l'activité inhibitrice ont été effectuées par la méthode des disques (Aromatogramme)

Donc les mesures des diamètres des zones d'inhibition ont pour but de mettre en évidence l'action des HE sur les souches microbiennes testées.

A cet effet, une échelle de mesure de l'activité antimicrobienne a été mise par **Ela et al., (1996) et Meena et Sethi (1994)**, répartissant les diamètres des zones d'inhibition en 04 classes:

- ✓ Fortement inhibitrice: lorsque le diamètre de zone d'inhibition est supérieur 28 mm ;
- ✓ Modérément inhibitrice: le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16 mm et 28 mm ;
- ✓ Légèrement inhibitrice: le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 10 mm et 16 mm;
- ✓ Non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm.

Ainsi, l'interprétation de nos résultats se fait par la comparaison entre les résultats des tests effectués avec ceux donnés par l'échelle ci-dessus considérée comme témoin comparatif.

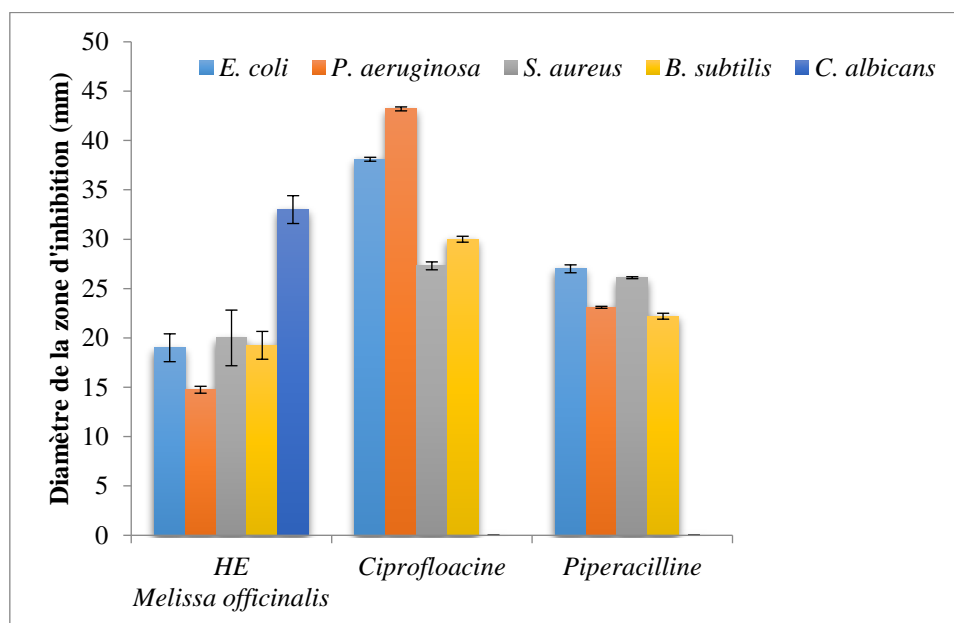
### 6.2.1. Activité antimicrobienne de l'HE de *Melissa officinalis* L.

#### ❖ Etude qualitative de l'HE analysée

Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibition par l'HE en utilisant le test de l'aromatogramme sont regroupés dans le tableau 29 et la figure 43

**Tableau 29:** Sensibilité des souches étudiées à l'HE de mélisse (Diffusion en mm par disque  $\pm$  Standard déviation).

Souches	HE <i>M. officinalis</i>	Ciprofloxacine	Piperacilline
<i>Bacillus subtilis</i>	19,25 $\pm$ 1,41 <sup>c</sup>	30.00 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	22.20 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i>	19,00 $\pm$ 1,41 <sup>b</sup>	38.10 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>	27.00 $\pm$ 0.40 <sup>d</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,75 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	43.20 $\pm$ 0.20 <sup>d</sup>	23.10 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,00 $\pm$ 2,82 <sup>d</sup>	27.30 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	26.10 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>
<i>Candida albicans</i>	33,00 $\pm$ 1,41 <sup>e</sup>	ND	ND



**Figure 43:** Diamètres des zones d'inhibition de l'HE testée, la Ciprofloxacine et la Piperacilline.

Au vu des résultats résumés dans le tableau 29 et la figure 43, on constate que l'HE de mélisse présente une légère activité inhibitrice vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (14.75 mm), une activité inhibitrice modérée contre *Staphylococcus aureus* (20 mm), *Bacillus subtilis* (19.25 mm) et *E.coli* (19 mm), alors qu'une forte inhibition est notée avec la plus grande valeur enregistrée (33 mm) vis-à-vis de *Candida albicans*.

Les antibiotiques employés comme témoins positifs montrent une meilleure activité par rapport à l'HE de mélisse pour toutes les souches bactériennes testées. La Ciprofloxacine enregistre un fort pouvoir inhibiteur contre de toutes les bactéries testées (> 27 mm). Pour la Piperacilline, une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (< 27 mm) et un fort pouvoir inhibiteur contre *E.coli* (27 mm).

Dans l'étude de **Mimica et Dukic et al., 2004**, l'HE de mélisse originaire de Serbie testée sur plusieurs bactéries à des teneur en HE de 20% et 50% montre une activité d'inhibition qui augmente avec la concentration et qui varie selon la souche testée, sauf dans le cas de la souche *S.aureus* où l'activité inhibitrice de l'HE à 20% est supérieure à celle de 50% (24 mm et 19.4 mm respectivement pour les 2 teneurs).

- Une légère inhibition vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* (13.4 à 15.8 mm) est enregistrée pour toutes les concentrations en HE, ce qui concorde avec les résultats de notre échantillon ;
- Une forte inhibition est notée vis-à-vis de *B.subtilis* (29.6 mm et 28.2 mm respectivement pour 20% et 50% en HE) ;
- Une forte activité inhibitrice est aussi notée contre l'une des souches *E.coli* pour les deux concentrations.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Abdelatif et al., 2014**, pour toutes les bactéries testées à l'exception de *P aeruginosa*, qui présente une résistance à l'HE de mélisse.

**Abdelatif et al., (2014)** notent une activité d'inhibition modérée contre les bactéries et une forte inhibition vis-à-vis de *C.albicans* (36 mm).

#### ❖ Détermination des CMI & CMB de l'HE analysée

Afin de confirmer les résultats trouvés précédemment dans l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne et dans le but de mesurer la dose exacte au-delà de laquelle toute croissance microbienne est inhibée, nous avons procédé à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'HE de *Melissa officinalis*.

Les valeurs des CMI et des CMB de l'HE testée vis-à-vis des souches microbiennes analysées sont représentées dans les tableaux 30, 31, 32, 33 et 34.

**Tableau 30:** Evaluation des CMI de l'HE de mélisse.

HE	Concentration	Micro-organismes testés				
		<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Huile essentielle de Mélisse	0.03%	+	+	+	+	+
	0.06%	+	+	+	<b>CMI</b>	+
	0.125%	+	+	+	-	<b>CMI</b>
	0.25%	+	<b>CMI</b>	+	-	-
	0.50%	+	-	+	-	-
	1%	<b>CMI</b>	-	+	-	-
	2%	-	-	<b>CMI</b>	-	-

+ : croissance microbienne, - : absence de croissance.

D'après les résultats obtenus, *Pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus résistante vis-à-vis de l'HE étudiée, alors que *Staphylococcus aureus* s'est avéré être la plus sensible (tableau 30).

Cette résistance de *Pseudomonas aeruginosa* 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).

Les valeurs des CMI obtenues viennent affirmer les résultats de l'analyse qualitative (l'Aromatogramme).

**Tableau 31:** Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) de l'HE de mélisse.

Souches	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
CMI (v/v)	1	0.25	2	0.06	0.125

**Tableau 32:** Concentration Minimales Bactéricides (CMB) de l'HE de mélisse.

Souches	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
CMB (v/v)	2	0.5	> 2	0.25	0.25

L'HE de mélisse présente une assez bonne activité antimicrobienne à travers des CMI plutôt faibles, sauf dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* qui montre la plus forte résistance avec une CMI de 2%, cette valeur confirme le résultat obtenu par l'aromatogramme (Z= 14.75 mm), la CMB n'a pas été déterminée (> 2%).

La CMI dans le cas d'*E.coli* est de 0.25% cela est en accord avec les résultats de l'analyse qualitative, la CMB quant à elle est de 0.5%.

La valeur de la CMI enregistrée dans le cas de *Bacillus subtilis* est de 1%, la CMB est plus élevée et équivaut à 2%.

*Staphylococcus aureus* s'est avérée être la souche la plus sensible sous l'action de l'HE de mélisse avec des CMI de 0.06%, ces résultats concordent avec l'étude qualitative. Alors que la CMB pour *Staphylococcus aureus* est plus élevée 0.25%.

Dans le cas de la levure, l'HE de *Melissa officinalis* montre une CMI assez faible de 0.125% contre *Candida albicans*. Cela confirme également le test de sensibilité par la méthode de diffusion sur gélose, la CMB est deux fois supérieure à la CMI 0.25%.

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle, lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile est considérée comme bactéricide (Hellal, 2011).

Le tableau 33 résume les rapports des CMB/CMI de l'HE de mélisse.

**Tableau 33:** Rapports CMB/CMI de l'HE de mélisse.

Souches	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
CMB/CMI	2	2	ND	4.16	2

ND : Non Déterminé

Les rapports CMB/CMI déterminés dans le tableau 33, indiquent que l'HE de mélisse est bactéricide vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* (CMB/CMI < 4).

En comparant les CMI de notre échantillon avec celles citées par Abdelatif et al., 2014, il apparaît que l'HE de notre échantillon est plus active pour toutes les souches testées sauf pour *Pseudomonas aeruginosa* où la CMI est similaire et est égale à 2%.

La forte activité antimicrobienne des huiles essentielles contre presque tous les micro-organismes sensibles peut être attribuée à la présence d'une forte concentration de monoterpènes ayant un potentiel antibactérien et antifongique (**Jalsenjak et al., 1987, Sivropoulou et al., 1997, Sur et al., 1991, Yangui et al., 2009**). Outre les principaux composés, d'autres constituants mineurs des huiles essentielles ont une activité antimicrobienne. Les effets synergiques de la diversité des constituants majeurs et mineurs présents dans les huiles essentielles doivent être pris en considération pour rendre compte de leur activité biologique (**Dorman et Deans, 2000**).

Les propriétés bactéricides se justifient par leur pH acide dans la mesure où la pullulation microbienne est favorisée par l'alcalinité tandis que l'acidité s'y oppose ; ces propriétés se justifient également par l'effet de l'hydrophobicité des composés terpéniques: cas du thymol et du carvacrol (**Hyldgaard et al., 2012**), car la structure phénolique du thymol lui confère des capacités de destruction membranaire par sa forte hydrophobicité et sa capacité à céder un proton qui va pouvoir s'insérer dans la bicouche lipidique de bactéries. Ce qui va engendrer un phénomène de fluidification et entraîner une augmentation de la perméabilité membranaire. C'est la conclusion à laquelle arrivent, **Dubey et al. (2000)**, **Nakamura et al. (1999)**, **Nguefack et al. (2004)**, **Onawunmi et al. (1984)**.

### 6.2.2. Activité antimicrobienne de *Thymus palleescens* de Noé

Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont compris entre 27,0 et 52,8 mm (tableau 34). Ces résultats montrent une forte activité contre toutes les souches bactériennes testées, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*. Les sensibilités les plus élevées ont été observées contre les souches de levure (*C. albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*). Dans l'ensemble, l'activité antimicrobienne des bactéries Gram négatif et Gram positif étudiées n'a pas été significativement affectée par les différentes doses d'irradiation  $\gamma$ . Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés pour l'huile essentielle *Zataria multiflora* Boiss. pour laquelle l'irradiation  $\gamma$  à 10 et 25 kGy n'a pas affecté l'activité antimicrobienne des bactéries Gram positif et Gram négatif (**Fatemi et al., 2015**).

Cependant, nos résultats sont plus ou moins différents de ceux rapportés pour l'huile essentielle de *T. vulgaris* où l'irradiation  $\gamma$  a affecté significativement l'activité antimicrobienne contre deux bactéries gram négatives (*Escherichia coli* et *Salmonella*

*senftenberg*), tandis que les bactéries gram positif (*Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*) n'ont été pas affectées (**Zantar et al., 2015**).

D'autre part, nos résultats sont en total désaccord avec ceux rapportés par **Abdeldaiem et al.**, pour l'huile essentielle de romarin irradiée (5, 10 et 15 kGy) où l'activité antibactérienne augmente proportionnellement avec les doses d'irradiation (**Abdeldaiem, et al., 2009**).

Plusieurs recherches mettent en évidence l'étroite corrélation entre la puissance antibactérienne des HE et leurs composition en constituants majoritaires, particulièrement les monoterpènes phénoliques carvacrol et/ou le thymol dont l'activité antimicrobienne a été prouvée vis à vis de nombreuses de bactéries, notamment les pathogènes d'origine alimentaire (**Rattanachaikunsopon et al., 2010 ; Ramos et al., 2012**). Des micrographies électroniques ont montré que ces composés, de nature lipophile, agissent sur la membrane cellulaire et provoquent des dommages morphologiques importants, entraînant une modification de la perméabilité et la libération du contenu cellulaire (**Moosavy et al., 2008**). De plus, certaines études ont montré que leur combinaison avec d'autres composés courants conduisait à une activité synergique entraînant la déstabilisation de la membrane microbienne (**Fatemi et al., 2015 ; Saei Dehkordi et al., 2010**).



**Tableau 34:** Sensibilité des souches étudiées aux échantillons de *Thymus pallescens* (Diffusion en mm par disque  $\pm$  Standard déviation).

Echantillons /témoin	Microorganismes ; zone d'inhibition (mm)						
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>C.albicans</i>	<i>S.cerevisiae</i>
0 KGy	27.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	32.1 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>	13.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	42.0 $\pm$ 0.4 <sup>e</sup>	40.1 $\pm$ 1.0 <sup>d</sup>	52.8 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	45.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
5 KGy	27.7 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	32.1 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	13.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	42.1 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>	41.5 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>	52.3 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	46.0 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
10 KGy	27.0 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	32.4 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	12.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	42.3 $\pm$ 0.2 <sup>ef</sup>	40.0 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>	51.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	46.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
20 KGy	28.0 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	32.1 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	12.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	40.2 $\pm$ 0.5 <sup>d</sup>	42.0 $\pm$ 0.5 <sup>e</sup>	50.5 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	47.0 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
30 KGy	33.1 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	34.9 $\pm$ 0.3 <sup>d</sup>	12.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	43.2 $\pm$ 0.1 <sup>f</sup>	41.0 $\pm$ 0.1 <sup>de</sup>	46.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	46.8 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
Ciprofloxacine	38.1 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	24.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	43.2 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	27.3 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	30.0 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	ND	ND
Piperacilline	27.0 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	19.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	23.1 $\pm$ 0.1 <sup>e</sup>	26.1 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	22.2 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	ND	ND
Amoxicilline	24.2 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	19.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	ND	35.0 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	12.1 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	ND	ND

ND : Non Déterminé

### 6.3. Activité insecticide des HE étudiées

Les huiles essentielles sont considérées comme un moyen alternatif pour lutter contre de nombreux insectes nuisibles (Tripathi et al., 2009). Pour la protection des denrées alimentaires stockées, les composés phytochimiques peuvent être utilisés pour la prévention des ravageurs, la détection précoce des organismes nuisibles ou la lutte antiparasitaire (López et al., 2008).

Des études sur le mode d'action de l'insecticide naturel ont montré que les traitements des insectes avec des composés naturels tels que les huiles essentielles ou les composés phénoliques peuvent provoquer des symptômes neurotoxiques, notamment une hyperactivité, des convulsions et des tremblements suivis de paralysie (knock-down).

L'action insecticide des HE est très semblable à celle produite par les insecticides pyréthroïdes (Kostyukovsky et al., 2002). Il a été reconnu que les huiles essentielles sont des neurotoxines puissantes et pourraient affecter le système nerveux central (Keane et al., 1999).

L'activité insecticide des HE des trois plantes aromatiques (*Crithmum maritimum* L., *Melissa officinalis* L. et *Thymus pallescens* de Noé) a été étudiée sur la mortalité des adultes de *Callosobruchus maculatus* F. et *Tribolium confusum* Duv. dans les conditions de traitement. Leur efficacité a été déterminée par effet dose et temps d'exposition sur 20 individus en comparant leurs (DL<sub>30</sub> et DL<sub>50</sub>) et (TL<sub>30</sub> et TL<sub>50</sub>) tirés de la courbe de régression des Probits en fonction des log (doses et / ou temps) décrite par Finney en 1971.

#### 6.3.1. Activité insecticide des HE de *Crithmum maritimum* L. et de *Melissa officinalis* L.

##### ❖ Résultats du test de toxicité par inhalation des HE de *C.maritimum* L. et de *M.officinalis* L. vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* F.

La mortalité des adultes de *C.maculatus* F. est observée dans des pots de 69.50 cm<sup>3</sup> de volume saturé en HE de *C.maritimum* L. et *M.officinalis* L. à des teneurs, respectivement de 15µl (0,216 µl/cm<sup>3</sup>) et 8 µl (0,072 µl/cm<sup>3</sup>). Un pot sans aucun traitement a été utilisé comme témoin. Après l'introduction des adultes de *C.maculatus* à l'intérieur des pots saturés en HE les insectes manifestent un comportement agité et perturbé pour éviter les odeurs d'HE.

Les résultats du test par inhalation pour les deux HE sont rapportés dans le tableau 35

**Tableau 35:** Evaluation de la toxicité par inhalation des HE de fenouil marin et de mélisse vis-à-vis de *C.maculatus* F.

<i>Crithmum maritimum</i> L.				<i>Melissa officinalis</i> L.			
Doses d'HE = 15 µl (0.216 µl/cm <sup>3</sup> )				Doses d'HE = 8 µl (0.072 µl/cm <sup>3</sup> )			
Temps (h)	% de mortalité	% de mortalité corrigé	Probit	Temps (h)	% de mortalité	% de mortalité corrigé	Probit
24	23.33	20.03	4.23	6	26.66	25.42	4.33
48	50.00	42.27	4.95	12	36.66	34.48	4.59
72	68.33	66.66	5.44	18	76.66	75.86	5.71
96	98.33	98.21	7.05	24	86.66	85.96	6.08

La mortalité des insectes observée dans les pots témoins est due à une mort naturelle et n'est pas causée par effet des HE.

#### ❖ HE de *Crithmum maritimum* L.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le taux de mortalité augmente progressivement avec le temps d'exposition des insectes à l'effet d'inhalation d'HE de fenouil marin. En effet, l'HE de *C.maritimum* L. est dotée d'une activité insecticide par effet d'inhalation.

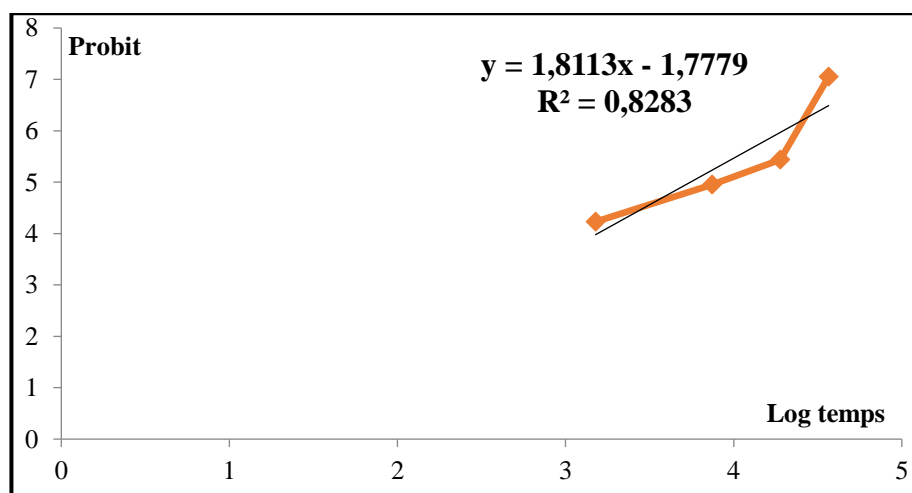
Un traitement de 15 µl (0.216 µl/cm<sup>3</sup>) d'HE, la mortalité enregistrée est de 22.03% au bout de 24h, qui augmente jusqu'à plus doubler, 48.27% après 48h d'exposition, pour atteindre 66.66% au bout de 72h. La mortalité maximale est de 98.21% après une exposition de 96h d'inhalation.

#### ❖ HE *Melissa officinalis* L.

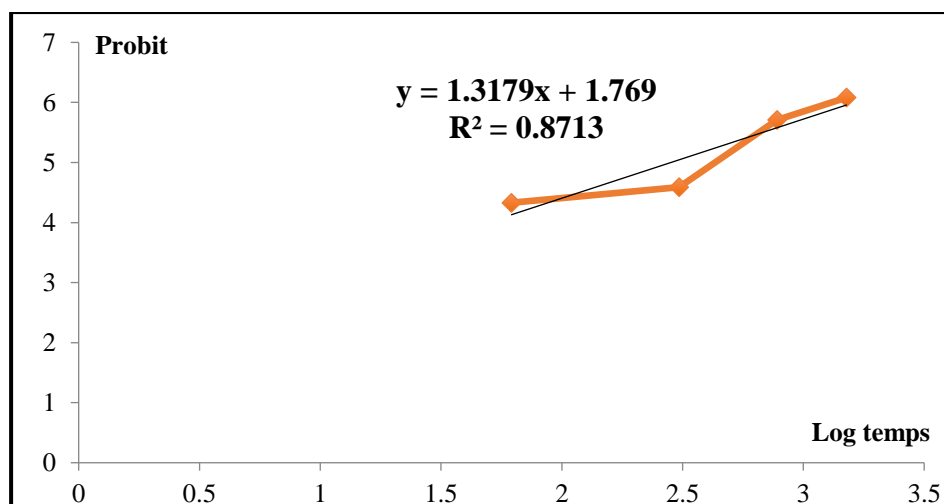
La toxicité de l'HE de mélisse à une dose de 8 µl soit 0.072 µl/cm<sup>3</sup> par effet d'inhalation augmente avec le temps. Une mortalité de 25.42% est enregistrée après 6h d'exposition, puis augmente jusqu'à atteindre 34.48% au bout de 12h, après 18h d'exposition on atteint un taux de mortalité de 75.86%, pour arriver à 85.96% après 24h.

#### ➤ Détermination des temps létaux TL<sub>30</sub> et TL<sub>50</sub> des HE de *C.maritimum* L. et *M.officinalis* L.

Les courbes de régression des mortalités exprimées en probit en fonction du logarithme décimal du temps permettent le calcul des temps létaux de 30% et 50% des insectes.



**Figure 44:** Détermination des TL<sub>30</sub> et TL<sub>50</sub> de l'HE *Crithmum maritimum* L. par effet d'inhalation vis à vis de *C.macutatus* F.

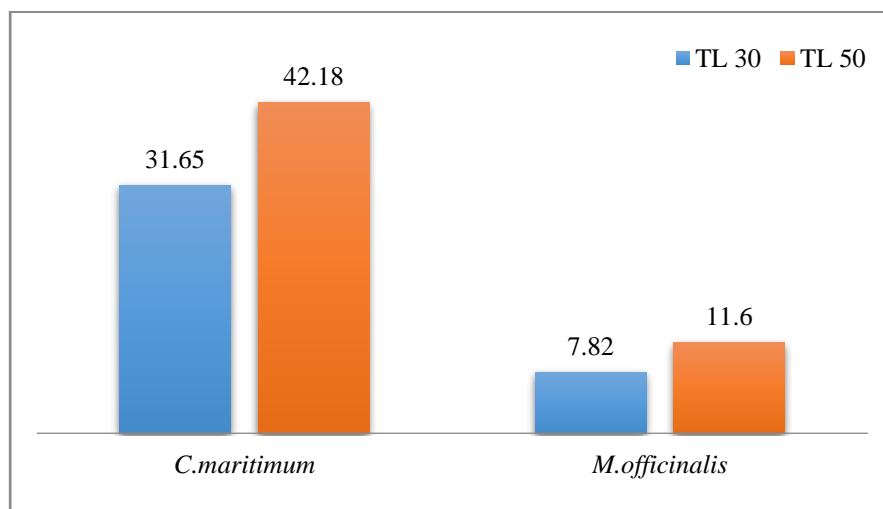


**Figure 45:** Détermination des TL<sub>30</sub> et TL<sub>50</sub> de l'HE *Melissa officinalis* L. par effet d'inhalation vis à vis de *C.maculatus* F.

Le tableau 36 et les figures 44 et 45 regroupent les valeurs des temps létaux de 30% et de 50% des adultes de *C.maculatus* par inhalation des HE testées.

**Tableau 36:** TL<sub>30</sub> et TL<sub>50</sub> des HE de fenouil marin et de mélisse.

Temps létaux (h)	HE	
	<i>Crithmum maritimum</i> L.	<i>Melissa officinalis</i> L.
TL <sub>30</sub>	31.65	7.82
TL <sub>50</sub>	42.18	11.60



**Figure 46:** Temps létaux causant la mort de 30% (TL<sub>30</sub>) et 50% (TL<sub>50</sub>) des individus de *C.maculatus* F.

D'après le tableau 36 et la figure 46 on remarque que les HE testées sont dotées d'un pouvoir insecticide par effet d'inhalation.

❖ **Résultats du test de toxicité des HE de *C.maritimum* L. et de *M.officinalis* L. par contact vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* F.**

La mortalité des adultes de *C.maculatus* F. a été observée dans les bocaux contenant les graines de pois chiche traités aux HE pour les différentes doses (15 µl, 30 µl et 60 µl de l'HE de fenouil marin) et (8 µl, 16 µl et 32 µl de l'HE de mélisse). Des bocaux qui n'ont pas subis de traitements aux HE sont pris comme témoins. Comme pour le test de toxicité par effet d'inhalation, la mortalité naturelle des insectes reste nulle.

Les résultats du test par contact pour les deux HE sont rapportés dans le tableau 37 et illustrés par les figures 47 et 48.

**Tableau 37:** Evaluation de la toxicité par contact des HE de fenouil marin et de mélisse vis-à-vis de *C.maculatus* F.

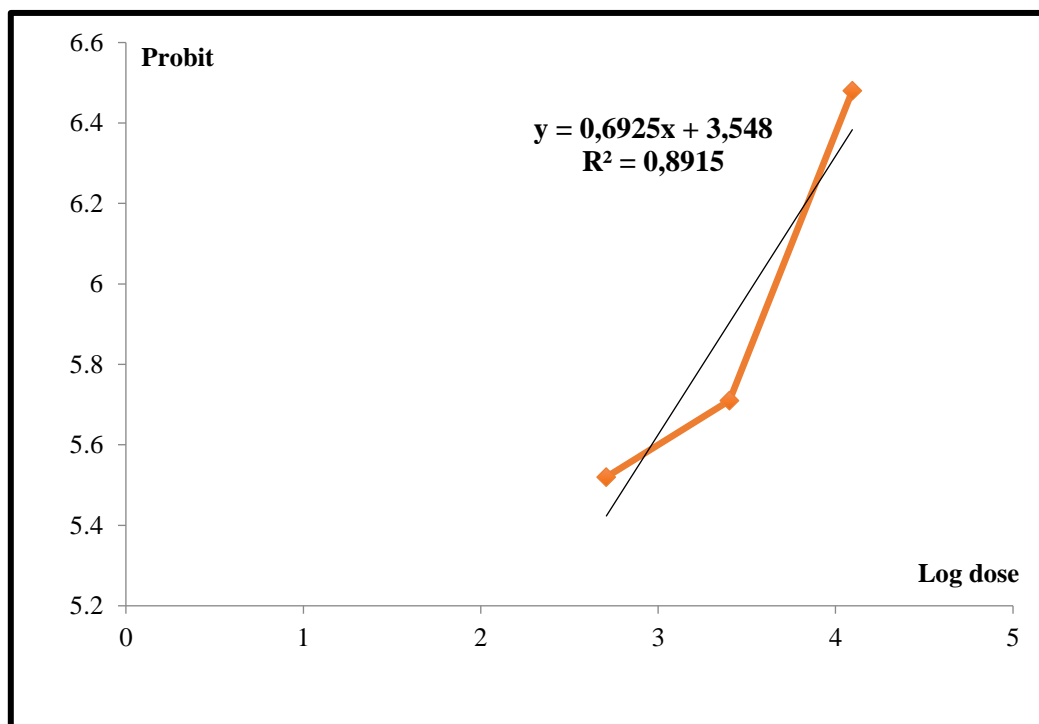
<i>Crithmum maritimum</i> L.					<i>Melissa officinalis</i> L.				
Doses d'HE (µl)	Doses d'HE (µl/cm <sup>2</sup> )	% de mortalité	% de mortalité corrigé	Probit	Doses d'HE (µl)	Doses d'HE (µl/cm <sup>2</sup> )	% de mortalité	% de mortalité corrigé	Probit
0	0	3.33	-	-	0	0	1.67	-	-
15	0.191	71.66	70.69	5.52	8	0.101	93.33	93.22	6.48
30	0.382	76.66	75.86	5.71	16	0.204	95	94.91	6.64
60	0.764	93.33	93.10	6.48	32	0.407	98.33	98.30	7.05

Les résultats obtenus dans le tableau 37 montrent que la mortalité enregistrée pour les deux HE augmente en fonction de la dose.

La mortalité corrigée est comprise entre 70.69 % et 93.10 % pour l'HE de fenouil marin et entre 93.22% et 98.30 % pour l'HE de mélisse. On constate que ces HE possèdent un effet toxique par contact vis-à-vis des adultes de *C.maculatus* F., cet effet est proportionnelle aux doses utilisées.

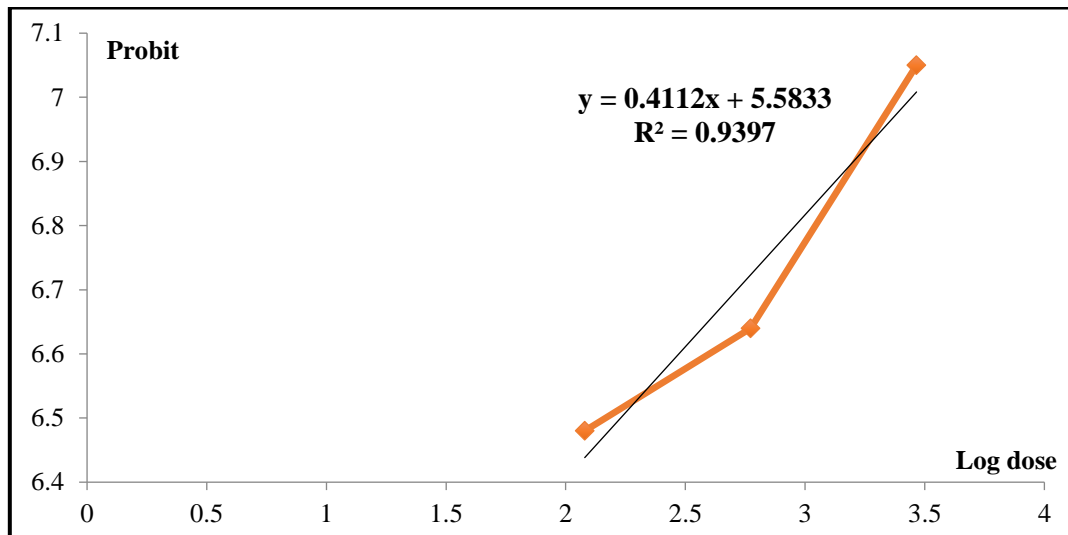
➤ **Détermination des doses létales DL<sub>30</sub> et DL<sub>50</sub> des HE de *C.maritimum* L. et *M.officinalis* L.**

Les courbes de régression des mortalités exprimées en probit en fonction du logarithme décimal de la dose permettent le calcul des doses létales pour 30% et 50% des insectes.



**Figure 47:** Détermination des DL<sub>30</sub> et DL<sub>50</sub> de l'HE *Crithmum maritimum* L. par effet de contact vis à vis de *C.macutatus* F.



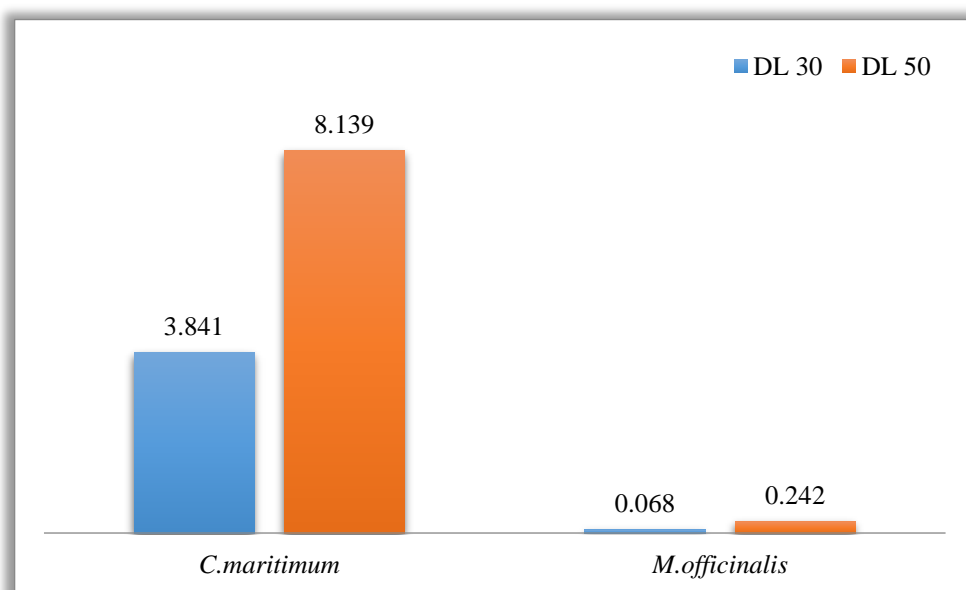


**Figure 48:** Détermination des DL<sub>30</sub> et DL<sub>50</sub> de l'HE *Melissa officinalis* L. par effet de contact vis à vis de *C.maculatus* F.

Le tableau 38 et les figures 47 et 48 regroupent les valeurs des doses létales à 30% et à 50% des HE testées vis-à-vis des adultes de *C.maculatus* par contact.

**Tableau 38:** DL<sub>30</sub> et DL<sub>50</sub> des HE de fenouil marin et de mélisse.

Dose létale (µl)	HE	
	<i>Crithmum maritimum</i> L.	<i>Melissa officinalis</i> L.
DL <sub>30</sub>	3.84	0.068
DL <sub>50</sub>	8.14	0.242



**Figure 49:** Dose létale causant la mort de 30% (DL<sub>30</sub>) et 50% (DL<sub>50</sub>) des individus de *C.maculatus* F.

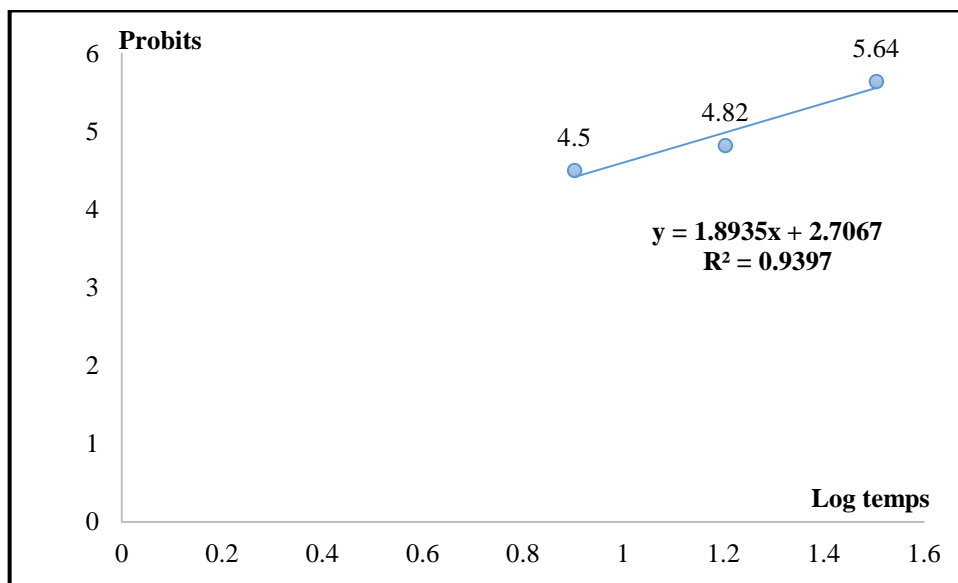
### 6.3.2. Activité insecticide des échantillons d'HE *Thymus pallescens* de Noé.

#### ❖ Résultats du test de toxicité par inhalation vis-à-vis de *Tribolium confusum* Duv.

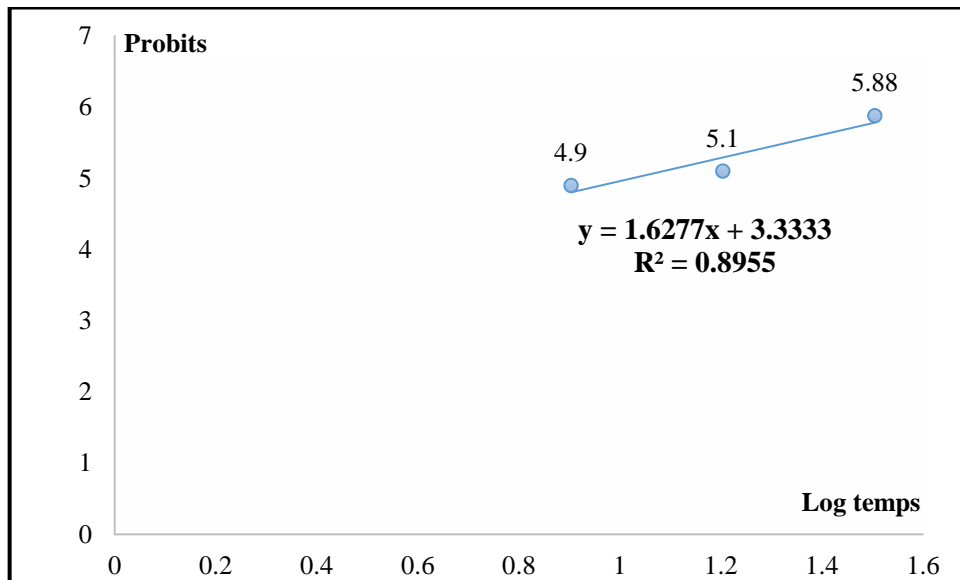
La mortalité par inhalation des insectes a montré que le coléoptère *Tribolium confusum* Duv. est plus sensible aux HE de *T. pallescens* irradiées à 10 et 20 kGy avec un TL<sub>50</sub> des individus respectivement de 3,67 h et 3,65 h pour les échantillons 10 kGy et 20 kGy et un TL<sub>90</sub> des individus respectivement de 7,26 h et 6,77 h pour les échantillons 10 kGy et 20 kGy. Pour les autres échantillons, aucune différence significative n'est notée dans leurs TL<sub>90</sub>.

#### ➤ Détermination des temps létaux TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> des échantillons d'HE de *Thymus pallescens* de Noé.

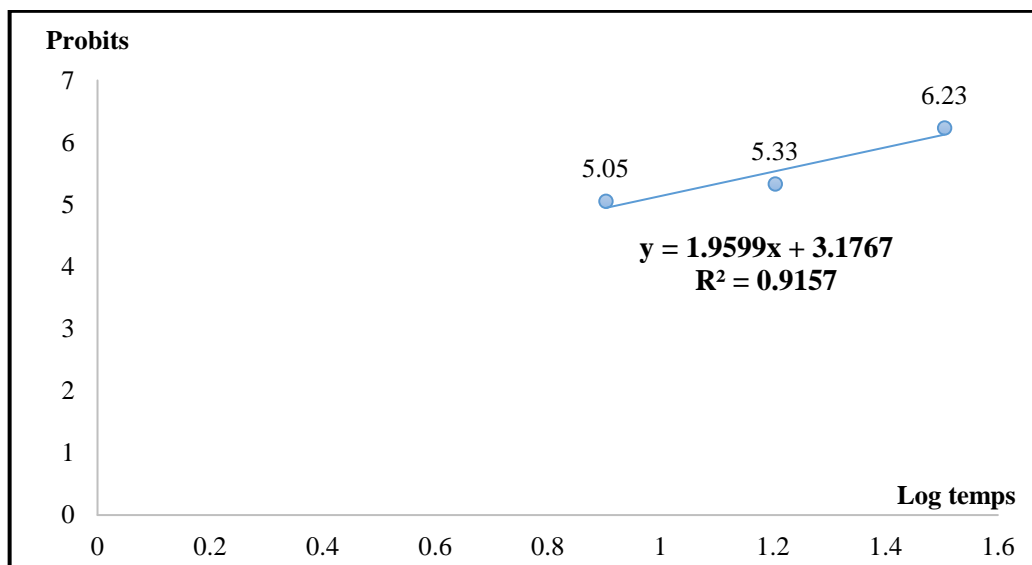
Les courbes de régression des mortalités exprimées en probit en fonction du logarithme décimal du temps permettent le calcul des temps létaux pour 50% et 90% des insectes.



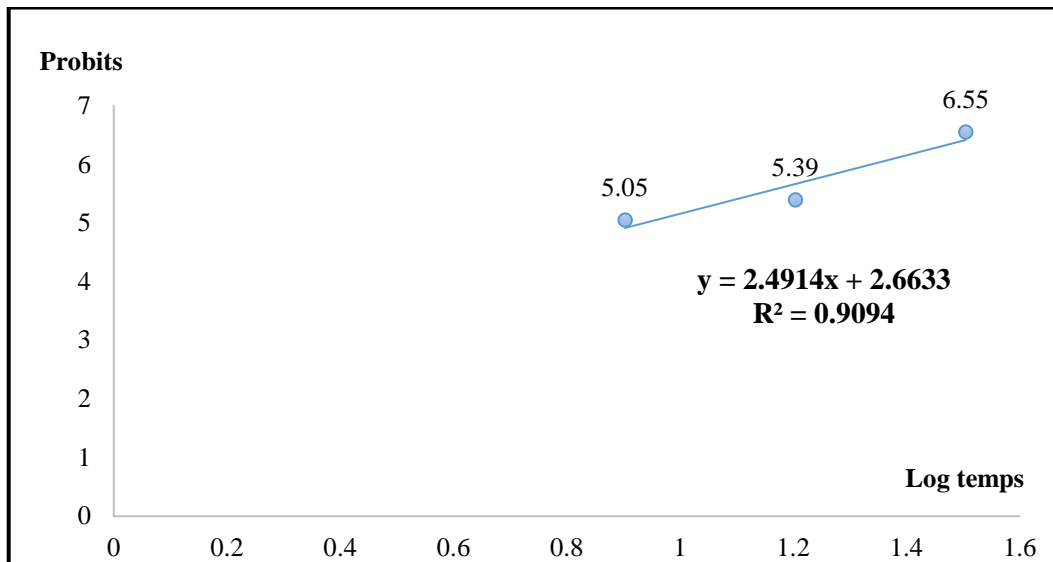
**Figure 50:** Détermination des TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> de l'HE *Thymus pallescens* de Noé non irradié par effet d'inhalation vis à vis de *T.confusum* Duv.



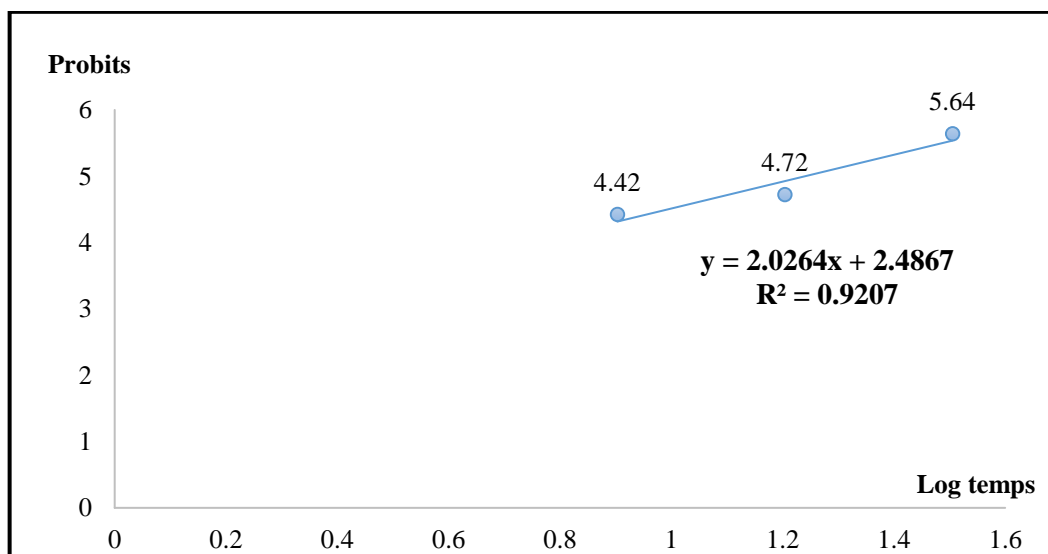
**Figure 51:** Détermination des TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> de l'HE *Thymus pallescens* de Noé irradié à 5 kGy par effet d'inhalation vis à vis de *T.confusum* Duv.



**Figure 52:** Détermination des TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> de l'HE *Thymus pallescens* de Noé irradié à 10 kGy par effet d'inhalation vis à vis de *T.confusum* Duv.



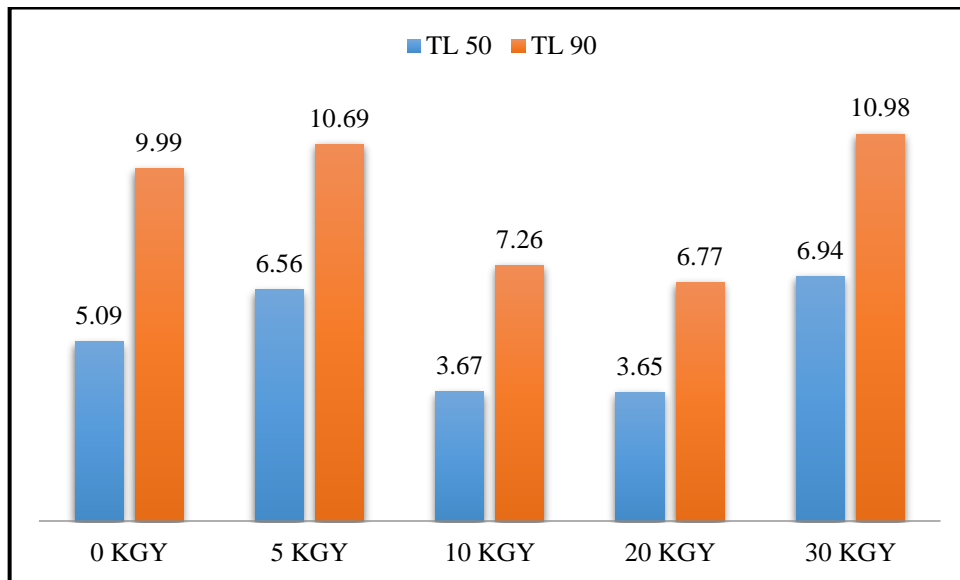
**Figure 53:** Détermination des TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> de l'HE *Thymus pallescens* de Noé irradié à 20 kGy par effet d'inhalation vis à vis de *T.confusum* Duv.



**Figure 54:** Détermination des TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> de l'HE *Thymus pallescens* de Noé irradié à 30 kGy par effet d'inhalation vis à vis de *T.confusum* Duv.

**Tableau 39:** TL<sub>50</sub> et TL<sub>90</sub> des échantillons de *T.pallescens* de Noé.

Temps létaux (h)	HE de <i>T.pallescens</i> de Noé				
	0 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	30 kGy
TL <sub>50</sub>	5,09	6,56	3,67	3,65	6,94
TL <sub>90</sub>	9,99	10,69	7,26	6,77	10,98



**Figure 55:** Temps léthal causant la mort de 50% (TL<sub>50</sub>) et 90% (TL<sub>90</sub>) des individus de *T. confusum* Duv.

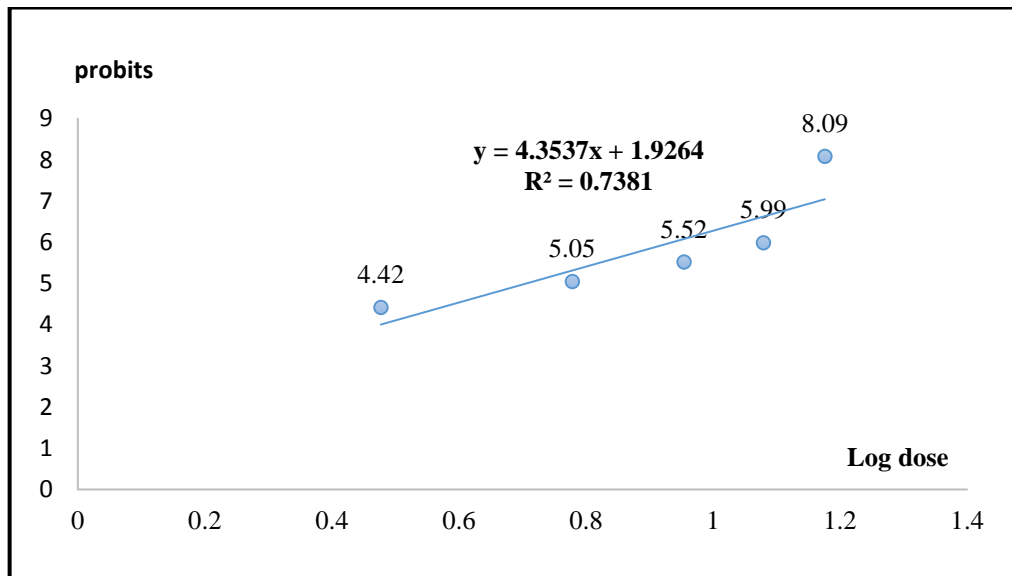
#### ❖ Résultats du test de toxicité par contact vis-à-vis de *Tribolium confusum* Duv.

L'analyse de l'activité insecticide par le test de contact a montré que les HE des échantillons irradiés à 10 et 20 kGy sont également les plus toxiques vis à vis *T. confusum* (DL<sub>50</sub>= 8,81 µl/ml correspondant à 0,055 µl /cm<sup>2</sup> et DL<sub>90</sub> = 38,31 µl /ml correspondant à 0,30 µl /cm<sup>2</sup> pour 10 kGy DL<sub>50</sub> = 8,74 µl/ml correspondant à 0,054 µl /cm<sup>2</sup> et DL<sub>90</sub> = 26,45 µl/ml correspondant à 0,165 µl /cm<sup>2</sup> pour 20 kGy). L'efficacité des échantillons augmente à partir de l'échantillon non irradié pour atteindre son maximum à la dose de 20 kGy puis diminue à 30 kGy. Les différences les plus significatives sont obtenues pour les valeurs DL<sub>90</sub>.

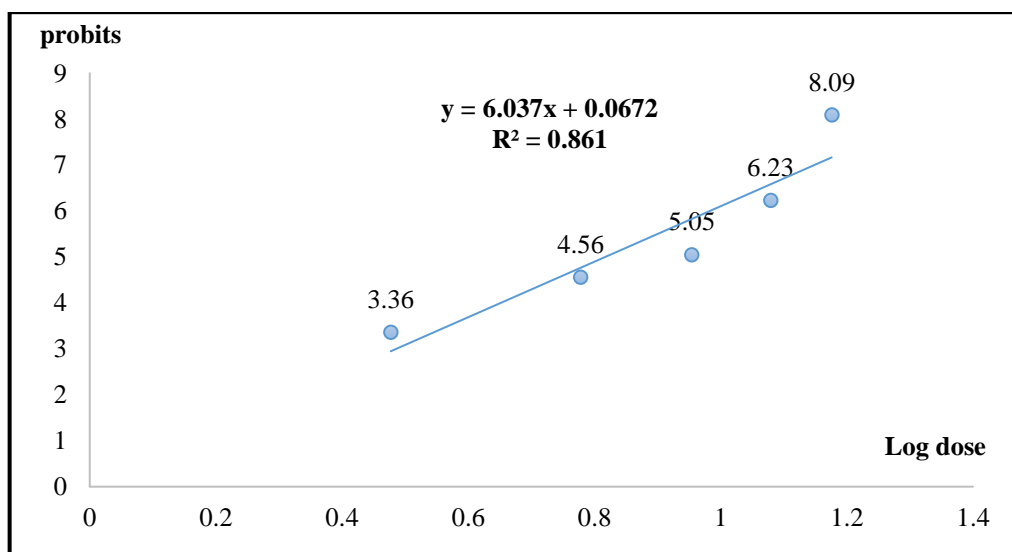
Ce résultat indique que les HE de *Thymus pallescens* sont efficaces au début du traitement mais après une longue période d'exposition seule l'huile irradiée à 20 kGy demeure efficace. Par conséquent, l'huile irradiée à cette dose pourrait être utilisée contre *T. confusum* dans les denrées alimentaires stockées.

#### ➤ Détermination des doses létales DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> des échantillons d'HE de *Thymus pallescens* de Noé

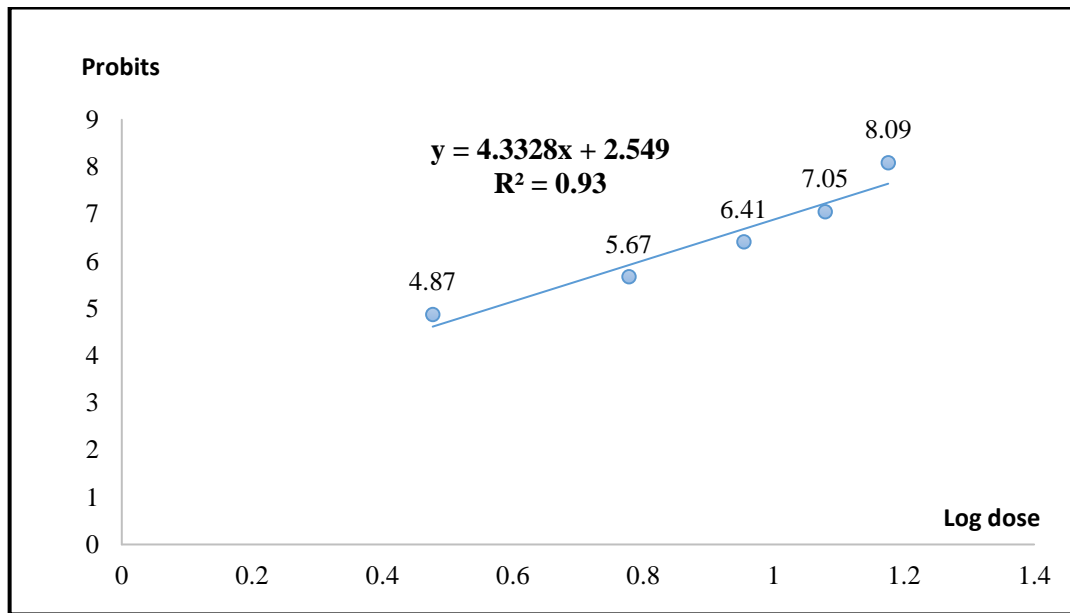
Les courbes de régression des mortalités exprimées en probit en fonction du logarithme décimal de la dose permettent le calcul des doses létales de 50% et 90% des insectes.



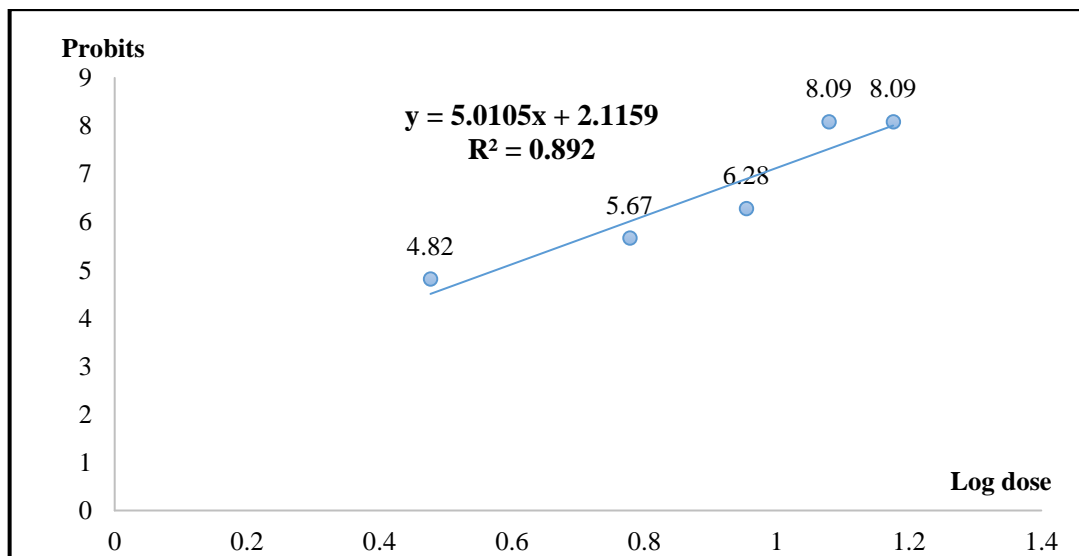
**Figure 56:** Détermination des  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  de l'HE *Thymus pallescens* de Noé non irradié par effet de contact vis à vis de *T.confusum* Duv.



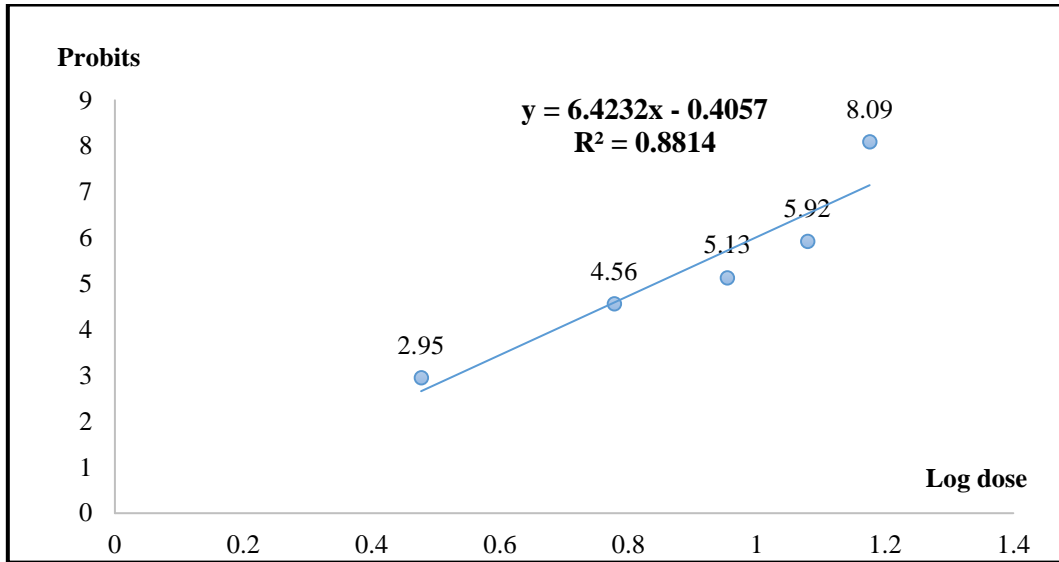
**Figure 57:** Détermination des  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  de l'HE *Thymus pallescens* de Noé irradié à 5 kGy par effet de contact vis à vis de *T.confusum* Duv.



**Figure 58:** Détermination des  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  de l'HE *Thymus pallescens* de Noé irradié à 10 kGy par effet de contact vis à vis de *T.confusum* Duv.



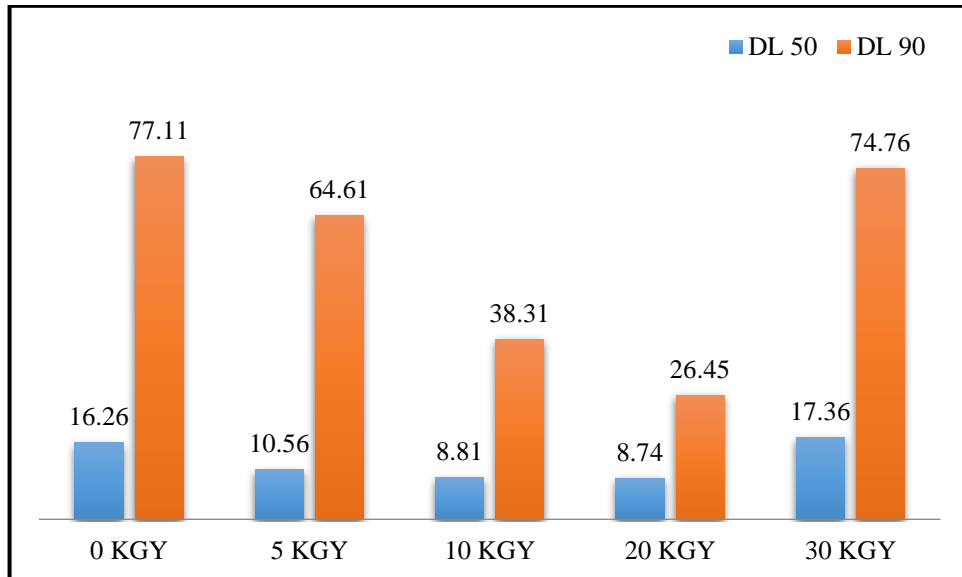
**Figure 59:** Détermination des  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  de l'HE *Thymus pallescens* de Noé irradié à 20 kGy par effet de contact vis à vis de *T.confusum* Duv.



**Figure 60:** Détermination des DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> de l’HE *Thymus pallescens* de Noé irradié à 30 kGy par effet de contact vis à vis de *T.confusum* Duv.

**Tableau 40:** DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> des échantillons de *T.pallescens* de Noé.

Dose létale (µl/ml)	HE de <i>T.pallescens</i> de Noé				
	0 kGy	5 kGy	10 kGy	20 kGy	30 kGy
DL <sub>50</sub>	16,26	10,56	8,81	8,74	17,36
DL <sub>90</sub>	77,11	64,61	38,31	26,45	74,76



**Figure 61:** Concentration létale causant la mort de 50% (DL<sub>50</sub>) et 90% (DL<sub>90</sub>) des individus de *T.confusum* Duv.



La toxicité observée ici pourrait s'expliquer par la présence du carvacrol et du p-cymène. En effet, il a déjà été montré que les huiles essentielles riches en ces deux composés possèdent des effets toxiques aigus contre divers insectes nuisibles au stockage de denrées alimentaires (Kordali et al., 2008 ; Kasrati et al., 2015).

### 6.3.3. Discussion sur de l'activité insecticide des plantes étudiées.

#### ❖ HE de *Crithmum maritimum* L.

L'étude de Tsoukatou et al., 2001, portant sur l'HE de *C.maritimum* L. provenant de différentes régions d'Europe montre que tous les échantillons testés présentent une forte toxicité vis-à-vis de *P.pallidula* avec une mortalité de 90% atteinte après 3 h d'exposition. Ces propriétés répulsives peuvent être attribuées à la composition chimique de cette huile notamment le Dillapiole.

Selon Polatoglu et al., 2016, les résultats du test de toxicité par contact des HE de *C.maritimum* L. originaire de Turquie testée vis-à-vis *S.oryzae*, *R.dominica* et *O.surinamensis* montre une forte activité insecticide, la mortalité observée au bout de 72h est respectivement de 93.30%, 83.60% et 70.33% pour les trois insectes retenus. De même, les résultats du test de toxicité par inhalation vis-à-vis *S.granarius*, *S.oryzae* et *O.surinamensis* enregistre une mortalité de 100% au bout de 48h pour *S.granarius*, *S.oryzae*, alors que *O.surinamensis* semble plus résistant avec une mortalité de 70.33%.

On constate que des résultats satisfaisants sont enregistrés par notre échantillon et sont en accord avec ceux cités par la littérature.

#### ❖ HE de *Mélissa officinalis* L.

D'après les travaux de Pavela (2005), qui a porté sur l'activité insecticide de plusieurs HE vis-à-vis de *Spodoptera littoralis*, dont l'HE de mélisse originaire d'Espagne. La toxicité de cette huile s'est avérée très élevée à travers avec des  $DL_{50} \leq 0.05$   $\mu$ l/larves.

Selon Khater et El Shafiey (2015), enregistre une assez bonne toxicité due à l'HE de *M.officinalis* vis-à-vis de *Tribolium castaneum* avec une  $DL_{50} = 16.4\%$ .

Mahmoudi et al., 2017 ont testé l'activité insecticide de l'HE de mélisse originaire d'Iran vis-à-vis de *Tetranychus urticae*, les résultats de cette étude ont montré que l'HE issue des feuilles présente une très forte toxicité par rapport à celle issue des tiges.

La toxicité enregistrée par notre échantillon de mélisse concorde avec celle citée dans la littérature.

❖ **Echantillons d'HE de *Thymus palleescens* de Noé**

L'effet létal que provoque l'HE de *T. palleescens* est attribué à l'action conjugué de ses monoterpènes qui agissent chez l'insecte sur différentes cibles. Le Carvacrol (81.8% à 85.7%) induit selon plusieurs auteurs une cytotoxicité et une neurotoxicité remarquable des récepteurs de la tyramine, un précurseur de l'octopamine au niveau des voies respiratoires des insectes (Enan, 2005).

## Conclusion générale

---

Les conservateurs chimiques sont partout dans notre alimentation, Il s'agit de substances qui ne se trouvent pas naturellement dans les aliments mais qu'on y ajoute pour améliorer leur goût, leur aspect ou prolonger leur durée de conservation.

Aujourd'hui notre alimentation regorge de substances toxiques à éviter fortement car ils sont la source de beaucoup de nos problèmes de santé : augmentation des allergies, problèmes cardiaques, troubles du comportement.

Aussi, l'utilisation des extraits végétaux, source inépuisable de substances naturelles bioactives a acquis une place importante dans le secteur agro-alimentaire.

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, la présente étude a porté sur trois plantes médicinales poussant spontanément en Algérie : la **Criste marine** (*Crithmum maritimum* L.), la **Mélisse** (*Melissa officinalis* L.) et le **Thym** (*Thymus palleescens* de Noé). Notre travail a été mené dans le but d'étudier la composition chimique et l'estimation des activités biologiques des HE étudiées ainsi que l'influence de l'irradiation  $\gamma$  sur la composition chimique et les activités biologiques de l'HE du *Thymus palleescens* de Noé.

Nous avons d'abord commencé par déterminer les rendements en HE après extraction par hydrodistillation qui sont de **0.45%** pour la criste marine et de **0.77%** pour la mélisse.

Les échantillons de thym quant à eux ont été soumis à un pré traitement consistant à les bombarder à différentes doses d'irradiation : 5, 10, 20 et 30 kGy. Les rendements obtenus pour les échantillons de thym témoin et irradiés varient de **1.70% à 1.80%**

Les résultats de l'analyse de la composition des HE par CPG seule et CG/SM nous ont permis d'identifier:

- Un chémotype riche en composés monoterpéniques pour l'HE de *Crithmum maritimum* où on a pu identifier **51** composés correspondant à **99.1%** de l'HE analysée, avec les composés majoritaires :  **$\gamma$ - Terpinène (39.6%)**, **Thymol méthyle éther (26.9%)**, **p-Cymene (10,2%)** et **Sabinene (6.4%)**.
- Une dominance des Monoterpènes oxygénés dans l'HE de Mélisse où on a pu identifier **64** composés qui correspondent à une teneur de **90.3%** de l'ensemble de l'HE de *Melissa officinalis* avec la prédominance du **Piperitenone oxide (32%)**

suivi par **Pulegone (14%)** puis **Cyclohexanecarboxylic acid, 1-methyl-2-oxo ethyl ester (7.1%)**, **Limonène (6.4%)** et **Piperitone (5.3%)**.

- L'analyse de la composition des échantillons d'HE de thym révèle que le composé principal est le **carvacrol** (monoterpène oxygéné) pour tous les échantillons étudiés (irradiés et non irradié). Cela veut dire que les différentes doses d'irradiation n'ont fait varier que peu le pourcentage et les teneurs des différents constituants chimiques mais pas la composition initiale de la plante.

Les extraits éthanoliques des parties aériennes des espèces étudiées obtenues par extraction solide-liquide par soxhlet ont fourni des rendements d'extraction de **(18.4%)** pour l'extrait de criste marine, **(12.15%)** pour l'extrait de mélisse et varie entre **(16.91% et 22.80%)** pour les échantillons de thym étudiés.

Le dosage des composés phénoliques contenus dans les deux extraits éthanoliques a révélé des concentrations substantielles en polyphénols totaux chez les trois espèces **(41.06 mg EAG/g d'extrait sec** pour la criste marine, **61.20 mg EAG/ g d'extrait sec** pour la mélisse, alors qu'ils varient entre **38.27 à 45.33 mg EAG/g d'extrait sec** pour les HE de thym) avec des teneurs en flavonoïdes de : **(32.72 mg EQ/ g d'extrait sec** pour la criste marine, **28.50 mg EQ / g d'extrait sec** pour la mélisse et passent de **17.89 à 20.50 mg EQ/ g d'extrait sec** pour les échantillons de thym).

L'étude du pouvoir antioxydant des HE a été évaluée par quatre méthodes : le test de piégeage des radicaux **DPPH** et **ABTS**, le **pouvoir réducteur** et le test des substances réactives à l'acide thiobarbituriques (**TBARS**).

L'estimation de l'activité antioxydante des HE de *Crithmum maritimum* et de *Meslissa officinalis* par le test d'inhibition du radical DPPH et ABTS et par le pouvoir réducteur montre une activité antioxydante modérée où pour la concentration la plus élevée qu'on a testée il nous a été impossible de déterminer les concentrations inhibitrices de 50% des radicaux.

Les résultats exprimés en valeurs  $IC_{50}$  indiquent que les huiles irradiées à 20 et 30 kGy sont les plus actives, mais restent néanmoins inférieur par rapport aux témoins positifs. Ces résultats montrent que l'irradiation gamma pour les doses de 20 et 30 KGy, améliore l'activité antioxydante de l'HE de *T.pallesens*. Pour les autres doses (5 et 10 kGy), l'activité antioxydante diminue ou augmente selon chaque test utilisé. Mais, les changements enregistrés entre ces deux doses ne sont pas significatifs.

L'étude de l'activité antimicrobienne des échantillons des HE de *Melissa officinalis* et de *Thymus palleescens* de Noé a montré que :

- L'analyse qualitative de l'activité antimicrobienne de l'HE de mélisse s'est révélée être très appréciable, cette activité est due aux principaux composés de cette huile. Les résultats de la CMI pour l'HE de mélisse est estimée à **0.06%** contre *Staphylococcus aureus* et de **0.125%** vis-à-vis de *Candida albicans* est de **0.25%** contre *E. coli*. L'HE de mélisse s'est révélée être inhibitrice contre *Bacillus subtilis* avec une concentration de **1%**, alors que *Pseudomonas aeruginosa* semble être la souche la plus résistante vis-à-vis de cette huile avec une CMI de l'ordre de **2%**.
- L'irradiation  $\gamma$  aux doses 5, 10, 20 et 30 kGy sur l'activité antimicrobienne de l'HE *T. palleescens* montre des diamètres de zones d'inhibition compris entre **27,0** et **52,8** mm. Une forte activité sur toutes les souches bactériennes testées est notée, à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*. La sensibilité la plus élevée a été observée vis-à-vis des souches de levure (*C. albicans* et *Saccharomyces cervisea*). Dans l'ensemble, l'activité antimicrobienne des HE *T. palleescens* vis-à-vis des bactéries Gram négatif et Gram positif testées n'a pas été significativement affectée par la dose d'irradiation  $\gamma$ .

L'évaluation du pouvoir insecticide des HE étudiées vis-à-vis des ravageurs testés a donné les conclusions suivantes :

- L'estimation de l'activité insecticide montre que les HE de *C.maritimum* et de *M.officinalis* sont actives sur *Callosobruchus maculatus* où les taux de mortalité enregistrée avoisinent les **93,33%** et **98,30%** par effet de contact. Les doses létales occasionnant les mortalités de **50%** des adultes de ce ravageur sont respectivement de **8,14  $\mu$ l/ml** et **0,024  $\mu$ l/ml** pour l'huile *C.maritimum* et de *M.officinalis*.
- Dans le test d'inhalation des HE de *C.maritimum* et de *M.officinalis* la toxicité notée vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* enregistre des pourcentages de mortalité respectivement de l'ordre de **98,33 %** **85,96%** pour les deux huiles retenues. Les temps létaux au bout desquels la mortalité atteint **50%** des individus est respectivement de **42,18h** et **11,60h** pour ces HE.
- L'estimation de la toxicité par inhalation a montré que les coléoptères *Tribolium confusum* sont plus sensibles aux HE de *T. palleescens* irradiées à 10 et 20 kGy avec un TL<sub>50</sub> respectivement de **3,67** et **3,65** h et un TL<sub>90</sub> respectivement de **7,26** et **6,77h**. Pour les autres échantillons, aucune différence significative ne peut être notée dans leur TL<sub>90</sub>.

- En ce qui concerne la toxicité par contact, l'analyse a montré que les échantillons irradiés à 10 et 20 kGy sont aussi les plus toxiques contre *T. confusum* ( $DL_{50} = 8,81 \mu\text{l/ml}$  et  $DL_{90} = 38,31 \mu\text{l/ml}$  pour l'échantillon irradié à 10 kGy, la  $DL_{50} = 8,74 \mu\text{l/ml}$  et  $DL_{90} = 26,45 \mu\text{l/ml}$  pour l'échantillon irradié à 20 kGy). La toxicité observée pourrait s'expliquer par la présence de carvacrol et de p-cymène. En effet, il a été montré que les HE riches en ces composés possèdent des effets toxiques aigus contre divers insectes nuisibles au stockage des denrées alimentaires.

Enfin, dans la perspective de poursuivre l'étude menée sur les plantes retenues, celle-ci peut être approfondie par:

- Le test des activités biologiques des extraits éthanoliques ;
- La détermination de la composition chimique par caractérisation des composés phénoliques auxquels on a attribués les activités biologiques ;
- Compléter l'étude de l'activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des HE et des extraits étudiés par d'autres tests afin de confirmer leurs performances ;

De même des essais réalisés directement sur des produits alimentaires seraient très intéressants et utiles dans le but de généraliser leur utilisation dans le domaine agroalimentaire.

## *Références Bibliographiques*

---

- **Abbott W. S., 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Entomol.*, vol. 18, n°2, p.p. 265-267.
- **Abdeldaiem M. H., Mohamed H.G., Abdel-Khalek H. H., 2009.** *J. Rad. Res. Appl. Sci.*, Vol. 2, p.p. 819–837.
- **Abdellatif F., Boudjella H., Zitouni A., Hassani A., 2014.** Chemical composition and antimicrobial activity of the essence oil from leaves of Algerian *Melissa officinalis* L. *EXCLI Journal*. Vol. 13, p.p. 772-781.
- **Abdellatif F. et Hassani A., 2015.** Chemical composition of the essential oil from leaves of *Melissa officinalis* extracted by hydrodistillation, steam distillation, organic solvent and microwave hydrodistillation. *J. Mater. Environ. Sci.* Vol. 6, n°1, p.p. 207-213.
- **Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras t. et Arsenakis M., 1998.** Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *Journal Agriculture Food Chemistry*, vol.46, n.6, p.p.1739-1747.
- **Adams R. P., 2007.** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry 4th edn. Allured Publ. Corp., Carol Stream.
- **AFNOR, 2000.** Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.
- **Alzouma L. 1995.** Connaissance et contrôle des Coléoptères Bruchidae ravageurs des légumineuses alimentaires au Sahel. *IPM* n°1, p.p. 4-10.
- **Amevoïn K., 1998.** Activités reproductrices et réponses comportementales de *Danarmus basalis* (ROND) et *Euplasmus vuilleti* (Craw) en présence de leur hôte *Callosobruchus maculatus* (FAB) EN ZONE GUINÉENNE AU Togo. Thèse doctorat .Togo. 152p.
- **Anders B., 2002.** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. University of Toronto, Canada, vol.13, n.2, p.p.184-196.
- **Anonyme 1 :** <https://www.zoom-nature.fr/la-criste-marine-une-ancienne-plante-alimentaire-a-redécouvrir/>.
- **Anonyme 2 :** <http://www.guide-phytosante.org/calmant-sedatif/melisse/>
- **Anonyme 3 :** <http://www.emaheu.com/pdf/Tribolium.pdf>
- **Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris, Lavoisier, 522p. (Technique et Documentation)
- **Antonelli A., Fabbri C., Boselli E., 1998.** *Food Chem.* Vol. 63, p.p. 485–489.

- **Aprotosoia A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V. and Stanescu U., 2010.** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits *Foeniculum vulgare* Mill. FARMACIA, vol. 58, n°1, p.p. 46-54.
- **Argyropoulos D. et Müller J., 2011.** Effect of convective drying on quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Procedia Food Science. Vol. 1 p.p. 1932-1939.
- **Babushok V. I., Linstrom P. J., Zenkevich I. G., 2011.** J. Phys. Chem. Ref. Data, vol. 40, p.p. 1-47.
- **Bachelot C., Blaise A., Corbel T. Le Guernic A., 2006. Les huiles essentielles. Licence 2 Biologie, Université Catholique de l'Ouest Bretagne Nord, France, 26p.**
- **Bachrouch O., Mediouni-Ben Jamâa J., Wissem A.W., Talou T., Marzouk B., Abderraba M. 2010.** Composition and insecticidal activity of essential oil from *Pistacia lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller et *Ephestia kuehmilla* Zeller (Lépidoptèra : Pyralidae). Journal of Stored Products Reaserch. Vol. 46, p.p. 242- 247.
- **Bahorun T., 1996.** Substances Naturelles Actives: La Flore Mauricienne. Une Source D'approvisionnement Potentielle. AMAS. Food and Agricultural Research Council. Réduit Mauritius.
- **Balachowsky, A.S., 1962.** Traité d'entomologie Appliquée à l'Agriculture : Coléoptères. Tome 1. 1. Paris Masson et Cie Editions. N°17, p.p. 338-548.
- **Barros L., Heleno S.A., Carvalho A.M. et Ferreiro I., 2010.** Lamiaceae often used in portuguese folk medicine as a source of powerfull antioxidants : vitamins and phenolics. LWT. Vol. 43, p.p. 544-550.
- **Barry N., 2001.** Art d'extraire les huiles essentielles. De parfum à faire sois même, p.p. 125-128. In **Belaagoune S. et Himed L. 2007.** Etude de l'activité antioxydant d'une huile essentielle de *Schinus molle*. Mémoire d'Ingéniorat. INATAA, Université Constantine. 57p.
- **Bartosz G., 2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology. Vol.9, p.p.5-21.
- **Baser K.H.C., Ozek T., Demirci B. et Saritas Y., 2000.** Essential oil of *Crithmum maritimum* L. from Turkey. Journal of Essential Oil Research. Vol. 12, n°4, p.p. 424-426.
- **Belaiche P., 1979.** L'aromatogramme : traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1. M. S. A. Editeur, Paris, 204p.
- **Belyagoubi L., 2006.** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid, 110 p.



- **Benchabane O., Hazzit M., Baaliouamer A. & Mouhouche F., 2012.** Analysis and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Ferula vesceritensis* Coss. et Dur. and *Thymus munbyanus* Desf. Journal of Essential Oil Bearing Plants. Vol. 15, n° 5, p.p. 774 – 781.
- **Benchabane O., Hazzit M., Mouhouche F., Baaliouamer A., 2015.** Arab. J. Sci. Eng. Vol 40, p.p. 1855–1865.
- **Benhabiles N.E., 1995.** Comparaisons des huiles essentielles de deux espèces Algériennes de romarin : extraction et étude analytique. Thèse magister, ENP, Alger.
- **Benini C., 2007.** Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux, 109 p.
- **Bennett J V., Brodie J.L., Benner E.J., Kirby W.M.M., 1966.** Simplified accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Application of Microbiology, vol.14, p.p.170-177.
- **Benzeggouta N., 2005.** Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Mémoire de magister, Université de Constantine, Algérie, 110 p.
- **Berlette B.S., Stadtman E.R., 1997.** Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 272: 20313-20316.
- **Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie : information chimie, n.298, p.p.179-184.
- **Berthod A., Carda-Broch S. & Garcia-Alvarez-Coque, M. C., 1999.** Hydrophobicity of ionizable compounds. A theoretical study and measurements of diuretic Octanol– water partition coefficients by countercurrent chromatography. *Analytical Chemistry*, vol. 71, n°4, p.p. 879-888.
- **Besombes C., 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289 p.
- **Beta T., Nam S., Dexter J. E. & Sapirstein H. D., 2005.** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, vol. 82, n°4, p.p. 390-393.
- **Bidet D., Gagnault J. C., Girard P., & Trotin F., 1987.** Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*, p.p. 89-97.
- **Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G., 1993.** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants. *Flav. Frag.*, vol.8, p.p.331-337.

- **Birt D.F., Hendrich S., Wang W. 2001.** Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics*.vol.90, p.p.157-177.
- **Blakeway J., Salerno M., 1987.** Pour la science. Institut des renseignements scientifiques et techniques, Paris.
- **Bouchiki T., 1994.** Activités antimicrobiennes de quelques huiles essentielles. Thèse de doctorat, université Blaise Pascal, Clermont Ferrand.
- **Bouchra C., Achouri M., Idris si hassani L.M. et Hmamouchi M., 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 89, P. 165-169.
- **Boullard B., 2001.** Dictionnaire des plantes médicinales du monde, Réalités et croyances. Editions Estem.
- **Bourgeois C. M., Mescle J. F. et Zucca J., 1996.** Microbiologie alimentaire: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed. Tee. et Doc., Paris. 672 p. (Sciences et techniques agroalimentaires).
- **Bowles B.L., Sackitey S.K., Williams A.C., 1995.** Inhibitory effects of flavour compounds on *Staphylococcus aureus* WRRC B124. *L Food Saf.*, vol. 15, p.p.337-347.
- **Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S., McAnalley B., 2003.** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition*. vol.4, n.6, 7p.
- **Bruneton J., 1987.** Eléments de phytochimie et de phannacognoise. Ed. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris, 585p.
- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinale. Paris, Lavoisier, 623p. (Technique et documentation)
- **Bruneton J., 1995.** Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris, Lavoisier, 915p. (Technique et Documentation).
- **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinale. Paris, Lavoisier, 585p. (Technique et documentation).
- **Bruneton, J., 2009.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales, 4 e éd. Tec & Doc/Lavoisier, Paris, p.p. 279-281.
- **Burits M., Bucar F., 2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. Vol. 14, p.p. 323-328.
- **Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, p.p.223–253.
- **Camel V., 2000.** Trends in Anal. Chem. Vol 19, n°4, 229.

- **Canillac N., Mourey A. 1996.** Comportement de l'Esteria en présence de l'HE de sapin et de pin. Sei. Aliments, vol.16, p.p.403-411.
- **Capon M., Courilleau V. et Valette C., 1993.** Chimie des couleurs et des odeurs. Ed. Cultures et techniques, Nantes. 255 P. (Formation).
- **Carvalho de Soussa A., Sales Alviano D., Fitzgerald Blank A., Barreto Alves P., Sales Alviano C. et Rocha Gattass C., 2004.** Melissa officinalis L. essential oil : antitumoral and antioxidant activities. Journal of Pharmacy and Pharmacology. Vol. 56, p.p. 677-681.
- **Caswell G.H., 1961,** The infestation of cowpea in the western region of Nigeria. Trop Sci., 154p.
- **Chao S. C., Young D. G., Oberg G.J., 2000.** Screening for inhibitory activity of Essential Oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. J. Essent. Oil Res., vol.12, p.p. 639-649.
- **Chowdhury J.U., Mobarok H. Bhuiyan N.I. and Nandi N.C., 2009.** Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated in bangladesh. Bangladesh. J. Bot. vol. 38, n°2, p.p.181-183.
- **Collin S. & Crouzet J., 2011.** Polyphénols et procédés: transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Lavoisier.
- **Cowan M.M., 1999.** Plant products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, vol.12, n°4, p.p. 564-582.
- **Cox S. D. et Mann C. M., 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Journal of Applied Microbiology, Vol. 88, n.1, p.p.170-175.
- **Crus J. F., Troud F., Griffon D. et Hebert J. P., 1988.** Conservation des grains en régions chaudes. 2 Ed- « Technique rurales en Afrique ».Ed. CEEMAT ; Paris, 545p.
- **Cuendet M., Hostettmann K., Potterat O., & Dyatmiko W., 1997.** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. Helvetica Chimica Acta, vol. 80, n°4, p.p. 1144-1152.
- **Das N.P., Pereira T.A., 1994.** Effects of flavonoids on thermal autooxidant of palm oil: structure–activity relationship. J. American Oil Chemists Society. vol. 67, p.p. 255-258.
- **Dastmalchi K., Dorman D.H.J., Laakso I. et Hiltunen R., 2007.** Chemical composition and antioxidant activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. LWT Food Science and Technology. Vol. 40, n°9, p.p. 1655-1663.
- **De Oliveira S., De Souza G.A., Eckeret C.R., 2014.** Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. Quimica Nova, vol. 37, n° 3.

- **Deans S.G. et Ritchie G., 1987.** Antimicrobial proprieties of plants essential oils. Journal of food microbiology, vol. 5, p.p.165-180.
- **Decker E.A., Xu Z., 1998.** Minimising ranciditu in miscle food. Food technology, vol. 52, p.p.54-61.
- **Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G., 2002.** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology. Vol. 74, p.p. 101-109.
- **Delaveau P., Lorrain M., Mortier F., Rivolier C., Rivolier J., Schweitzer R., 1977.** Secrets et vertus des plantes médicinales. Sélection du Reader's Digest's 2<sup>é</sup> Ed., 196 p.
- **Delgado T., Marinero P., Asensio C., Manzenera S., Herrero B., Pereira J.A. et Ramalhosa S., 2014.** Antioxidant activity of twenty wild Spanish *Thymus mastichina* L. populations and its relation with their Chemical composition. Food Science and Technology. Vol. 57, p.p. 412-418.
- **Delobel A. et Tran M., 1993.** Les coléoptères des denrées alimentaires entreposés dans les régions chaudes. Ed. ORSTOM Paris 25p.
- **Didry N., Pinkas M. et Torck M., 1982.** Sur la composition et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de grindellia. P1. Med. Phytother, vol.26, p.p. 7-15.
- **Dormans H. J. Deans S J., 2000.** Antimicrobial agent from plants: antibacterial activity of plants volatil oils. J. ofappl. Microbial. vo1.88, pp. 308-316.
- **Dossevi L. M. et Essou J. P., 2011.** Utilisation de quelques plantes médicinales en alimentation humaine et/ou animale au Sud Benin. *Journal de la Recherche Scientifique de l'Université de Lome*, 13 (1).
- **Dubey S., Devra V., Binyahia A.R., Sharma P.D., 2000.** Kinetics and mechanism of oxidation of formic acid by bismuth(V) in aqueous phosphoric acid medium. International Journal of Chemical Kinetics. Vol.32, p.p. 491-497.
- **Dubois G.E., Grosby G.A. et Saffron P., 1977.** Non Nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. Science, vol. 195, p.p. 397-399.
- **Dukic N.M., Bozin B., Sokovic M. et Simin N., 2004.** Antimicrobial and antioxidant activities of (Lamiaceae) essential oil. J. Agri. Food Chem, vol. 52, p.p. 2485-2489.
- **Ela M.A., El-shaer N.S., et Ghanem N.B., 1996.** Antimicrobial evaluation and chromatographie analysis of some essential and fixed oils. Pharmazie, Vol. 51, p.p. 993 - 995.

- **Enan E., 2000.** Insecticidal activity of essential oils : octopaminergic sites of action. Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology. Vol. 130, p.p. 325- 337.
- **Enan E. E., 2005.** Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, vol. 59, n°3, p.p. 161-171.
- **Eymard R., 2003.** Mise en evidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservatio et de la transformatio du chinchard (*Trachurus trachurus*): choix des procedes. These Doctorat, Universite de Nante, France.
- **Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z., 1986.** Bulletin de l'organisation mondiale de la santé. Vol. 64, n° 2, p.p. 159-175.
- **Fatemi F., Dini S., Bagher Rezaei M., Dadkhah A.; Dabbagh R., Najj S., 2014.** J. Essent. Oil Res. Vol. 26, p.p. 97–104.
- **Fatemi F., Dini S., Dadkhah A., Zolfaghari R., Mohammad R., 2015.** Phys. Chem., vol.106, p.p. 145–150.
- **Fatemi F., Dini S., Rezaei M.B., Dadkhah A., Debbagh R. et Najj S., 2014.** The esffect of  $\gamma$  irradiation on the Chemical composition and antioxidant activities of peppermint essential oil and extract. Journal of Essential oil Research. Vol. 26, n°2, p.p. 97-104.
- **Fauchère J. L. et Avril J.L., 2002.** Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipses, Paris. 365 P.
- **Favier A., 2003.** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique. p.p.108-115.
- **Feng W. et Zheng X., 2007.** Essential oils to control *Alternaria alternaria in vitro* and in vivo. Food Control, Vol. 18, p.p. 1126-1130.
- **Finney D. J., 1971.** Probit analysis, Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- **Fox C.W., 1994,** The influence of egg size on offspring performance in the seed beetle. *Callosobruchus maculatus*. Oikos, Vol. 71, p.p. 321-325.
- **Franchomme P., Penoel D., 1990.** Matières médicale aromatique fondamentale. L'aromathérapie exactement, N°4, p.p. 317-446.
- **Garneau F-X., 2005.** Le matériel végétal et les huiles essentielles. Huiles essentielles: de la plante à la commercialisation. Manuel pratique : Ed. Corporation la seve. Universite de Chicoutimi, Québec.
- **Garnéro J., 1991.** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France, p.p. 2-20.

- **Garnero J., 1996.** Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, p.p.1-45.
- **Generalić Mekinić I., Blažević I., Mudnić I., Burčul F., Grga M., Skroza D., Jerčić I., Ljubenković I., Boban M., Miloš M. and Katalinić V., 2016.** Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.): phytochemical profile, antioxidative, cholinesterase inhibitory and vasodilatory activity. J Food Sci Technol. Vol. 53, n°7, p.p. 3104–3112.
- **Ghedira K., 2005.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. Phytothérapie. Vol.4, p.p.162-169.
- **Ghrib A., 1995.** Etude comparative des huiles essentielles de menthe poussant en Algérie. Thèse de magister, chimie organique, USTHB.
- **Giamperi I., Fraternele D., 2002. Ricci D., 2002.** The invitro action of essential oils on different organisms. Journal of essential oil Research Journal of the American Oil Chemists Society. vol.55, p.p.312-318
- **Glitho T.A., Nuto Y., Attoh A., Sambena B., et Kounnou K., 1988.** Ecologie et Biologie de la reproduction des Bruchidae parasites de légumineuses alimentaires cultivées au Togo et au Bénin. Rapport ABN (Biosciences), Lomé., 81p.
- **González M.J., Marioli J.M., 2010.** Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology. Article in press, 5p.
- **Grieve M., 1931.** A modern herbal, Vol. 2. A modern herbal, Vol. 2.
- **Guenther E., 1972.** The essential oils. New York, Ed Robert Krieger publishing co. Vol.3.
- **Guiraud J.P., 2003.** Microbiologie Alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 652 P.
- **Gustane F., Norris F., 1983.** In: lipids in Food- Chemistry. Biochemistry and Technology Pergamon Press, p.p.161-165.
- **Hadi M., 2004.** La quercétine et ces dérivés : molécule à caractères pro oxydant ou capteur de radicaux libres ; étude et application thérapeutiques. Thèse de doctorat, Université de Louis Pasteur, domaine : Pharmacochimie, 155p.
- **Hahlbrok K., Scheel D., 1989.** « Physiology and Molecular Biology of phenylpropanoid Metabolism », Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology. Vol. 40, p.p. 347-369.
- **Hale A.L., 2003.** Screening potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible compounds and differentiating Russet Norkotah Stains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. Ed Office of Graduate Studies of Texas A&M University. 260 P.

- **Halliwell, B., Whiteman, M., 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. vol. 142, p.p.31-2.
- **Hallman, P.C.H., J.B., De Vries Van Leeuwen S.D., Mengelers, J.H.M., Katan, M.B. Katan, M.B., 1995.** Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of clinical Nutrition*. Vol. 62, p.p. 1276-1282.
- **Hallman, P.C.H., Trijp, L.M.P., Buysman, M.N.C.P., Gaag, M.S., Mengelers, J.B., De Vries, J.H.M., Katan, M.B., 1997.** Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*. Vol.418, p.p. 152-156.
- **Haraguchi H., Mochida Y., Sakai S., Masuda H., Tamura Y., Mizutani, K. & Chou W. H., 1996.** Protection against oxidative damage by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 60, n°6, p.p. 945-948.
- **Harborne J. et Baxter H., 1993.** *Phytochemical dictionary, hand book of bioactive compounds from plants*. Taylor et Francis, London, Washington.
- **Harikrishna D., Appa Rao A.V.N. et Probhakar M.C., 2004.** Pharmacological investigation of prunigen-6''-o-p-coumarate: A Flavonoids glycoside. *Indian J Pharmacol*, vol. 36, n°4, p.p. 244-250.
- **Hayase F. et Kato M., 1984.** Antioxidant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci. Vitaminol*, vol. 30, p.p. 37-46.
- **Hayons J.C., 2007.** *Les plantes qui nous soignent, Traditions et thérapeutique*. Editions ouest France, p.p. 22-23
- **Hayouni E.A., 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 extract. *Food Chemistry*. Vol. 105, n°3, p.p. 1126-1134.
- **Hazzit M., 2008.** Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de thym et d'origan poussant en Algérie. Thèse de Doctorat, USTHB, Alger, 204p.
- **Hazzit M., Baaliouamer A. J., 2009<sup>a</sup>.** Variation of Essential oil yield and composition of *Thymus palleescens* de Noé. *J. Essent. Oil Res*. Vol. 21, p.p. 162–165.
- **Hazzit M., Baaliouamer A. J., 2009<sup>b</sup>.** *J. Essent. Oil Res*. Vol. 21, p.p. 267–270.
- **Hazzit M., Baaliouamer A., Verissimo A.R., Faleiro M.L. et Miguel M.G., 2009.** Chemical composition and Biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chem.*, vol. 116, p.p. 714-721.



- **Heim E.K., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol.13, p.p. 572-584.
- **Hellal Z., 2001.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magister en biologie, université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 120p.
- **Henandez Ochoa L.R., 2005.** Substitution de solvants et matières activés de synthèse par combiné « Solvants (Actif) d'origine végétale ». Thèse de doctorat en sciences des agroagresseurs. Institut National polytechnique de Toulouse. 224p.
- **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.
- **Homburger F. & Boger E., 1968.** The carcinogenicity of essential oils, flavors, and spices: a review. *Cancer research*, vol. 28, n°11, p.p. 2372-2374.
- **Horváthová J., Suhaj M., Polovka M., Brezová V., Šimko P., Czech J., 2007.** *Food Sci.*, Vol. 25, p.p. 131–143.
- **Houghton P.J., Ren Y., Howes M.J., 2006.** Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*. Vol. 23, p.p. 181– 199.
- **Houta O., Akrouit A., Najja H., Neffati M. et Amri H., 2015.** Chemical composition, Antioxidant and antimicrobial Activities of essential oil from *Crithmum maritimum* cultivated in Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Vol. 18, n°6, p.p. 1459-1466.
- **Hulin V., Mathot A.G., Mafart P., et Dufosse L., 1998.** Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des aliments*, vol.18, p.p. 563-582.
- **Hussain A. I., Anwar F., Sherazi S. T. H. & Przybylski R., 2008.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry*, vol. 108, n°3, p.p. 986-995.
- **Hyldgaard M., Mygind T. et Meyer R.L., 2012.** Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. Vol.3, p.p. 1-12.
- **Ishii K., Furuta T., Kasuya Y., 2003.** High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*. vol.749, p.p.49-56.
- **Isman, 2000.** Plant essential oils for pest and disease manegement. *Crop Protection*. Vol. 19, p.p. 603-608.



- **ISO 1997.** Norme ISO 9235 : Matières premières d'origine naturelle -Vocabulaire, 2p.
- **Jalal Zineb, El Atki Yassine, Lyoussi Badiiaa, Abdellaoui Abdelfattah, 2015.**  
Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in marocco : preventive approach against nosocomial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol. 5, n°6, p.p. 458-461.
- **Jalsenjak, V., Peljnajak, S., Kustrak, D., 1987.** Microcapsules of sage oil, essential oils content and antimicrobial activity. *Pharmazie*, vol. 42, p.p. 419-420.
- **Jay J.M., Rivers G.M. 1984.** Antimicrobial activity of some food flavouring compounds. *J. Food saf.* vol.6, p.p. 129-139.
- **Jouault S., 2012.** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et leur toxicité. Thèse de doctorat d'Etat en pharmacie. Université de Lorraine. Faculté de pharmacie. France.137p.
- **Jung T., Bader N., Grune T., 2007.** Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.vol.462, p.p.231-237.
- **Kasrati A., Alaoui Jamali C., Bekkouche K., Wohlmuth H., Leach D., Abbad A., 2015.** *J. Food Sci. Technol.* Vol. 52, p.p. 2312–2319.
- **Keane S., Ryan M. F., 1999.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* Vol. 29, p.p.1097-1104.
- **Khater K. S. et El Shafiey S.N., 2015.** Insecticidal effect of essential oils from two aromatic plants against *Tribolium castaneum* (Herbst), (Coleoptera : Tenebrionidae). *Egyptian Journal of pest control*. Vol. 25, n°1, p.p. 129-134.
- **Kim B. H., Ikeda T., Park H. S., Kim H. J., Hyun M. S., Kano K. & Tatsumi H., 1999.** Electrochemical activity of an Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *Biotechnology Techniques*, vol. 13, n°7, p.p. 475-478.
- **Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A. Preston J.F., Wei C.I., 1995.** Antimicrobial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium andon fish cubes.*J. Food Sci.*, vol.60, p.p.1364-1374.
- **Kimbaris A.C., Siatis N.G., Daferata D.J., Tarantilis P.A., Pappas C.S., Polissiou M.G.,** *Ultrasonics Sonochem.* 2006, vol. 13, p.p.54-60.
- **Kivrak I., Duru M.E., Öztürk M., Mercan N., Harmandar M., Topçu G., 2009.** Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*. Vol. 116, p.p. 470-479.
- **Klaus W., Wilhelm G., 1990.** *Dtsch. Lebensm. Rundsch*, 344 p.

- **Kocchilin-Ramonatxo, 2006.** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*. vol. 20, p.p.165-177.
- **Kohen R., Nyska A., 2002.** Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*. Vol.30, p.p. 620-650.
- **Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M., Mete E. E., 2008.** *Bioresour. Technol.* Vol. 99, p.p. 8788–8795.
- **Koskas J.P, Cillard J., Cillard P., 1983.** Direct high-performance liquid chromatographic separation of hydro-peroxide isomers of linoleic acid. *Journal of Chromatography A*. Vol. 258, p.p. 280-283.
- **Kostyukovsky M., Rafaeli A., Gileadi C., Demchenko N., Shaaya E., 2002.** *Pest Manag. Sci.* Vol. 58, p.p. 1101-1106.
- **Krief S., 2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (*Pantroglydotes schweinfurthii*) en Ouganda. Muséum National d'Histoire Naturelle. Thèse de doctorat.
- **Kulusic-Bilusic T., Blazevic I., Milos M., Pifat G., 2010.** *Journal Food Biochemistry*. Vol. 34, p.p. 354-358.
- **Kurkin V. A., 2003.** *Chem. Nat. Compd.* 39 p.
- **Lahlou M., 2004.** Methods to Study Phytochemistry and Biodiversity of essential oils. *Phytothérapie Research*, vol. 18, p.p. 435-448.
- **Lamaison, J. L. C., & Carnet, A., 1990.** Contents in main flavonoid compounds of *Crataegus monogyna* Jacq. and *Crataegus laevigata* (Poiret) DC flowers at different development stages. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, vol. 65, n°1, p.p. 315-320.
- **Lambert R. J. W., 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*, vol. 91, n.3, p.p.453-462.
- **Larousse Encyclopédie des Plantes Médicinales, 2001.** Identification, préparations, soins, Paris, 335p.
- **Larson A.O., 1924.** The effect of weevily Seed beans upon the bean trop an upon the dissemination of weeoils *Bruchus obtectus* SAY an *B. quadrimaculatus* FAB. *J.EC.ENT.* I\_11.
- **Leclerc H., Gaillard J. L., Simonet M., 1995.** *Microbiologie générale: La bactérie et le monde bactérien*. Ed. Doin, Paris. 535 p.

- **Lee Y.J., Erdos, G., Hou Z., Kim, S.H., Kim J.H., Cho J.M., Corry P.M., 1994.** Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. vol.137, p.p. 141-154.
- **Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. vol. 30, p.p. 1076-1081.
- **Lepesme P., 1944** - Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels entreposés. Ed. P. Le chevalier, Paris, p.p. 61 - 67.
- **Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Jiang Y., 2007.**Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*. vol.102, p.p.771-776.
- **Lien E.J., Ren S., Bui H.H., Wang R., 1999.** Quantitative structure activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, n°3-4, p.p. 285-294.
- **Loubaki B.C., Ouattara A.s., Ouattara C.A.T., Ouedraogo/Traore R., Traore A.S., 1999.** Activités antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de *Detarium microcarpum* [*Cesalpinaceae* (Guill et Perr)] sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies infectieuses au Burkina Faso. *Rev. CAMES - Série A*, vol.1, p.p.66-73.
- **Lucchesi M.E., Chemet F., Smadja J., 2000.** *Journal of Chromatography*. Vol. 1043, p.p. 323-237.
- **Lugasi A., Havoris J., Sagi K. V. et Biro L., 2003.** The Role of Antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, vol.47, n°1, p.p. 119-125.
- **Luque De Castro M.D., Jimenez Carmona M.M., Ferandez Paréz V., 1999.** *Trends Anal. Chem.*, vol. 18, 708 P.
- **López M., Jordán M., Pascual-Villalobos M. J., 2008.** *Stored Prod. Res.* Vol. 44, p.p. 273-278.
- **Maffeur & Sacco, 1987.** *Perfumer and flavorist*. vol. 13, n° 5, 61 p. In Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle, 289 p.
- **Mahmoudi R., Amini K., Hosseinirad H., Valizadeh S., Kabudari A. et Aali E., 2017.** Phytochemistry and Insecticidal effect of different parts of *Melissa officinalis* on *Tetranychus urticae*. *Research Journal of Pharmacognosy*. Vol. 4, n°4, p.p. 49-56.
- **Mallamaire A., 1962.** Les ennemis animaux des plantes cultivées en Afrique Occidentale.

- **Marfak A., 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes : Etude de leurs réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. Thèse de Doctorat de l'Université Limoge, p.p. 24-42.
- **Martínez-Cayuela, 1995.** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* vol.77, p.p. 147-161.
- **Marzoukia H., Elaissib A., Khaldic A., Bouzidd S., Falconerie D., Marongiu B., Pirasa A. and Porcedda S., 2009.** Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*, vol. 2; p.p. 86-91.
- **Maydani M<sup>a</sup>., 2000.** Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am J Clin Nutr.*,vol. 71, p.p.1665- 1668.
- **Mc Vicar J., 2006.** Le grand livre des herbes. Ed France Loisir, de Borée, p.p.192-193
- **Meena M.R., Setid V., 1994.** Antimicrobial of essential oils from spices. *J Food.SCI. And tech. Mysore*, vol.31, p.p.68-70.
- **Meftahizade H., Saragsyan E. et Moradkhani H., 2010.** Investigation of antioxidant capacity of *Melissa officinalis* L. essential oils. *Journal of Medicinal plant Research.* Vol. 4, n°14, p.p. 1391-1395.
- **Meot-Duros L., Le Floch G.et Magne C., 2008.** *J Ethnopharmacology.* Vol. 116, n°2, p.p. 258-262.
- **Mitsuda H., Yasumoto K., Iwami K., 1966.** Antioxidative action of indole compounds during the oxidative of linoleic acid. *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.*, vol.19, p.p. 210-214.
- **Miyazawa K., Shimomura T., Naka D. & Kitamura N., 1994.** Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, n°12, p.p. 8966-8970.
- **Mohammad S., Abu-Darwish and Abu-Dieyh Z.H.M., 2009.** Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 11, n° 1, p.p.59-63.
- **Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155 P.
- **Moharramipour S. Taghizadeh A., Meshkatalasadat M.H., Talebi A.A., Fathipoor Y., 2008.** *Commun Agric. Appl. Biol. Sci.* Vol. 73, 639p.
- **Moleyar V., Narasimham P., 1992.** Antimicrobial activity of essential oils components.*Int.Food. Microbial.* vol.16, p.p. 337-342.

- **Moll M., Moll N., 1998.** Les additifs alimentaires et auxiliaires technologiques. Ed. Dunod, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, Technique et Ingénierie, série Agro-alimentaire.
- **Moore P. S., Pizza C., 1992.** Observations on the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by catechins. *Biochemical Journal*, vol.288, p.p.717-719.
- **Moosavy M.H., Basti A.A., Misaghi A., ZahraeiSalehi T., Abbasifar R., Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Alipour M., EmamiRazavi N., Gandomi H., Noori N., 2008.** *Food Res. Int.* Vol. 41, p.p.1050–1057.
- **Morel Y., Barouki R., 1999.** Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* vol.342, n.3, p.p. 481- 496.
- **Nabet N., 2017.** Analyses phyto-chimiques et activités biologiques des huiles essentielles et des extraits polyphénoliques de trois plantes médicinales Algériennes (*Crithmum maritimum*, *Origanum glandulosum* et *Thymus fantanesii*). Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Béjaia. 166p.
- **Nacoulma O. G., 1996.** Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso: cas du Plateau central. Thèse de Doctorat d'État. Université de Ouagadougou, Burkina Faso. Tome I et II. 581 p.
- **Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K. & Someya T., 1985.** A study of the phototoxicity of lemon oil. *Archives of dermatological research*, vol. 278 ; n°1, p.p. 31-36.
- **Nakagawa K., Kawagol M., Yoshimura M., Arata H., Minamikawa T., Nakamura M. et Matsumoto A., 2000.** Differential effects of Flavonoid Quercetin on oxidative Damage induced by hydrophilic and lipophilic redical generators in Hepatic lysosomal fractions of Mice. *Journal of Health Science.* Vol. 46, n°6, p.p. 509-512.
- **Nakamura H., Hasegawa M., Nomura Y., Arikawa Y., Matsukawa R., Ikebukuro K. & Karube I., 1999.** Development of a highly sensitive chemiluminescence flow-injection analysis sensor for phosphate-ion detection using maltose phosphorylase. *Journal of biotechnology*, vol. 75, n°2-3, p.p. 127-133.
- **Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishina D.R., 2001.** Bioflavonoids classification pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential *Indian Journal of Pharmacology.* Vol. 33, p.p. 1-16.
- **Naves Y.R. 1974.** Qu'est ce qu'une huile essentielle. Ed. Masson, Paris.
- **Negahban M. et Moharramipour S., 2007.** Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects in *Journal Stored Products Research*, n°43, p.p.123–128.

- **Ngamo L. et Hance T.H., 2007.** Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical, in *Tropicultura*, vol 25, n°4, p.p.215-220.
- **Nguefack J., Leth V., Zollo P. A. & Mathur S. B., 2004.** Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, n°3, p.p. 329-334.
- **Nguir A., Besbes M., Ben Jannet H., Flamini G., Harzallah-Skhiri F. et Hamza M.A., 2011.** Chemical Composition, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase activities of Tunisian *Crithmum maritimum* L. Essential Oils. *Mediterranean Journal of Chemistry*. Vol. 1, n°4, p.p. 173-179.
- **Nikhat F., Satynarayana D. & Subhramanyam E. V. S., 2009.** Isolation, charectrisation and screening of antioxidant activity of the roots of *Syzygiumcumini* (L) Skeel. *Asian Journal of Research in Chemistry*, vol. 2, n°2, p.p. 218-221.
- **Novelli G.P., 1997.** Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol.* vol.48, p.p.517- 527.
- **Nyamador W., 2009.** Influence des traitements à base de l'huile essentielles sur les capacités de reproduction de *Callosobruchus subinnotatus* Pic. et de *Callosobruchus maculatus* F. (Coléoptera: Bruchidae): Mécanisme d'action de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* Chiov. Thèse de Doctorat. de l'Université de Lomé. 177p.
- **Odoul M., 2003.** Les huiles essentielles. La lettre de l'Institut français de Shiatsu, n.2, p.p.1-12.
- **Okamura H., Mimura A., Yakou Y., Niwano M. et Takahara Y., 1993.** Antioxidant activity of Tannins and Flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochem.* Vol. 33, p.p. 557-561.
- **Okuda T., Kimura Y., Yoshida T., Hatano T., Okuda H. et Arichi S., 1983.** Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondric and microsome of liver. *Chem. Pharm. Bull.* Vol.31, p.p. 1625-1631.
- **Olle M. et Bender I., 2010.** The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*, vol.8, n°3, p.p. 687-696.
- **Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. et Naghdibadi H., 2007.** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, Article in press.
- **OMS, 1999.** Sécurité sanitaire des denrées alimentaires irradiées, rapport du Comité mixte d'experts FAO/AIEA/OMS, rapport technique 659, OMS, Genève, 1981 ; Salubrité et qualité nutritionnelle des aliments irradiés, OMS, Genève, 1994 ; rapport du groupe

d'étude mixte FAO/AIEA/OMS, Rapport technique 890 OMS. Genève, 1999 (CODEX STAN 106-1983, REV. 1-2003). Ionisation à dose élevée : Salubrité des aliments ionisés à des doses supérieures à 10kGy.

- **OMS, 1997.** Rapport sur la santé dans le monde, vaincre la souffrance, enrichir l'humanité. Organisation Mondiale de la Santé. Genève. 166p.
- **Onawunmi G. O., Yisak W. A. & Ogunlana E. O., 1984.** Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 12, n°3, p.p. 279-286.
- **Ouamba J.M., 1991.** Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo. Extraction et analyse des huiles essentielles Oximation des aldéhydes naturels. Mémoire de magister. Université Montpellier II, 342 P.
- **Ouederago A.P., Sou S., Sanon A., Monge J P., Huignard J., Tram M.D et Credland P.F., 1996.** Influence of temperature and humidité on population of *C. m* (col:Bruchidae) and its Parasitoid *pinaramus basalis* (pteromalidae) in two zones of Burkina Faso. *Bull. of Entom. Res.*, vol. 86, p.p. 695 -702.
- **Ouedrigo A.P., 1996.** Le déterminisme du poly morphisme imaginal chez *Callosobruchus maculatus* (Fab.), Loleoptère Bruchidae. Importance des facteurs climatiques sur l'évolution des populations de ce Bruchidae dans un système expérimental de stockage des graines de *vigna unguiculata* (Walp). Thèse de doctorat d'Etat, 117p.
- **Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M., 2006.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, Article in press.
- **Oyaizu M., 1986.** Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, vol. 44, n°6, p.p. 307-315.
- **Ozkan G., Sagdic O., Baydar N.G. et Baydar H., 2003.** Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Science and Technology International*, vol.9, n.2, p.p.85-88.
- **Paré J.R.J. 1992,** CA Pat.2055 390 P.
- **Paris R., Godon M., 1979.** Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.
- **Pavela R.2005.** Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia*. Vol. 76, p.p. 691-696.
- **Pellerin P., 2001.** Extraction par CO<sub>2</sub> a l'état super critique. *Annales des falsifications et de l'Expertise de Chimique*, vol.94, p.p.51-62.



- **Penhev P.I., 2010.** Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basse et haute pression. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Toulouse, 229p.
- **Perfumer & Flavorist 2009.** A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, vol. 34. In Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010. Handbook.
- **Perry J., Staley J., Lory S., 2004.** Microbiologie. Collection : Sciences Sup, Dunod, 912p.
- **Philogene B.J.R., 2008.** Action synergique des composés d'origine végétale in Biopesticides d'origine végétales. Tec & Doc éd., Paris, pp. 277- 286.
- **Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Ecole Polytechniques Fédéral, Lausanne, 161p.
- **Pietta P.G., 2000.** Flavonoïds as antioxidants. Journal of Natural Products, vol.63, p.p. 1035-1042.
- **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O., 2002.** Physiological action of antioxidant defences. Nutrition Clinique et Métabolisme. vol.16, p.p. 233-239.
- **Pokorny J., Yanishlieva N. & Gordon M. H., 2001.** Antioxidants in food: practical applications. CRC press.
- **Polatoglu K., Karakoç O.C., Yucel Y.Y., Gucl S., Demirci B., Baser K.H.C., Demirci F., 2016.** Insecticidal activity of edible *Crithmum maritimum* L. essential oil against Coleopteran and lepidopteran insects. Industrial Crops and Products. Vol. 89, p.p. 383-389.
- **Popova A., Dalemska Z., Mihaylova D, Hristova I., Alexieva I., 2016.** *Melissa officinalis* L.- GC Profile and Antioxidante Activity. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. Vol.8, n°4, p.p. 634-638
- **Pradeau D. et Cohen Y., 1992.** L'analyse protéique du médicament. Ed. médicales internationales, p.p. 418-428.
- **Proctor D.L., 1995.** Techniques d'emmagasinage des grains: évoluer et tendances dans les pays en développement. Bull. F.A.O. N° 109, 24p.
- **Psotová J., Lasovsky J. et Vicar J., 2003.** Metal-Chelating properties, Electrochemical Behavior, scavenging and Cytoprotective Activities of six Natural Phenolics. Biomed. Papers. N° 147, vol. 2, p.p. 147-153.
- **Quezel P., Santa S. et Shotter O., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 1170 p.



- **Ramos M., Jiménez A., Peltzer M., Garrigós M.C., 2012.** J. Food Eng. Vol. 109, p.p. 513–519.
- **Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P., 2010.** J. Biosci. Bioeng., vol. 110, p.p. 614–619.
- **Ravn H., Andary C., Kavacs G. et Molgaard P., 1984.** Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. Biochem. Syst. Ecol. Vol.17, p.p. 175-184.
- **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala, A., Yang M., & Rice-Evans C., 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine, vol. 26, n° 9-10, p.p. 1231-1237.
- **Rees S.B. et Harborne J.B., 1985.** The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. Phytochem. Vol.24, p.p. 2225-2231.
- **Regnault –Roger C., 2008.** Biopesticides d’origine végétales, 2éd., Tec & Doc éd., Paris, 496p.
- **Regnault-Roger C. et Hamraoui A., 1995.** Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a Bruchidof kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L). Journal of Stored Products Research vol. 31, p.p. 291-299.
- **Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Ribereau-Gayon P., Sudraud P., 1968.** Analyse et contrôle des vons. Tome 1. In Sciences et Techniques du vin : traité d’œnologie. Paris : Dunos.
- **Richard H. et Multon J. L., 1992.** Epices et aromates. Paris, Lavoisier, 339p. (Technique et Documentation).
- **Roeding-Penman A., Gordon M.H., 1998.** Antioxydant proprieties of Myricetin and Quercetine in oil and emulsions. Journal of amerivan oil chemist’s society, vol.75, p.p.169-180
- **Rombi M., 1991.** 100 plantes médicinales : composition, mode d’action et intérêt thérapeutiques. Ed. Romart, p.p. 183-185.
- **Ronat N., 2001.** La Mélisse (*Melissa officinalis* L.). Thèse de Doctorat. Université Joseph Fourier, Faculté de pharmacie de Grenoble, 99 p.
- **Rouessac F. et Rouessac A., 1995.** Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes. Ed. Masson, Paris.
- **Roux D. et Cartier O., 2007.** « Botanique pharmacognosie phytothérapie ». 3émé éd. Porphyre. Vol. 13.

- **Ruberto G. et Baratta M.T., 2000.** Antioxidant activity of selected components in two lipid model systems. *Food Chem.* Vol. 74, p.p. 167-169.
- **Saei Dehkordi S.S., Tajik H., Moradi M., Khalighi Sigaroodi F., 2010.** *Food Chem. Toxicol.* Vol. 48, p.p. 1562–1567.
- **Saidia B. & Hammond E. G., 1989.** Quantification of carbonyls produced by the decomposition of hydroperoxides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 66, n°8, p.p. 1097-1102.
- **Sallé J.L., 1991.** « Les huiles essentielles; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie ». Edition Frison- Roche, Paris, 21 P.
- **Scalbert A., 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, vol.30, p.p.3875-3883.
- **Schaffner W., 1993.** Les plantes médicinales et leurs propriétés, manuel d'herboristerie. Ed. Delahaux et Niestle, p.p. 138-139.
- **Schewe T. et Sies H., 2003.** Flavonoids as protectant against prooxidant enzymes. *Biologie Médicale.* Vol. 34, p.p. 243-253.
- **Schoderet M. et collaborateurs, 1989.** Pharmacologie: Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Ed. Frison et Roche Paris, vol.2, p.p.509-918.
- **Seck D., Sidibe B., Haubruge E., Hemptinne J.L. et Gaspar C.H. 1991.** La protection chimique des stocks de niébé et de maïs contre les insectes au Sénégal. *Meded. Fac. Landbouww. Rijikuniv.*
- **Seidler-Łożykowska K., Bocianowski J. & Król, D., 2013.** The evaluation of the variability of morphological and chemical traits of the selected lemon balm (*Melissa officinalis* L.) genotypes. *Industrial crops and products*, vol. 49, p.p. 515-520.
- **Senatore F., Napolitano F., Ozcan M., 2000.** Composition and antibacterial activity of essential oil from *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) growing wild in Turkey. *Flavour and Fragrance.* Vol. 15, p.p. 186-189.
- **Seu-Saberno M., Blakeway J., 1984.** « La mousse de chêne, une base de parfumerie ». Pour la Science. Edition Française de Scientific American.83p.
- **Singh H.R. et Taylor T.A., 1978.** Rest of grains legumes ecology a- And contol. Et Singh S. R. Vanenden F. And Taylor T. A. Academic press, b-New York, 454p.
- **Singh N., Luthra T., Sangwan R.S., Curr Res. Med., 1990.** *Aromat Plants*, vol 11, p.p. 174-196.
- **Singh S.R., Jackai L.E.N., Dos Santos J.H.R. et Adalla C.B., 1990.** Insect pests of cowpeas. In “Singh S.R. (eds), *Insect Pests of Tropical Food Legums*”. John Wiley and sons, Chichester, p.p. 43-89.

- **Singleton, V. L., & Rossi, J. A. ,1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, vol. 16, n°3, p.p.144-158.
- **Sivropoulou A., Nikolaou C., Papanikolaou E., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M., 1997.** Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. J. Agr. Food Chem. vol.45, p.p. 3197-3201.
- **Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 2003.** Principe d'analyse instrumentale. Paris, De Boeck universite, 956p.
- **Smith E. H. & Whitman R. C., 1992.** Field guide to structural pests. National Pest Management Association, Dunn Loring, VA.
- **Smith W. L., DeWitt D. L. & Garavito R. M., 2000.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annual review of biochemistry, vol. 69, n°1, p.p. 145-182.
- **Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L., 1998.** Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology, vol.26, p.p.118–22.
- **Sorg O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. Comptes Rendus Biologies. vol. 327, p.p. 649-662.
- **Southgate B.J., 1978.** Pests of grain legumes : Ecology and control. Press. New York, p.p. 225-227.
- **Southgate B.J., 1979.** Biology of the Bruchidae. Annu. Revu. of Entomology. Vol. 24, p.p. 449-473.
- **Southgate B.J., 1964.** Distribution and hosts of certain Bruchidae in Africa. Tropical Stored products Information Circular, vol. 7, p.p. 277-279.
- **Souza E.L., Stamford M.T.L., Lima E.O. et Trajano V.N., 2006.** Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. Food Control, Article in press.
- **Stahl-Biskup E., 1991.** Chemical composition of Thymus oils a review the literature 1960-1989. J.E.O.R., n°3, p.p. 61-82.
- **Stavric B. et Matula T.I., 1992.** Flavonoids in Foods. Their significance for nutrition and health. In ONG ASH et Parker L eds lipid soluble and antioxidants: Biochemistry and clinical applications. Basel: Birkhauser verlag, p.p. 274-294.
- **Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Meireles M.A.A., Moura L.S. and Marchese, J.A., 2006a.** Seed productivity, yield and composition of the essential oil of fennel *Foeniculum vulgare* var. *dulcis* in the season of the year. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, vol.8, p.p.86-90.

- **Steffan J.R., 1978.** Description et Biologie des insectes in **Scotti G., 1978.** Les insectes et les acariens des céréales stockées. Ed. AFNOR et I.T.F.C., Paris, p.p. 1-62
- **Sun J., Khatan B., Huang S.H., Whiteman M. et Zhu Y.Z., 2002.** Effects of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. N°23, vol. 12, p.p.1142-1151.
- **Sur S.V., Tuljupa F.M., Sur L.I., 1991.** Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants. J. Chromatogr. Vol. 542, p.p.451-458.
- **Svoboda K.P. et Hampson J.B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plant: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, Scotland.
- **Teuscher E., Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec&Doc, Lavoisier, Paris, 105p.
- **Thoby C., 2009.** La Mélisse officinale: *Melissa officinalis* L. Thèse de Doctorat. Université de Nantes, Faculté de pharmacie, 136 p.
- **Tranchant J., Arpinaud P, Prevote A., Serpinet J., Vergnol A. et Witier P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4<sup>ème</sup> édition, Ed. Masson, 700p.
- **Traoré M. C., 2006.** Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, pp. 175p.
- **Tripathi A. K., Prajapati V., Aggarwal K. K. & Kumar S., 2001.** Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1, 8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology, vol. 94, n°4, p.p. 979-983.
- **Tripathi A., Upadhyay S., Bhuiyan M., Bhattacharya P. J., 2009.** Pharmacognosy Phytother. Vol. 1, p.p. 52-63.
- **Utida S., 1981,** Polymorphisme and phase dimorphisme in callosobruchus; In ecology of bruchidas attacking legume. Ed. By Labeyrie, Junk, the Hygue, p.p 143 - 17.
- **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. & Telser J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology, vol. 39, n°1, p.p. 44-84.
- **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-biological interactions. vol.160, p.p.1-40.
- **Valnet J., 1979.** Aromathérapie traitement des maladies par les essences des plantes. France, Brodar et Taupin, 525 p.

- **Vansant G., 2004.** Radicaux libres et antioxydant : principes de base. Symposium «Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.
- **Velasco J. et Dobargane C., 2002.** Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipids and Science Technology*, vol. 104, p.p. 661–676.
- **Vermin G., 1982.** Arome alimentaire et développement récents. Paris, Apria.
- **Wang B.S., Chen Y. J., Liu S.H., Lin-Shiau S.Y., 2000.** An increase in free radical production by means of an anion channel blocker DIDS in mouse peritoneal neutrophils. *Proceedings of the National Science Council. Republic of China.* Vol. 24, n. 4, p.p. 178-186.
- **Wang H.F., Yih K.H., Huang K.F., 2010.** Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis*, vol. 18, n°1, p.p. 24-33.
- **Wang J. et Mazza G., 2002.** Effects of Anthocyanins and other phenolic compounds of the production of tumoral Necrosis Factor  $\alpha$  in LPS /IFN  $\gamma$  – Activated RAW Macrophages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 50, p.p. 4183-4189.
- **Wichti M. et Anton R., 2003.** Plantes thérapeutique : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Edition Tec & Doc- EM Inter, 2<sup>e</sup> édition, 788p.
- **Williamson G., Day A.J., Plumb G.W., Couteau D., 2000.** Human metabolic pathways dietary flavonoïds and cinnamates. *Biochemical Society Transactions.* Vol.28, p.p.16-22
- **Wiseman J. & Lessire M., 1987.** Interactions between fats of differing chemical content: apparent availability of fatty acids. *British poultry science*, vol. 28, n°4, p.p. 677-691.
- **Yangui T., Bouaziz M., Dhouib A., Sayadi S., 2009.** Potential use of Tunisian *Pituranthos chloranthus* essential oils as natural disinfectant. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol.48, p.p.112-117.
- **Yu R., Mandlekar S., TonyKong A.N., 2000.** Molecular mechanisms of butylated hydroxylanisole-induced toxicity: introduction of apoptosis through direct release of cytochrome. *Molecular Pharmacology*, vol.58, p.p. 431-437.
- **Zantar S., Haouzi R., Chabbi M., Laglaoui A., Mouhib M., Boujnah M., Bakkali M., Hassani Zerrouk M., 2015.** *Radiat. Phys. Chem.* Vol. 115, p.p. 6–11.
- **Zettler J.L, Arthur F.H., 2000.** Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. *Crop Protection*, Vol. 19, p.p.577-582.

## Résumé

Les plantes aromatiques sont des sources inépuisables de substances naturelles douées de propriétés biologiques présentant un intérêt réel. Dans ce contexte, les plantes objet de cette étude sont de la Criste marine (*Crithmum maritimum* L.), de la Mélisse (*Melissa officinalis* L.) et du Thym (*Thymus pallescens* de Noé), ce dernier a préalablement été soumis à l'irradiation  $\gamma$  selon des doses de 5, 10, 20 et 30 kGy. L'hydrodistillation de ces échantillons a permis l'obtention des huiles essentielles issues de ces plantes. L'analyse qualitative par CPG seule et semi-quantitative GC couplée SM a permis la détermination de leurs compositions chimiques. Les extraits de *Crithmum maritimum* L., *Melissa officinalis* L., et des échantillons de *Thymus pallescens* de Noé ont été obtenus par extraction solide/liquide par soxhlet et leurs teneurs en composées phénoliques (phénols totaux et flavonoïdes) ont été déterminées. L'activité antioxydante des HE testées a été évaluée au moyen de différentes méthodes à savoir: l'activité de piégeage du radical DPPH et ABTS  $^{•+}$ , le pouvoir réducteur et le test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). L'activité antimicrobienne des HE de *Melissa officinalis* L. et de *Thymus pallescens* de Noé a été estimée par une étude qualitative (l'Aromatogramme) et les résultats obtenus ont été confirmés par étude quantitative en déterminant les CMI & CMB de HE de Mélisse vis-à-vis des souches microbiennes testées. L'évaluation de l'effet insecticide des HE de *Crithmum maritimum* L. et *Melissa officinalis* L. a été testée vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* F. et les échantillons des HE de *Thymus pallescens* de Noé contre le coléoptère *Tribolium confusum* Duv.

**Mots clés:** *C. maritimum* L., *M. officinalis* L., *T. pallescens* de Noé, irradiation  $\gamma$ , HE, composés phénoliques, CPG, GC-MS, activité antioxydante, activité antimicrobienne, activité insecticide.

---

## Abstract

Aromatic plants are inexhaustible sources of natural substances endowed with biological properties of real interest. In this context, the plants that are the subject of this study are Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.), Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and Thyme (*Thymus pallescens* de Noé), the latter was previously submitted to irradiation  $\gamma$  in doses of 5, 10, 20 and 30 kGy. The hydrodistillation of these samples made it possible to obtain the essential oils derived from these plants. The qualitative analysis by single GC and semi-quantitative GC coupled SM allowed the determination of their chemical compositions. The extracts of *Crithmum maritimum* L., *Melissa officinalis* L., and samples of *Thymus pallescens* de Noé were obtained by solid / liquid extraction by soxhlet and their phenolic compound content (total phenols and flavonoids) were determined. The antioxidant content of the tested essential oils was evaluated using different methods: DPPH and ABTS  $^{•+}$  radical scavenging activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition (TBARS). The antimicrobial activity of *Melissa officinalis* L. and *Thymus pallescens* samples was assessed by a qualitative study (the Aromatogram) and the results obtained were confirmed by quantitative study by determining Melissa's essential oils MIC & MBC values. microbial strains tested. Evaluation of the insecticidal effect of *Crithmum maritimum* L. and *Melissa officinalis* L. essential oils was tested against *Callosobruchus maculatus* F. and essential oils samples of *Thymus pallescens* de Noè against *Tribolium confusum* Duv.

**Keywords :** *C. maritimum* L., *M. officinalis* L., *T. pallescens* de Noé,  $\gamma$  irradiation, essential oils, phenolic compound, GC, GC-MS, antioxidant activity, antimicrobial activity, insecticidal activity.

## الملخص

النباتات العطرية مصادر لا تفتى من المواد الطبيعية الموهوبة بالخصائص البيولوجية ذات فائدة حقيقية و في هذا السياق النباتات موضوع هذه الدراسة هي شمر البحر (*Crithmum maritimum L.*) ، ميليسا (*Melissa officinalis L.*) و الزعر (*Thymus pallescens de Noé*) هذه النبتة الأخيرة خضعت مسبقا للإشعاع  $\gamma$  بواسطة جرعات 5، 10، 20 و 30 kGy. سمح لنا التقطير المائي لهذه النباتات إنتاج الزيوت الأساسية. الدراسة النوعية و الشبه الكمية للزيوت الأساسية المستخلصة بطريقة التقطير المائي تمت بواسطة CPG و CPG/SM مكنتنا من معرفة نوعية و كمية مكونات هذه الزيوت. تم استخراج المستخلصات الاتانولية للنباتات المدروسة كما تم تقدير المركبات الفينولية (الفينولات الكلية والفلافونيدات)، تم تقييم النشاط مضاد للأكسدة باستخدام عدة طرق منها: النشاطية الإزاحية اتجاه جذر DPPH و  $ABTS^{+}$  ، التقاط أيونات الحديد الثنائي و المواد الفاعلة لحمض ثيوباربيتوريك. دراسة الفعالية ضد الأحياء الدقيقة للزيوت الأساسية ل *Melissa officinalis L.* و *Thymus pallescens de Noé* قدرت عن طريق بواسطة دراسة نوعية و تم التأكد من هذه النتائج عن طريق دراسة كمية بالنسبة لزيت الأساسية ل *Melissa officinalis L.* من خلال تحديد التركيز CMI و CMB اتجاه سلالات ميكروبية المجربة. تقييم تأثير ضد الحشرات لزيوت الأساسية ل *Melissa officinalis L.* و *Crithmum maritimum L.* تم اختبارها ضد *Callosobruchus maculatus F.* ، بالنسبة لعينات الزيوت الأساسية لزعر اختبرت ضد *Tribolium confusum Duv.*

**الكلمات الأساسية :** *C. maritimum L.* ، *M. officinalis L.* ، *T. pallescens de Noé* ، الإشعاع  $\gamma$  ، الزيوت الأساسية، المستخلصات الاتانولية، CPG, GC-MS، النشاط المضاد للأكسدة، الفعالية ضد الأحياء الدقيقة، تأثير ضد الحشرات.