

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH –ALGER-

Thèse Présentée pour l'obtention du diplôme de Magister en Agronomie

Département: Technologie alimentaire.

Option : Alimentation et Nutrition.

Par

Melle ALLOUN Kahina

***Composition chimique et activités
antioxydante et antimicrobienne des
huiles essentielles de l'aneth (*Anethum
graveolens L.*), de la sauge (*Salvia
officinalis L.*) et de la rue des montagnes
(*Ruta montana L.*)***

Soutenue publiquement le 03-10-2013

Directrice de thèse Mme FERHAT Z. Professeur à l'ENSA

Président M. BENCHABANE A. Professeur à l'ENSA Co-directeur de thèse M. HAZZIT M. Maître de conférences A à l'ENSA Examineur M. BENCHABANE O. Maître assistant à l'ENSA

Table des matières

Remerciements . .	5
Dédicace . .	6
Liste des abréviations . .	7
Résumé . .	9
Abstract . .	10
ص غ ل م . .	11
Introduction générale . .	12
Synthèse bibliographique . .	14
CHAPITRE I : Les huiles essentielles . .	14
1-Historique . .	14
2-Définition . .	14
3-Localisation des huiles essentielles . .	15
4-Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles . .	15
5-Composition chimique des huiles essentielles . .	16
6-Toxicité des HE . .	16
7-Extraction des huiles essentielles . .	17
8-Analyse des huiles essentielles . .	19
9-Utilisation des huiles essentielles . .	22
CHAPITRE II : Monographie des espèces étudiées . .	22
1-La Saugé : <i>Salvia officinalis</i> . .	22
2-La rue des montagnes : <i>Ruta montana</i> . . .	26
3-L'Aneth : <i>Anethum graveolens</i> . .	29
CHAPITRE III: Activité antioxydante . .	33
Introduction . .	33
1-Le stress oxydatif . .	33
2-Les antioxydants (antioxygènes) . .	36
CHAPITRE IV : Activité antimicrobienne . .	40
Introduction . .	40
1-Principaux agents antimicrobiens . .	40
2-Détermination de l'activité antimicrobienne . .	41
3-Facteurs influençant l'activité antimicrobienne . .	44
4-Les propriétés des agents antimicrobiens . .	44
5- Activité antimicrobienne des HE . .	45
6-Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants . .	47
7-Comparaison entre les antibiotiques et les huiles essentielles . .	48
8-Facteurs influençant l'activité antimicrobienne . .	49
9-Applications des HE sur les aliments . .	50
Etude expérimentale . .	51
CHAPITRE I : Matériels et méthodes . .	51
1-Matériel végétal . .	51

2-Elaboration des coupes histologiques . . .	51
3-Extraction des huiles essentielles . . .	51
4-Caractéristiques des HE . . .	52
5-Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CPG/SM . . .	53
6-Evaluation de l'activité antioxydante . . .	54
7-Evaluation activité antimicrobienne . . .	55
8-Analyse statistique . . .	61
CHAPITRE II : Résultats et discussions . . .	61
1-Les espèces étudiées . . .	61
2-Rendement de l'extraction des huiles essentielles des plantes étudiées . . .	64
3-Caractéristiques physico-chimiques . . .	65
4-Analyse chromatographique des huiles essentielles . . .	66
5-Evaluation de l'activité antioxydante . . .	80
6-Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE testées . . .	85
7-Analyse statistique . . .	99
Conclusion générale & Perspectives . . .	103
Références bibliographiques . . .	106

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.

Ce travail a été mené sous la direction de **Mme FERHAT Zoulikha et Mr HAZZIT Mohamed** mes promoteurs qui m'ont fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail par leurs conseils pertinents, leurs aides précieuses et chaleureuses et la constante disponibilité dont ils ont fait preuve pour suivre le cheminement de ce travail. Qu'ils trouvent ici mes sentiments de reconnaissance et de déférence.

Je tiens également à remercier **Mme DJEMAOUI Nassima**, qui m'a encadré au C.R.D de SAIDAL, pour son aide précieuse et ses orientations concernant l'étude de l'activité antimicrobienne.

J'exprime mes sincères remerciements aux examinateurs qui ont bien voulu évaluer ce travail à savoir :

Je remercie particulièrement Monsieur **BENCHABANE Ahmed** Professeur à l'ENSA d'avoir accepté d'assurer la présidence de ce jury.

Je remercie également **Monsieur BENCHABANE Otman** Maître assistant à l'ENSA pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner et d'évaluer ce modeste travail.

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

Atous, un grand Merci

Dédicace

*n guise de reconnaissance, je dédie ce travail : A la mémoire de ma grand-mère, A mes très chers parents que j'adore, papa djamel et mama warda, pour leurs soutiens, leurs amours et leurs encouragements tout au long de mon cursus universitaire et de ma vie professionnelle : « Je ne trouverai jamais les mots pour vous remercier du dévouement accompli pour mon instruction, mon bien être et les valeurs que vous m'avez inculqué : c'est à vous que je dois mon assurance et ma témérité ». A toute ma famille, à tous mes proches et tous mes amis A tous mes enseignants, à toute ma promotion A tous ceux qui m'aiment et qui me sont chers. Kahina. " Tu peux quitter l'école mais elle ne te quittera jamais." **Andy Partridge***

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de **n**ormalisation.

AOM: active **o**xxygen **m**ethod.

ATCC: American Type Culture Collection.

BHA: **B**utyl-**h**ydroxy-**a**nisol.

BHT: **B**utyl-**h**ydroxy-**t**oluene.

CG/SM : Chromatographie en **p**hase gazeuse couplée à la **s**pectrométrie de **m**asse.

CMB : Concentration **M**inimale **B**actéricide.

CMI : Concentration **M**inimale **I**nhibitrice.

CPG : Chromatographie en **p**hase **g**azeuse.

d: dilution

DO : **D**ensité **o**ptique.

DPPH : 2,2-**d**iphenyl-1-**p**icrylhydrazyl

EOR : Les espèces oxygénées réaction.

g : gramme

Gr. : **G**rossissement

h : **h**eur.

HE : **H**uile essentielle

IC 50 : Concentration **i**nhibitrice de **50%** des radicaux

IK: **I**ndice de **K**ovats

MCC : **M**inimal **C**idal **C**oncentrations

MH : **M**uller **H**inton

min : **m**inute.

ppm : **p**artie **p**ar **m**illion

Rdt HE : **R**endement en **h**uile essentielle

SAB : Sabouraud

SM : **S**pectrometrie de **m**asse

sp : **s**piece.

T : **t**empérature.

TBA : Acide **t**hiob**a**rbiturique.

TBHP: **T**ri-**h**ydroxy-**b**utyro-**p**hénone.

TBHQ : **T**er-**B**utyl-**h**ydroxy-**q**uinone.

TSA : **T**rytic **S**oy **A**gar

V : volume.

Résumé

Les plantes aromatiques sont des sources inépuisables de substances naturelles douées de propriétés biologiques présentant un intérêt réel. Dans ce contexte, l'hydrodistillation de la Sauge officinale (*Salvia officinalis*), de la Rue des montagnes (*Ruta montana*) et de l'Aneth (*Anethum graveolens*) a permis l'obtention des huiles essentielles issues de ces plantes. L'analyse qualitative par CPG seule et semi-quantitative CG couplée SM a permis la détermination de leurs compositions chimiques. L'activité antioxydante des HE testées a été évaluée au moyen de deux méthodes : l'activité de piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur. L'activité antimicrobienne a été estimée par une étude qualitative (l'Aromatogramme) et les résultats obtenus ont été confirmés par une étude quantitative en déterminant les CMI & CMB des HE étudiées vis-à-vis de cinq souches microbiennes.

Mots clés: Huile essentielle (HE), *Salvia officinalis*, *Ruta montana*, *Anethum graveolens*, Hydrodistillation, Composition chimique, CPG, CG/SM, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne.

Abstract

Aromatic plants are inexhaustible sources of gifted natural substances biological properties of real interest. In this context, the hydrodistillation of the Sage (*Salvia officinalis*), Rue (*Ruta montana*) and Dill (*Anethum graveolens*) allowed the production of essential oils from these plants. Analysis by GC only and GC coupled SM allowed the determination of their chemical compositions. The antioxidant activity of EO tested was evaluated using two methods: scavenging activity of DPPH radical and reducing power. The antimicrobial activity was estimated by a qualitative study (Aromatogram) and the results were confirmed by quantitative analysis by determining the MIC & CMB EO studied against five microbial strains.

Keywords: essential oil (EO), *Salvia officinalis*, *Ruta montana*, *Anethum graveolens*, Hydrodistillation, chemical composition, GC, GC/MS, antioxidant activity, antimicrobial activity.

ص خلم

النباتات العطرية مصادر لا تفتي من المواد الطبيعية الموهوبة بالخصائص البيولوجية ذات فائدة حقيقية. و في هذا السياق سمح لنا التقطير المائي للمريمية (*Salvia officinalis*) الفيجلة الجبلي (*Ruta montana*) و الشبث (*Anethum graveolens*) إنتاج الزيوت الأساسية الصادرة من هذه النباتات الدراسة النوعية بواسطة CPG و شبه النوعية ب CG/SM مكننا من تحديد التركيب الكيميائي لهذه الزيوت. تم تقييم النشاط مضاد للأكسدة باستخدام طريقتين النشاطية الإزاحية اتجاه جذر DPPH و النقاط أيونات الحديد الثنائي. تحليل الفعالية ضد الأحياء الدقيقة قدرت بواسطة دراسة نوعية و تم التأكد من هذه النتائج عن طريق دراسة كمية من خلال تحليل التركيز CMI و CMB اتجاه خمس سلالات ميكروبية.

الكلمات الأساسية: الزيوت الأساسية (*Salvia officinalis*), (*Ruta montana*) (*Anethum graveolens*) التقطير المائي التركيب الكيميائي CG/SM CPG النشاط المضاد للأكسدة الفعالية ضد الأحياء الدقيقة

Introduction générale

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, médicaments, abris et également pour ses besoins en matière première pour des produits de première nécessité. Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening des ressources naturelles a conduit à la découverte d'un grand nombre de plantes à huile essentielle et à lipides de réserve utiles. Ces plantes commencent à jouer un rôle majeur dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

L'utilisation des plantes et de leurs vertus pour répondre à certains besoins de l'homme, connue depuis l'antiquité et évolue avec l'histoire de l'humanité. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives pour lesquelles il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages.

Les plantes représentent donc une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'homme dans l'industrie des parfums, agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. La plupart des végétaux renferment des huiles essentielles ; ils sont alors appelés «plantes aromatiques». Les plantes aromatiques ont été traditionnellement employées pour l'assaisonnement et la prolongation de la durée de conservation des aliments (**Wang et al., 2010**). La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire (**Rashid et al., 2010**). Ces huiles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activités antioxydante, antibactérienne et antifongique (**Dung et al., 2008**), d'autre part, la plupart des huiles essentielles sont classées dans la liste des substances GRAS, qui les rendent utiles en tant que conservateurs naturels dans les industries agroalimentaires (**Gachkar et al., 2007; Rasooli et al., 2008**).

Les plantes aromatiques sont prometteuses et constituent une source importante d'antioxydants et d'antimicrobiens naturels pour l'industrie agroalimentaire. En effet, l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires induit non seulement une diminution de la valeur nutritive de l'aliment, mais aussi des effets reconnus nuisibles pour le consommateur et qui peuvent être associés à des risques de cancer chez l'homme. La présence d'antioxydants dans l'alimentation est devenue essentielle pour la qualité et la sécurité de l'aliment. Les effets négatifs des antioxydants synthétiques encouragent à leur substitution par des agents naturels.

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont 300 environ 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.

L'un des principaux problèmes de l'industrie agro-alimentaire est d'assurer une bonne conservation des aliments. Les phénomènes d'oxydation sont notamment redoutés. En

effet, au niveau des lipides, les dégradations oxydantes conduisent à une perte en vitamines, une diminution de la valeur nutritionnelle, une détérioration du goût et même parfois à l'apparition de substances toxiques (**Pascal, 1979; Nessrien & Mohamed, 2007**). Des quantités substantielles de produits alimentaires stockés sont attaquées par des bactéries et des moisissures dans le monde entier. En particulier dans les pays en voie de développement, les aliments stockés subissent des dommages sérieux, menant aux pertes économiques et au risque sanitaire. Les moisissures sont également responsables de la formation de goût et de la production des composés et des mycotoxines allergéniques (**Ownagh et al., 2010**).

Pour faire face aux problèmes d'oxydation et de contamination des denrées alimentaires, l'essor de la chimie a permis l'apparition et l'application de nouvelles substances chimiques en tant que conservateurs alimentaires synthétiques (**Moll et Moll, 1998**). Ces derniers ont été employés couramment pour empêcher la détérioration des aliments (**Nakahara et al., 2003**). Par la suite, plusieurs conservateurs synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets toxicologiques indésirables à long terme, y compris la cancérogénicité (**Ho et al., 2009; Chahardehi et al., 2010**). La tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation naturelle a incité la recherche, le développement et l'application de nouveaux produits naturels ayant des activités antimicrobiennes et antioxydante dans le but de les utiliser comme alternatives aux conservateurs synthétiques dans le domaine des industries agroalimentaires.

Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de la composition chimique, des activités antioxydantes et antimicrobiennes des HE de trois plantes aromatiques, ce sujet nous a semblé intéressant d'autant plus que la flore algérienne est extrêmement variée en plantes aromatiques riches en huiles essentielles.

Les plantes sur lesquelles notre choix s'est porté sont, la sauge (*Salvia officinalis*), la rue des montagnes (*Ruta montana*) et l'aneth (*Anethum graveolens*) provenant des trois régions d'Algérie : Bouira (Bouderbala - Lakhdaria), Tablat (Médéa) et Alger (environs de Birkhadem), respectivement.

Le présent travail comporte deux parties :

- Une partie bibliographique qui nous éclaire sur les espèces végétales étudiées, les huiles essentielles et les activités biologiques, en l'occurrence l'effet antioxydant et antimicrobien attribuées aux huiles essentielles.
- Une partie expérimentale composée elle-même de plusieurs volets, à savoir :
 - Localiser les organes sécréteurs des HE de sauge, de rue des montagnes et d'Aneth.
 - Évaluer le rendement en huiles essentielles.
 - 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 l'activité antioxydante et antimicrobienne des différentes essences étudiées.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les huiles essentielles.

Chapitre II : La monographie des espèces étudiées.

Chapitre III : Activité antioxydante.

Chapitre IV : Activité antimicrobienne.

CHAPITRE I : Les huiles essentielles

1-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 ont fait grand usage (**Odoul, 2003**).

Au 16^{ème} siècle, le médecin Suisse Paracelse étudie l'extraction de «l'âme» des végétaux à laquelle on donnera 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**). De nos jours, l'usage des huiles essentielles est très large dans les domaines de la pharmacologie, la cosmétique et l'agroalimentaire.

2-Définition

Les HE sont des produits odorants, volatils, issues du métabolisme secondaire d'une plante aromatique, normalement formés dans des cellules spécialisées ou groupes de cellules (**Conner, 1993**). Cependant il reste difficile d'attribuer une seule définition au terme « huile essentielle», car il en existe plusieurs.

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, etc...) (**Anton et Lobstein, 2005**).

L'association française de normalisation (AFNOR) définit une HE comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des Citrus, soit par distillation à sec.

L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (**AFNOR, 2000**). Cette définition est restrictive car elle exclut aussi bien les produits extraits à l'aide de solvants que ceux obtenus par tout autre procédé.

3-Localisation des huiles essentielles

Parmi les espèces végétales (800000 à 1 500000 selon les botanistes) 10% seulement sont dites « aromatiques ». Les genres capables d'élaborer les constituants des HE sont réparties dans un nombre de familles limité, exemple: *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Zingiberaceae*, *Piperaceae* (**Bruneton, 1999**).

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 différentes 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, Hypcricacées, Rosacées, Rutacées, Myrtacées,
- **Les canaux glandulaires lysigènes** : on les retrouve chez les Conifères, Umbellifères,.

4-Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

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 indice 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.

5-Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique d'une HE est très complexe (**Bruneton, 1995 et Arnaud, 1985**). En effet, le nombre de composés isolés au sein des HE est d'environ un millier et il en reste encore beaucoup à découvrir (**Belaiche, 1979**).

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

-Les monoterpènes (composés en C_{10}): 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, Sabinène, Pinènes, 3-Carène) (**Bruneton, 1995**).

-Les sesquiterpènes (composé en C_{15}): 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 biogenèse 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 diverses

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**).

6-Toxicité des HE

Le caractère d'une huile essentielle correspond à celui de la plante dont elle est tirée. Sa toxicité est d'autant plus importante que sa concentration est forte. De nombreuses précautions doivent être prises avant tout emploi et surtout en ce qui concerne le dosage ainsi que le mode d'application interne ou externe (**Bachelot et al., 2006**).

En général, chez l'homme, l'ingestion de 10 à 30 ml d'HE peut être mortelle. Aux doses plus faibles, on note des troubles digestifs, d'hypotension, d'hypothermie et une confusion mentale (**Bruneton, 1999**).

7-Extraction des huiles essentielles

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 l'écorce 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, 1992).

b-Extraction à la vapeur d'eau

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 proposé par Garnier en 1891, 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 l'eau aromatique (ou hydrolat) chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante, 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 intervenant lors de l'entraînement à la vapeur seraient l'osmose et la diffusion libre (Guenther, 1972).

Hydrodistillation par micro-ondes sous vide

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 azéotropique 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 distillation simultanées (SDE):

L'extraction- distillation simultanées 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**).

Distillation mixte

C'est un processus de couplage entre l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation. Au cours de l'extraction, la matière végétale baignant dans l'eau bouillante est traversée par un courant de vapeur d'eau. Ce procédé a pour objet de réduire les réactions secondaires subies par l'HE sous l'action de l'eau acide.

c-Extraction par solvant

Certains organes de végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation. C'est le cas des fleurs de jasmin, d'œillet, de tubéreuse, etc. Il faut donc, pour ces végétaux, recourir à d'autres méthodes d'extraction des composés odorants volatils, telle que l'extraction par les solvants fixes (enfleurage et macération) et volatils (**Garnero, 1996**).

Extraction par un solvant volatil

Selon **Banthorpe et Charwood (1972)**, elle consiste à la mise en contact de la matière végétale avec un solvant qui dissout et extrait les constituants odorants solubles de la plante, le solvant ainsi chargé (le miscella) est ensuite évaporé et récupéré.

Selon **Bruneton (1995)**, les solvants les plus utilisés sont: le benzène, l'hexane, les alcools (méthanol et éthanol), les cétones et les solvants chlorés. Ce mode d'extraction conduit aux composés suivants:

- **Concrète:** c'est le produit obtenu après évaporation du solvant si la matière de départ est fraîche, cependant, si la matière première utilisée est sèche, on parlera dans ce cas de résinoïde. Ces concrètes ont une consistance solide et insoluble dans l'alcool.
- **Absolue:** c'est un produit à odeur caractéristique obtenu à partir d'une concrète par l'extraction à l'éthanol à température ambiante.
- **Cires:** composés de substances saponifiables (acides gras à longues chaînes) ou insaponifiables (hydrocarbures à un nombre impair de carbones et rarement insaturés), c'est la fraction lourde de la concrète.

L'extraction est souvent menée dans un extracteur de type Soxhlet ou celui de Kumagawa, appareil conçu pour l'extraction en continu. (**Chavanne, 1986**).

Pour la récupération des HE, on peut procéder à l'extraction liquide - liquide qui est une opération de transfert ou d'échange de matière entre deux phases liquides: la solution et le solvant. L'extraction systématique en continu est utilisée pour extraire un constituant particulier ou pour en éliminer d'autres, en utilisant deux solvants non miscibles à pouvoir dissolvant plus spécifique de chaque groupe (**Moulin et al., 2002**).

Extraction par solvant fixe

Les solvants fixes utilisés sont principalement des matières grasses. Une extraction peut être réalisée à froid « procédé d'enfleurage » ou à chaud « macération ou digestion »

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 température ambiante, sur des plaques enduites de graisses solides sur lesquelles, elles séjournent pendant 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 rapide, 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**).

Extraction par le CO₂ à l'état supercritique

La technique d'extraction au CO₂ 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 CO₂ 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**).

8-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 progressé 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.

a-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:

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

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**).

b-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; les compositions qualitative et quantitative de mélanges complexes, etc.

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 des ions 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.

c-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 de leur 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.

9-Utilisation 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, 1992**).

a-Industries agroalimentaires

Plusieurs segments alimentaires utilisent, à différents degrés, les HE qui leur offrent un potentiel important 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, 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 deviennent de plus en plus résistants aux structures moléculaires de synthèse des antibiotiques, ils se heurtent plus difficilement à l'infinie diversité et à la complexité des HE (**Richard, 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.

CHAPITRE II : Monographie des espèces étudiées

1-La Saugue : *Salvia officinalis*

1.1-Généralités

"Qui a de la sauge dans son jardin, n'a pas besoin d'un médecin" (*dicton provençal*)

La Saugue, ***Salvia officinalis***, de la famille des labiées, aussi appelée Saugue de Grèce, Herbe sacrée, Grande Saugue, Thé de Grèce, Thé de France, Thé d'Europe, Salel, Saugue

Franche, Thé sacré. (Anglais: sage). *Salvia* du latin *salvare* : guérir, sauver. La sauge a la réputation d'être la plante guérisseuse par excellence.

Salvia est une plante annuelle et biennale d'origine méditerranéenne de la famille des labiées (**Djerroumi et Nacef, 2004**). Il existe environ 900 espèces identifiées autour du monde (**Maksinovic et al., 2007 ; Longaray et al 2007**). En Algérie les espèces qui ont été déterminées sont dans l'ordre d'une trentaine. Plusieurs appellations ont été données à la sauge. Selon Ibn El Beytar, les andalous la nomment "essalma" qui ajoute qu'elle est appelée "salbia" par les botanistes en Espagne. El djazairi indique l'expression "souek ennebi" comme synonyme de Saleme.

1.2- Histoire et origine

Son nom est déjà une sorte de diplôme d'efficacité puisque *salvia* vient du latin *salvare* qui signifie «sauver», «guérir» ; c'est une des plantes sacrées des anciens. Les Romains la récoltaient avec un cérémonial spécial. Ses effets dus à son huile essentielle et la présence d'un œstrogène, avaient déjà été observés aussi bien par les Romains que par les Égyptiens. Pendant tout le Moyen Âge, elle reste une plante primordiale et entre dans de très nombreuses préparations : Eau d'arquebuse, Eau céleste, Eau impériale, etc. Les feuilles de sauge séchées sont un condiment employé depuis l'antiquité.

La sauge était une des plantes salvatrices du [Moyen Âge](#) . Reconnue par les Chinois, ces derniers n'hésitaient pas à échanger leurs feuilles de [thé](#) les plus précieuses contre des feuilles de sauge. [Louis XIV](#) en avait même fait sa tisane d'élection et en servait à tout propos. Les Grecs, les Romains et les Arabes l'employaient communément comme tonique et en compresse contre les morsures de serpent. Au XVI^e siècle, le botaniste [Jacob Tabernaë-Montanus](#) raconte que les femmes égyptiennes avaient l'habitude de boire du jus de sauge pour accroître leur fertilité.

Au XVIII^e siècle, on roule les feuilles de sauge comme des cigarettes. Tous les [asthmatiques](#) se mettaient à fumer de la sauge dès l'apparition du premier [pollen](#) printanier. La plante était associée à l'immortalité et à la longévité. Certains groupes d'[Amérindiens](#) mélangeaient la sauge avec de la graisse d'ours pour guérir les problèmes de peau. On a aussi utilisé la plante pour traiter les [verrues](#) .

De nos jours, son utilisation médicinale s'est un peu perdue, et elle n'est plus utilisée que comme herbe aromatique.

1.3- Caractéristiques botaniques

1.3.1- Description de la plante

Plante vivace à tige ligneuse à la base, formant un buisson dépassant parfois 80cm, rameaux vert-blanchâtre. Feuilles assez grandes, épaisses, vert-blanchâtres, et opposées; fleurs bleu-violacé clair en épis terminaux lâches, disposées par 3 à 6 en verticilles espacés. Calice campanulé à 5 dents longues et corolle bilabée supérieure en casque et lèvre inférieure trilobée; fruits en forme de tétrakènes (**Hans, 2007**).



Figure 1 : *Salvia officinalis* L., feuilles et fleurs



Figure 2 : *Salvia officinalis* L., feuilles

La racine de la sauge est brunâtre et fibreuse. La tige mesure de 20 à 30 centimètres et est très rameuse. Les feuilles, opposées, elliptiques, inférieures pétiolées, rugueuses, à bord dentelé, réticulées, molles, à dessus blanchâtre, persistent l'hiver grâce au revêtement de poils laineux qui les protègent. Les fleurs, bleu-rose lilas, visibles de mai à août, sont grandes, groupées à la base des feuilles supérieures, l'ensemble forme de grands épis. Commune en Europe, plus spécialement dans les régions méridionales, elle est cependant rare à l'état sauvage.

Organes reproducteurs

- Type d'inflorescence : [Glomérules spiciformes](#)
- Répartition des sexes : [Hermaphrodite](#)
- Type de pollinisation : [Entomogame](#)
- Période de floraison : Mai à Août

Graine

- Type de « fruit » : [Akène](#) (tetrakène)
- Mode de dissémination : [Barochore](#)

1.3.2-Classification

La sauge appartient à la grande famille des Lamiaceae (Labiatae), Il existe plus de 600 variétés de sauge à travers le monde, toutes ne sont pas comestibles, beaucoup d'entre elles sont utilisées en plantes ornementales dans les jardins. Nous consommons la sauge officinale ou sauge des jardins.

- **Nom scientifique** : *Salvia officinalis* L.
- **Nom commun** : Saugue officinale (Français), Agourim Imeksaouen, Tazzourt, marramia (Berbère), Souaa en nabi (arabe).

Systematique

Selon (**Cronquist, 1968**), la sauge appartient au :

- Règne : Plantae (végétal)
- Embranchement : Cormophytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : Magnoliopsida
- Sous classe : Asteridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiaceae
- Genre : *Salvia*
- Espèce : *Salvia officinalis* L.

1.3.3-Habitat

- La sauge officinale, est originaire du pourtour du bassin méditerranéen.
- Elle pousse dans les zones tempérées ; son habitat type se situe dans les pelouses basophiles méso-méditerranéennes, méso-xérophiles.
- Aire de répartition : introduite d'Asie occidentale.

1.4-Huile essentielle de Saugue

1.4.1-Les principaux constituants biochimique de l'huile essentielle de Saugue officinale

- Cétones terpéniques: cis-thujone (28.82%), camphre (15.07%), trans-thujone (3.78%)
- Monoterpènes : α -pinène (6.45%), camphène (5.73%), limonène (5.05%), myrcène (2.86%), p-cymène (1.99%), β -pinène (1.58%), γ -terpinène (1.50%)
- Oxydes terpéniques: 1,8-cinéole (8.44%)
- Monoterpénols : bornéol (2.12%), linalol (1.36%), terpinèn-4-ol (0.65%), α -terpinéol (0.30%)
- Esters terpéniques: acétate de bornyle (1.51%)
- Sesquiterpènes: α -humulène (4.21%), β -caryophyllène (2.97%)
- Sesquiterpénols: viridiflorol (0.65%). (Anonyme 1)

1.4.2-Les propriétés de l'huile essentielles de Saugue officinale

- Antibactérienne spécifique (coques gram (+), staphylocoques dorés, streptocoques) ;

- Antifongique (*candida albicans*) ;
- Antivirale puissante ;
- Expectorante, mucolytique ;
- Lipolytique (facilite l'élimination des graisses), anti-cellulitique ;
- Cholagogue et cholérétique (stimule les sécrétions biliaires et pancréatiques, modère l'excès de cholestérol) ;
- Emménagogue et mimétique des oestrogènes (régule les cycles menstruels et soulage les troubles liés aux cycles et à la ménopause) ;
- Cicatrisante cutanée, s'oppose à la transpiration et aux bouffées de chaleur, diminue les sécrétions salivaires. **(Anonyme 1)**.

1.5-Principaux usages traditionnels de la sauge

La sauge est une des plantes les plus utilisées, vu ses propriétés importantes; elle est considérée comme un stimulant pour les gens anémiques, aussi pour les personnes stressées et déprimées, et conseillée pour les étudiants en période d'examen

Pour usage externe, elle est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies **(Djerroumi et Nacef, 2004)**.

Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs et les problèmes du système nerveux **(Radulescu et al., 2004)**. Cette herbe aromatique est employée dans la cuisine, pour son goût puissant, légèrement amer et comphré **(Duling et al., 2007)**.

1.6-Toxicologie

L'huile essentielle de sauge officinale peut contenir jusqu'à 50 % de thuyone qui peut se révéler épiléptisante et neurotoxique. Néanmoins, aucune toxicité aigüe ou chronique n'a été signalée après emploi aux doses usuelles des feuilles de sauge et de son huile essentielle (jusqu'à 15 gouttes par jour).

Cependant, la thuyone provoque non seulement un effet local irritant, mais également des effets centraux psycho mimétiques, après sa résorption. Une consommation chronique de thuyone peut ainsi conduire à des troubles irréversibles du système nerveux central, à des perturbations des fonctions hépatiques, rénal et cardiaques. Dans la mesure où la quantité de drogue employée à des fins culinaires reste faible, pour les consommateurs. Cependant, des quantités importantes de drogues (dose supérieure à 15 g de drogue sèche) peuvent engendrer une sécheresse de la bouche, l'apparition de sueurs, de tachycardies et de vertiges.

Une toxicité aigüe après administration d'une forte dose d'HE (2 g et plus). Ainsi, la consommation régulière de sauge, même sous forme de tisane ne parait pas recommandée. Le potentiel de sensibilisation est faible. Des réactions allergiques restent jusqu'à présent ponctuelles et serait liées à la présence d'acides carnosolique qui agirait comme allergène. **(Teuscher et al., 2005)**.

2-La rue des montagnes :Ruta montana.

2.1-Généralités

La famille des Rutaceae a été décrite initialement en **1782** par **Durande**, puis par **De Jussieu en 1789**. Elle comprend près de 1500 espèces regroupées en 150 genres environ. Cette famille est plus ou moins cosmopolite, avec une forte concentration dans la zone intertropicale et dans les régions tempérées de l'hémisphère Sud (Australie, Afrique du Sud) (**Heywood, 1996**).

Les Rutaceae sont caractérisées par des poches sécrétrices d'un type qui n'est rencontré dans aucune autre famille dites schizolysigènes (**Ozenda, 2000**). Ces poches, d'origine épidermique, sont toujours superficielles et libèrent leur contenu, une huile essentielle, à la moindre pression.

La Rue s'est largement répandue dans le monde à cause de ses propriétés ornementales et médicinales. Elle est souvent cultivée dans les jardins pour ses qualités décoratives en variété de couleur bleue ou panachée et parfois naturalisée (**Bezanger et al., 1986 et Bezanger et al., 1976**).

Ruta vient du grec « rhyté » qui signifie sauvé, prévenir, ou de « reô » qui signifie qui coule faisant certainement référence à ses vertus emménagogues (**Doerper, 2008**).

Ce genre comprend 8 espèces d'arbustes, de sous-arbrisseaux et de vivaces herbacées à souche ligneuse, caducs ou persistants, vivant dans les lieux secs et rocaillieux, de la région méditerranéenne, et du nord-est de l'Afrique jusqu'au sud-ouest de l'Asie. Les fleurs et le feuillage aromatiques, sont le principal attrait des rues. Les feuilles sont alternes, parfois opposées, ovales, larges, arrondies et pennatiséquées ou pennées. Les fleurs, jaunes, fimbriées ou dentées, à quatre ou cinq pétales, s'épanouissent en cymes terminales (**Mioulane, 2004**).

Le genre *Ruta* L. est représenté en Algérie par 4 espèces : *R. montana* (Clus) L, *R. chalepensis* L. ; *R. angustifolia* (pers) P. cout et *R. latifolia* (Salib) Lindb. Les espèces diffèrent entre elles par l'allure des feuilles, de la grappe fructifère, des bractées et des sépales (**Bossard et Cuisance, 1981 et Quezel et al., 1963**).

En Algérie, elle est rencontrée dans les zones montagneuses de l'intérieur sur l'Atlas Saharien et les pelouses arides (**Clevely et Richmond, 1997**).

2.2-Historique

Dans la médecine traditionnelle grecque et latine, la Rue est tirée du nom Ruomaique qui signifie préservé ou du nom Réuo pour dire libre de maladie (**Ernes, 1995**).

C'est une ancienne herbe médicinale qui a été longtemps utilisée comme contre-poison et comme talisman contre la sorcellerie chez les Grecs. Les Romains l'utilisaient surtout pour améliorer la vision (**Anonyme 2**). La Rue était une composante du vinaigre des quatre voleurs qui détruisaient les victimes pendant l'épidémie de peste en Angleterre, en 1665 (**Anonyme 2**).

2.3-Caractères botaniques

La rue des montagnes (synonymes : *Ruta legitima* Jacq. ; *Ruta tenuifolia* Gouan) ou bonne rue (Bonnier, 1999), appelée vulgairement en Algérie : *fidjlet el-djbel* ou *Fidjela*, a une odeur fétide très intense, se trouve sur les coteaux arides et dans les endroits secs et pierreux de la région méditerranéenne (**Baba Aissa, 1999**).

2.3.1-Description

C'est une plante herbacée vivace, originaire de la région méditerranéenne, appartenant à la famille des rutacées. En Algérie, cette espèce est cultivée dans les jardins ou en pots.

Plante annuelle (figure 3) qui fleurit de juin à septembre. Les feuilles sont glauques de couleur verte plus ou moins jaunâtres, sa tige est grêle, ses feuilles sont finement découpées en segments linéaire et ses fleurs plus petites de 5-6 mm à pétales denticulées sur les marges très brièvement pédicellées. Fruits aigus acuminés de 6 à 9 mm en grappes fructifères étalées, leur saveur est amère, herbacée, âcre. En médecine elle a des vertus emménagogue, antispasmodique, antiépileptique, vermifuge et sudorifique (Quezel et al., 1963).



Figure 3 : *Ruta montana* L.

2.3.2-Classification

Nom scientifique : *Ruta montana* L.,

Nom commun : Rue des montagnes (Français), Aourmi (Berbère), Fidjela el djebeli (Arabe).

Systematique

- Règne : Plantae.
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta.
- Classe : Magnoliopsida
- Sous-classe : Rosidae
- Ordre : Spindales (Rutales).
- Famille : Rutaceae.
- Genre : *Ruta* L.
- Espèce : *Ruta montana* L.,

2.3.3-Aire géographique en Algérie

La Rue pousse spontanément dans les rochers, les lieux arides, vieux murs, collines sèches et elle est abondante dans les terrains calcaires des régions méditerranéennes (Quezel et al., 1963). Elle est présente dans les Rocailles, pâturages et pelouses du Tell, communément retrouvée dans les zones montagneuses de l'intérieur jusqu'à l'Atlas saharien.

2.4-L'HE de la Rue des montagnes

2.4.1-Généralités et composition de l'HE de *Ruta montana*

L'huile essentielle de la rue, très concentrée et forte est utilisée en parfumerie. La posologie conseillée, sur avis d'un praticien, ne doit pas dépasser 2g d'huile essentielle ou 5g de feuilles séchées en infusion. Elle ne peut être délivrée en herboristerie que sur prescription médicale. Mise en garde : la rue est une plante très puissante ; elle ne doit jamais être consommée par les femmes enceintes, car elle est toxique. L'essence de rue contient principalement des composés cétoniques.

2.4.2-Utilisation et toxicité de l'HE de la rue des montagnes

L'essence de rue possède des propriétés abortives. Selon certains auteurs, les propriétés pharmacologiques de l'essence de rue sont liées à la présence de furocoumarines : éther méthylique de l'ombelliférone, xanthotoxine.

La rue est antispasmodique, elle calme les douleurs, les spasmes ainsi que les troubles d'origine nerveuse. Traditionnellement, la rue était utilisée dans les cas d'épilepsie et de convulsions. Elle est sédative et intervient en cas de nervosisme et d'hystérie. Les feuilles fraîches écrasées en application externe soulagent la sciatique.

Le feuillage a parfois un usage médicinal. Ne consommer aucune partie de la rue, la plante entière étant toxique. Eviter de toucher le feuillage, sous peine de provoquer une réaction cutanée, se traduisant par des taches brunes (indolores) qui foncent au soleil (**Dodt, 1996**).

Les feuilles, utilisées à petites doses, sont vermifuges. Aussi, elles ont des vertus toniques et stimulantes, elles sont souvent utilisées comme sternutatoires (provoquent des éternuements).

L'essence de rue est utilisée en parfumerie, en pharmacie, dans la préparation des arômes. On sépare la méthyl n- nonylcétone par distillation fractionnée. Cette cétone sert à la préparation du méthylnonylacétaldéhyde.

Le tableau 01 récapitule les utilisations de *Ruta montana* en médecine traditionnelle

Tableau 1: Quelques usages traditionnels de *Ruta montana*. (Frontquer, 1962, Forment et Roques, 1941)

Espèce	Pays	Partie utilisée	Voie	Usage
<i>Ruta montana</i> L.	Espagne	Plante entière	Orale	-Fièvre -emménagogue -abortive, -antispasmodique -contre les vers intestinaux
	Algérie	Partie aérienne		-Emménagogue - Antispasmodique -Rubéfiant, poudre -Echarrotique

3-L'Aneth : *Anethum graveolens*

3.1-Généralités

L'aneth, une plante de la famille des Apiacées (ou Ombellifères), aromatique et médicinale aux feuilles vertes foncées et aux fleurs bleuâtres, est douée d'excellentes propriétés carminatives, et est utilisée comme remède depuis l'Antiquité.

Elle est cultivée comme plante [condimentaire](#) pour ses [feuilles](#) et ses [graines](#) très aromatiques, et se rapproche du [fenouil](#) par son [odeur](#) et ses propriétés, d'où ses noms de fenouil bâtard ou faux anis. Le nectar de ses fleurs est très apprécié des abeilles.

3.2-Histoire et tradition

Originnaire du bassin méditerranéen (*Anethum graveolens*) ou d'Asie centrale (*Anethum sowa*), elle était utilisée :

- Par les [Égyptiens](#) il y a plus de 5000 ans, en tant que plante médicinale ; dans une ancienne recette égyptienne, mentionnée dans le *Papyrus Ebers*, on recommande l'aneth, associé à d'autres ingrédients, pour faire un mélange employé contre la douleur.
- Par les [Grecs](#) et les [Romains](#) pour son parfum, pour la cuisine, et pour ses vertus médicinales ; Les Grecs recouvraient leurs yeux avec des feuilles d'aneth pour s'endormir plus vite. Au Moyen Age, l'aneth éloignait le mauvais sort.
- par les peuples [Israélites](#) en tant que plante potagère. (**Larousse des plantes médicinales, 2001**).

3.3-Caractéristiques botanique

3.3.1-Description de la plante

Plante herbacée annuelle, érigée pouvant atteindre 1,5 m de haut. La plante est glabre, vert foncé et légèrement striée de bleu au niveau supérieur, la racine est pivotante, longue et fine. Les tiges sont grêles, rondes et creuses, lisses, finement striées de bandes blanches et vertes.

Les feuilles sont alternes, de couleur bleu-vert ; les feuilles basales sont pétiolées, di- ou tripennatisées et se terminent en lanières filiformes ; elles portent une gaine courte, bordée de blanc ; seules les feuilles supérieures sont sessiles.

L'inflorescence est formée d'ombelles composées et plates pouvant atteindre jusqu'à 20 cm de diamètre. Les fleurs sont de très petite taille, radiale*, chacune composée de 5 sépales à limbe non développé, de 5 pétales jaune à pointe recourbée vers l'intérieur, de 5 étamines saillantes, de 2 styles courts, d'un ovaire infère et bicarpellaire.

Le fruit est un diakène comprimé au niveau de la face dorsale. À maturité les deux méricarpes se détachent l'un de l'autre (**Filliat, 2012**).

La figure 4 illustre les fleurs et les graines d'aneth.



Figure 4 : *Anethum graveolens* L. (Anonyme 3, 4).

3.3.2-Classification botanique

Nom scientifique : *Anethum graveolens* L. syn *Peucedanum graveolens*.

Nom commun : Aneth, Fenouil batârd, Fenouil puant (Français), bessbes ou habate hlawa (Bérbere), Al chabbte (Arabe).

Systematique

- **Règne :** Plantae
- **Division :** Magnoliophyta
- **Classe :** Magnoliopsida
- **Ordre :** Apiales
- **Famille :** Apiaceae
- **Genre :** *Anethum*
- **Espèce :** *Anethum graveolens* L.

3.3.3-Habitat

L'aneth est originaire de l'Europe du Sud, de l'Asie centrale et méridionale. A l'état sauvage, il pousse sur les friches. On le cultive notamment en Europe et en Amérique du Nord. (Larousse des plantes médicinales, 2001).

3.4-Huile essentielle d'aneth

Les graines de l'aneth contiennent jusqu'à 5% d'huile essentielle (carvone et limonène), des flavonoïdes, des coumarines, des xanthones et des triterpènes. (Larousse des plantes médicinales, 2001).

3.4.1-Les principaux constituants biochimiques de l'huile essentielle d'aneth

- Chromatographie phase gaz du lot NHE0086 :

Monoterpénones: carvone (**44.39%**), (E)-dihydrocarvone (0.74%),
(Z) dihydrocarvone (2.84%).

Monoterpènes: limonène (49.70%), α -phellandrène (0.34%), p-cymène (0.15%),
 α -terpinène (0.70%).

- Chromatographie phase gaz du lot NHE0266 :

Monoterpénones: carvone (**44.91%**), (E)-dihydrocarvone (0.76%),
(Z)-dihydrocarvone (2.97%).

Monoterpènes: limonène (49.34%), alpha-phellandrène (0.45%), para-cymène (0.14%). (**Anonyme 5**).

3.4.2-Les propriétés de l'huile essentielles d'aneth

- Anticatarrhale, mucolytique, décongestionne les poumons ;
 - Cholagogue, cholérétique : stimule les fonctions du foie et du pancréas ;
 - Eueptique : facilite la digestion et l'élimination des gaz ;
 - Diurétique ;
 - Anti-inflammatoire rénale ;
 - Antispasmodique ;
 - Favorise les règles ;
 - Action anticoagulante modérée. (**Anonyme 5**)

3.5-Principales utilisations

Usage culinaire

C'est une épice très utilisée en Allemagne , en Hongrie , en Pologne , en Russie , en Roumanie , en Scandinavie , mais aussi en Inde , et dans de nombreux autres pays du monde.

- les feuilles, fraîches ou séchées, sont employées pour aromatiser différentes préparations culinaires, notamment les salades , les poissons, les viandes et les sauces.
- les graines servent pour parfumer liqueurs et confitures.

Usage thérapeutique

Ses propriétés sont aussi stomachique, digestive, apéritive, carminative , antispasmodique , diurétique , anti-inflammatoire , galactagogue (lactation), calmante et préparant au sommeil.

- Utilisé en infusion, l'aneth constitue un excellent stimulant du système digestif .
- Ses graines, en infusion, permettent d'arrêter le hoquet , mal de tête , toux des enfants.

Autres indications : [dyspepsie](#) , [vomissements](#) d'origine nerveuse, [flatulences](#) , insuffisance hépatobiliaire, aide la [lactation](#) , gaz intestinaux, [météorisme](#) abdominal, [borborygme](#) , [spasmes](#) , [crampes](#) et en tant qu'antiseptique intestinal.

Dans l'histoire, il fut aussi utilisé pour l' [épilepsie](#) , et pour favoriser le [lait](#) des nourrices (chez les Grecs anciens), pour calmer les convives ayant trop bu dans les banquets ([Charlemagne](#)), pour ses vertus [aphrodisiaques](#) et contre les mauvais sorts (sorcières et mages du Moyen Âge), pour favoriser les capacités du [cerveau](#) ([XVIIe siècle](#)) (Anonyme 5).

3.6-Toxicologie

L'huile essentielle d'aneth *per os* peut entraîner une dépression du système nerveux central à type d'hypnotique faible et anticonvulsivant due à sa concentration en carvone et limonène. L'aneth contient des furanocoumarines qui sont des agents photosensibilisants pouvant entraîner une phototoxicité après exposition solaire (Filliat, 2012).

L'huile essentielle d'aneth bienfaisante en temps ordinaire peut s'avérer, en période de grossesse, toxique voire dangereuse pour l'enfant à venir. Les femmes enceintes doivent donc utiliser les huiles essentielles avec beaucoup de prudence et de circonspection (Anonyme 5).

CHAPITRE III: 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 β -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-Le stress oxydatif

1.1-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, etc...) mais aussi certains

dérivés réactifs non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxy-nitrite (**Bartosz, 2003. Halliwell et Whiteman 2004**) (Tableau 2).

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

Tableau 2 : Principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (**Bartosz, 2003**).

1.2-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**).

1.3- Radicaux libres

1.3.1-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), peroxy-nitrite ($ONOO^{\cdot}$) (**Novelli, 1997**).

1.3.2-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. $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$

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 : (1O_2), forme « excitée » de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité (**Hadi, 2004**).

1.3.3-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 de la respiration, 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 produits directement par les cellules phagocytaires activées. Le monoxyde d'azote, est produit par les systèmes enzymatiques (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 l'organisme, l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit 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**).

1.4-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 ; Kocchilin-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 OH^\bullet du groupement méthylène présent entre deux doubles liaisons d'acide gras polyinsaturés produit un radical carboné R^\bullet (OH^\bullet enlève un atome d'hydrogène du CH_2 puis les doubles liaisons subissent un réarrangement moléculaire conduisant à la formation de diènes conjugués), en présence d' O_2 le radical carboné est transformé en radical peroxy RO^\bullet_2 (**Martínez-Cayuela, 1995**).

b-la propagation :

Le radical $RO^{\bullet 2}$ enlève un hydrogène à un nouvel AGPI voisin qui à son tour produira un radical R^{\bullet} puis un radical $RO^{\bullet 2}$, une réaction en chaîne s'installe. En présence de métaux de transitions, 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 fragmentations 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'accumuleront 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**).

2-Les antioxydants (antioxygènes)

Comme leur nom l'indique, les antioxygènes sont des substances intervenant dans les processus d'oxydation des produits alimentaires dans le but d'empêcher ou de freiner l'action de l'oxygène moléculaire.

Les antioxydants sont des substances qui, ajoutées à de faibles doses à un produit naturellement oxydable à l'air, sont capables de supprimer, empêcher ou retarder les

processus d'oxydations en augmentant le temps au bout duquel il y a une altération décelable du produit (**Gunston et al., 1983**).

L'utilisation d'agent antioxydant est ancienne et a été pratiquée depuis longtemps de façon empirique. On s'est aperçu que certains végétaux étaient capables de retarder la détérioration des aliments à l'air (effet protecteur du bourgeon du peuplier, du bois de chêne, de sauge, du romarin). La branche de romarin introduite dans l'huile d'olive n'a pas qu'un effet décoratif, elle protège également contre l'oxydation.

2.1-Définition

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (**Boyd et al., 2003**). Ce 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**).

Ils agissent en formant des produits finis non radicaux. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation. En réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (**Vansant, 2004**) (**Figure 5**).

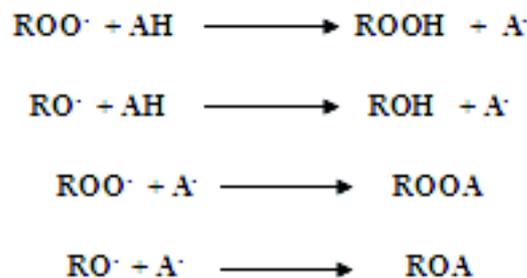


Figure 5: Mécanisme d'action d'un antioxydant AH.

2.2-Types d'antioxydants

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

2.2.1-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.

2.2.2-Antioxydants naturels

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 libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement (**Maydani, 2000**)^a et la diminution de l'athérosclérose (**Maydani, 2000**)^b. 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 oxydants 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 dans les aliments. Cette vitamine hydrosoluble est capable de réagir directement avec les radicaux superoxydes, hydroxyles et l'oxygène singulet et peut jouer le rôle d'antioxydant. L'acide ascorbique agit comme un piègeur $2O_2^{\cdot -} + \text{acide ascorbique} + 2H^+ \rightarrow \text{acide ascorbique} + 2H_2O$ (**Wang et al., 2000**).

2.3-Classement des antioxydants selon leurs mécanismes d'action

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

2.3.1-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 synthèse: le Butyl Hydroxy Anisole (**BHA**) appartiennent à cette classe d'antioxydants (**Kortenska et al., 2002**).

2.3.2-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 faibles concentrations : 0.02- 0.03% (**Decker et al., 1998**).

Les flavonoïdes (un 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**).

2.3.3-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 CO₂) (Eymard, 2003).

2.3.4-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 ainsi que 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 3 illustre quelques exemples d'antioxydants synthétiques ainsi que les effets qu'ils provoquent :

Tableau 3: Antioxydants synthétiques et leurs effets sur la santé humaine

Antioxydant	Effet
Gallate de propyle. Gallate de d'octyle. Gallate de dodécyle.	A forte dose, sensibilisation cutanée, notamment, réaction de la muqueuse buccale.
BHT (Butyl Hydroxy Toluène). BHA (Butyl Hydroxy Anisol).	Élévation du taux de lipides et de cholestérol dans le sang. Hypertrophie du foie et retard de la croissance pour le BHT. Développement de réactions allergiques. Développement de tumeurs.

(Moll et Moll, 1998).

2.3.5-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 (O₂^{-•});
- 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 Moll, 1998).

2.4-Mesure du niveau d'oxydation

Il existe de nombreux tests permettant d'évaluer le niveau d'oxydation, mais leur corrélation avec la détérioration organoleptique ou avec la durée de conservation possible n'est pas toujours satisfaisante (**Cheftel, 1977**).

Vu le nombre élevé de méthodes de mesures de l'oxydation, nous citons les principales :

Indice de peroxyde

Il est déterminé par deux méthodes :

- **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 Moll, 1998**). C'est la méthode **AFNOR T60-200**.
- **Méthode colorimétrique** : les peroxydes présents dans le milieu oxydent le Fe^{+2} et Fe^{+3} qui est dosé sous forme de chlorure ou de thiocyanate ferrique (**Mitsuda et al., 1966**).

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 Moll, 1998**).

CHAPITRE IV : Activité 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 substances 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 large gamme de longueurs d'onde: les rayonnements infrarouge et les ultraviolet, les rayons X, les rayons γ , etc.

1.2-Les agents chimiques

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

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 (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 ... ect.

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:

2.1.1-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.

Pendant 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 6 : Illustration de la méthode des microatmosphères

2.1.2-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.

a-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).

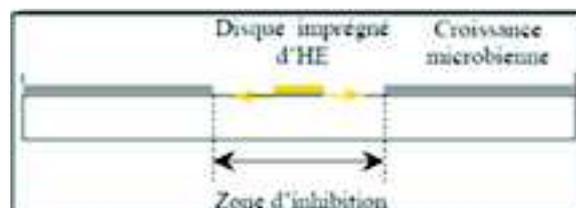


Figure 7 : Schéma simplifié du principe de la méthode des aromatogrammes.

b-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 consistait 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 préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (**Dorman et Deans, 2000**).

c-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.

2.1.3-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.

Cette technique consiste à inoculer, par un *inoculum* standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne.

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**).

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'*inoculum* bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle.

2.1.4-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, d'homogénéité et 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 de 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-Nature de l'agent antimicrobien

Les différents agents ont une efficacité et un spectre d'activité variable. Pour les agents physiques, l'activité microbicide augmente souvent avec la dose alors que pour les agents chimiques les effets seront d'abord bactériostatiques puis bactéricides. L'activité de certains agents dépend de leur stabilité ; pour d'autres (hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène). L'activité est liée à leur décomposition.

3.3-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-Les propriétés des agents antimicrobiens

4.1-Critères de choix

Le choix d'un agent désinfectant est délicat, ne sont évidemment utilisable dans l'industrie alimentaire ou traitement de l'eau que les agents qui n'entraînent pas de toxicité. Ce problème se pose peu pour les traitements physiques. Plusieurs autres conditions sont généralement requises : large spectre d'activité adapté à la flore du produit, faible coût, facilité d'utilisation (utilisable à faible concentration, ou facilement éliminable par rinçage,

ou ne laissant pas de sous produits dangereux), absence de pouvoir corrosif,... etc. L'addition de produits chimiques (agents de traitements désinfectants ou conservateurs) est sévèrement réglementée.

4.2-Classification

Les rôles des agents antimicrobiens est d'inhiber la croissance des microorganismes ou de les détruire. Il existe de nombreux moyens de lutte de nature physique, chimique ou biologique. Les principaux traitements sont classés en traitement d'éliminations, de destructions et de stabilisations. Il faut distinguer les produits microbicides (germicides ou bactéricides) qui agissent par destruction (mort) des germes et les microbiostatiques (ou bactériostatiques) qui agissent sur leurs développement (stabilisation). Les produits utilisés pour les traitements des eaux sont microbicides, alors que dans l'industrie alimentaire on peut utiliser des agents, soit au cours de la fabrication (microbicides), soit dans le produit fini (microbicides et stabilisants). Des produits chimiques sont utilisés aussi pour le nettoyage du matériel et des locaux.

On appelle désinfectant des agents capables de détruire les germes pathogènes (ou non) dans l'environnement (eau, sol, air,... etc.). Ce terme est généralement réservé aux substances agissantes sur des objets inertes. Il est possible d'utiliser les désinfectants à concentration et temps de contact élevés. On appelle antiseptique des agents capables de détruire des microorganismes ou d'arrêter leurs développements (microbicides ou microbiostatiques). Ils sont habituellement utilisés en action locale chez les êtres vivants. Les désinfectants et antiseptiques ne sont généralement pas administrés par voie orale en raison de leurs toxicités. On appelle agents de conservation ou conservateurs alimentaires des substances additionnées aux aliments : ils ne sont pas toxiques pour le consommateur aux doses utilisées. On appelle agents chimio thérapeutiques des substances actives sur les microorganismes mais peu ou pas toxiques aux doses employées, pour les autres cellules humaines ou animales et qui sont utilisées en médecine.

4.3-Agents d'éliminations

L'élimination des microorganismes peut être obtenue par des procédés mécaniques. Le lavage est un moyen simple mais toujours efficace : des microorganismes fixés ou « ou cachés » ne sont pas forcément éliminés. L'efficacité peut être améliorée à l'aide d'agent tensio actifs ou de produits désinfectants (eau chlorée). La décantation (éventuellement après un traitement de floculation ou d'agglutination) et la centrifugation au dessus de 5000g permettant de diminuer la charge microbienne de produits liquides : ces traitements permettent de faciliter des traitements ultérieurs. La filtration est également utilisable à condition que le milieu ne soit pas visqueux et ne soit pas chargé de matière en suspension. Elle nécessite l'emploi de filtres organiques ou minéraux (filtres en céramiques, verre frité, membranes en acétate de cellulose ou en matériaux divers) dont le diamètre des pores est inférieur aux dimensions des microorganismes. L'avantage majeur de ces produits est de ne pas modifier les qualités organoleptiques des produits traités.

5- Activité antimicrobienne des HE

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

5.1-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 testées.

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).

5.1.1-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 testé 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 épices parmi les onze 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).

5.1.2-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 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).

5.1.3-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, prémices 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**).

5.2-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.

5.2.1-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 alimentaires pour prévenir la présence des aflatoxines, des ochratoxines ou des stérignatocystines.

5.2.2-Activité sur les levures

Les levures largement réparties dans la nature, sont capables d'altérer plusieurs types d'aliments tels que: les vins, le fromage, le vinaigre, les jus, les fruits, les salades, le sucre et la viande, causant ainsi des changements de l'odeur, couleur, goût et texture (**Ray, 1996 in 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**).

6-Mode d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004**). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une

combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (**Figure 8**).

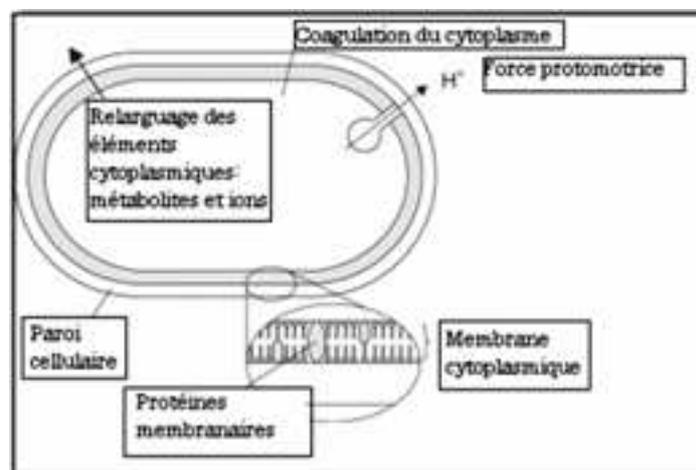


Figure 8 : Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).

La principale caractéristique des molécules présentes dans les huiles essentielles est leur hydrophobicité. Elle permet leur solubilisation dans les membranes, ce qui provoque une déstabilisation de la structure et une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema *et al.*, 1994). Ces modifications entraînent une fuite d'ions et de composés intracellulaires (Carson *et al.*, 2002 ; Ultee *et al.*, 2002). Si la perte de matériel est trop importante ou si les éléments cytoplasmiques relargués sont indispensables à la survie de la bactérie, cela entraîne la mort cellulaire.

Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes a été décrit dans la littérature. Le carvacrol et le thymol semblent capables d'augmenter la perméabilité membranaire (Lambert *et al.*, 2001).

L'action du thymol a été étudiée sur des membranes artificielles (Trombetta *et al.*, 2005). Son efficacité dépend de la composition et de la charge nette de la membrane. Lorsqu'il pénètre dans la membrane plasmique, il semble altérer sa perméabilité et entraîner une perte du matériel intracellulaire.

Les modes d'action des huiles essentielles et de leurs principaux constituants, décrits jusqu'à présent, semblent tous affecter la paroi ou la membrane cytoplasmique. Cependant, la variabilité chimique des huiles essentielles laisse présager l'existence de molécules pouvant agir par de nouveaux mécanismes cellulaires.

7-Comparaison entre les antibiotiques et les huiles essentielles

L'étude comparative entre les antibiotiques et les huiles essentielles est représentée dans le tableau 4.

	Les antibiotiques	Les huiles essentielles
Historique	L'apparition des antibiotiques dans l'évolution globale de l'humanité ne représente pas la durée d'un « clin d'œil »	L'usage des HE est une constante retrouvée dans toutes les ethnies à toute époque et surtout les continents.
Chimiquement	Constitué d'une molécule unique	Sont constituées de multiples molécules leur conférant des propriétés variées.
Origine	Ils sont issus d'êtres vivants, mais principalement des moisissures hétérotrophes, tirant leur énergie de la dégradation de substances.	Les essences sont issues du métabolisme de plantes supérieures, chlorophylliennes, donc autotrophes.
Resistances des microorganismes	Dans la mesure où l'antibiotique est constitué d'une seule molécule, il est aisé pour une bactérie de synthétiser une enzyme ou une autre molécule le rendant inactif.	Les microorganismes sont incapables de rendre les HE inactives.
Toxicité	Certaines molécules présentent une toxicité sévère.	Rarement toxique

Tableau 4: Représentation des différences existant entre les huiles essentielles et antibiotiques. (Anonyme 7).

8-Facteurs influençant l'activité antimicrobienne

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

8.1-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.

8.2-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.

9-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**).

D'après **Caillet et Lacroix (2007)**, certains facteurs comme la température, les conditions de stockage, le pH ou la composition de l'aliment, peuvent avoir une influence sur l'action des HE. Il est établi que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage ou encore de la quantité d'oxygène dans l'emballage. Cela est d'autant plus intéressant que les quantités d'huile nécessaires pour le contrôle de la croissance bactérienne dans les aliments conservés à basse température pourraient être réduites. Il est également prouvé qu'une même huile sera plus efficace dans un aliment pauvre en gras et/ou en protéines. Les fortes teneurs en eau et en sels d'un aliment vont aussi favoriser l'action de l'HE, alors qu'une structure gélatineuse va au contraire la limiter.

Etude expérimentale

CHAPITRE I : Matériels et méthodes

1-Matériel végétal

Les plantes (tableau 5) que nous avons utilisées lors de notre expérimentation sont: La sauge (*Salvia officinalis*.) provenant de la région de Bouderbala daïra de Lakhdaria wilaya de Bouira, la rue des montagnes (*Ruta montana*) provenant de la région de Tablat et l'aneth (*Anethum graveolens*) provenant des environs de Birkhadem.

Tableau 5:Le matériel végétal utilisé.

Espèces	Parties utilisées	Etat	Date de récolte
<i>Salvia officinalis</i>	Rameaux et feuillés	Frais	Mai 2012
<i>Ruta montana</i>	Feuilles et tiges	Frais	Juin 2002
<i>Anethum graveolens</i>	Fruits matures	Frais	Août 2012

2-Elaboration des coupes histologiques

La localisation des organes producteurs des huiles essentielles des parties aériennes des plantes étudiées permet d'appréhender les mécanismes mis en jeu lors de son extraction. Pour cela, des coupes transversales à main levée sont effectuées sur les rameaux feuillés, feuilles, tiges et fruits des espèces étudiées. Les organes sont disposés entre deux tranches de moelle de sureau pris entre le pouce et l'index, afin obtenir des coupes très fines pour pouvoir les observer au microscope photonique.

Les coupes ont été préparées au niveau du laboratoire de botanique de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique. On fait passer ces coupes dans différents bains :

- **Bain n°1:** Solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel à 12°) pendant 20 minutes pour vider les cellules de leur contenu.
- **Bain n°2:** Eau distillée pendant 1 à 5 mn pour rincer l'eau de javel.
- **Bain n°3:** Acide acétique à 5% pendant 5 mn afin de faciliter la coloration des parois.
- **Bain n°4:** Eau distillée pendant 1 minute pour le rinçage.
- **Bain n°5 :** Colorant (Carmino-vert) pendant 1 minute pour différencier les parois celluloseux (rose) des parties lignifiées (vert).
- **Bain n°6 :** Eau distillée.

Ensuite, les coupes sont disposées entre lame et lamelle et observées à l'aide d'un microscope photonique de type AUS JENA JENALUMAR. Enfin, les meilleures coupes sont photographiées.

3-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.

3.1-Protocole expérimental d'extraction

100 g de matière végétale constituée des parties aériennes, 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 (Na_2SO_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.

3.2-Rendement de l'extraction

Le rendement en HE de différentes méthodes. Dans ce travail nous avons considéré celle du rapport entre le volume de l'huile récupérée (V_{HE}) et la masse de la matière végétale sèche (Mv).

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

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

Avec:

Rdt%: Rendement en HE

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

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

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.

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 flaveur.

4.2-Indices physico-chimiques

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

4.2.1-Densité relative à 20°C: Norme NF T 75 – 111

4.2.2-Indice de réfraction à 20°C: Norme NF T 75 -112

5-Analyse qualitative et semi-quantitative des huiles essentielles par CPG et CPG/SM

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

5.1-Analyse qualitative des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse seule (CPG)

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 CP. Chrompack. 9002. Colonne capillaire de phase stationnaire DB5 non polaire. Longueur 30 mètres; diamètre interne 0.32 mm. Programmation de la température 50°C en isotherme pendant 3 minutes puis augmentation de la température à raison de 2°C/min jusqu'à 220°C; Mode d'injection split avec un rapport de division de 1/50 ; Température de détection 280°C; Pression 30 K Pascal; Gaz vecteur Azote; Débit du gaz vecteur 1 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'alcane (C6 - C24) est injecté dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon.

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

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

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;

5.2-Analyse semi-quantitative des HE par CG/SM

Cette analyse a été faite au laboratoire de chromatographie au centre de recherche et de développement (C.R.D.) de **SONATRACH** (Boumerdes) selon les conditions opératoires suivantes:

Chromatographie phase gazeuse (C.P.G.)

Appareil du type HP6890 N(HP Agilent technologies). Colonne: HP 5-MS (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: helium. Débit du gaz vecteur: 1 ml/ min. Volume injecté: 0,2 µL

Spectrométrie de masse:

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

6-Evaluation de l'activité antioxydante

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

6.1-Activité de piégeage du radical DPPH (2,2-Diphényl-1- picrylhydrazyl)

6.1.1-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 le méthanol contenant le radical libre DPPH[•] (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) à température ambiante.

Dans ce test le piégeage du radical DPPH[•] 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 50** est souvent utilisée.

6.1.2-Mode opératoire

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

La solution de DPPH a été préparée à une concentration de 60 µM dans du méthanol absolu. Le test du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Cuendet et al. (1997)**, **Burits et Bucar (2000)**, où 25 µl de chacune des dilutions des HE testées sont mélangés avec 975 µl de la solution méthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30 mn à la température de 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 blanc : Absorbance du témoin (Solution de DPPH)

A ech : Absorbance de l'échantillon

6.2-Pouvoir réducteur

6.2.1- 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)**

6.2.2-Mode opératoire

L'estimation du pouvoir réducteur des échantillons étudiés est obtenue selon le protocole expérimental représenté sur la figure 9:

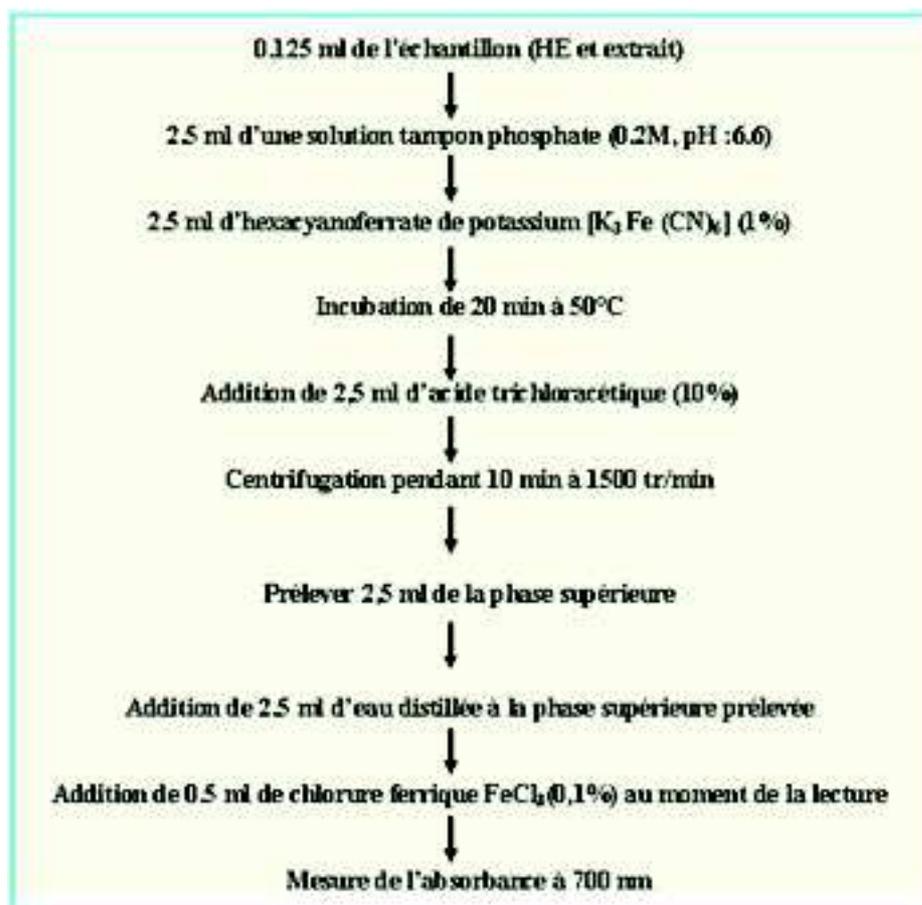


Figure 9 : Protocole de mise en œuvre du test du pouvoir réducteur.

7-Evaluation activité antimicrobienne

7.1-Etude qualitative : détermination de l'effet inhibiteur des HE

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HE étudiées, 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)**.

7.1.1-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 de l'HE à tester, à la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri et ensemencée 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 (Figure10).

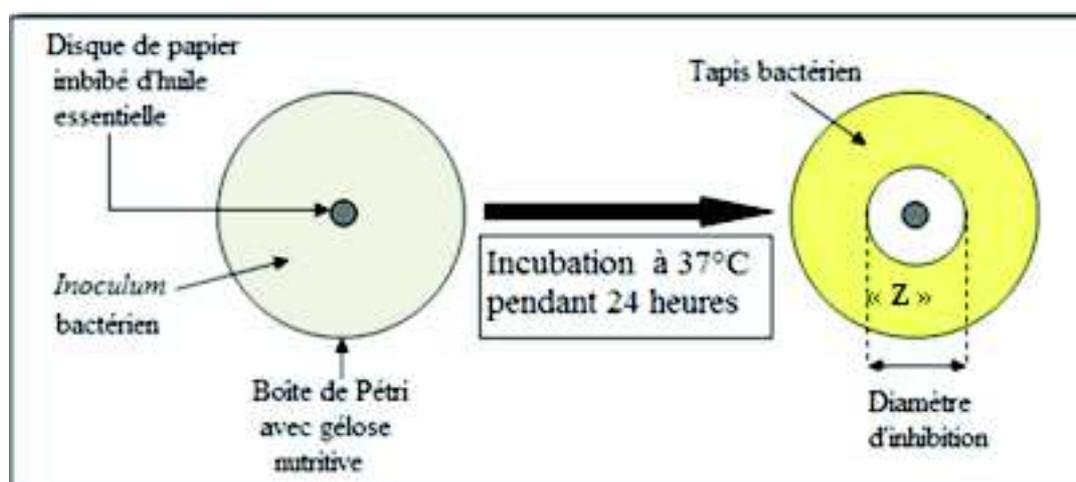


Figure 10 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

7.1.2-Micro-organismes testés

L'activité antimicrobienne des HE étudiées a été testée sur 5 micro-organismes (4 bactéries pathogènes et 1 levure), qui sont tous de souches pures et issues de la collection du **CRD-SAIDAL**. Le tableau 6 illustre les principales infections causées par ces micro-organismes.

Souche	n° ATCC	Gram	Famille	Principales infections causées
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	Micrococcaceae	- Gastro-entérites ; - Infections urinaires ; - L'ostéomyélite et l'arthrite.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	Pseudomonadaceae	- Crampes abdominales ; - Troubles digestifs.
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	Enterobacteriaceae	- Diarrhées dysentériques ; - Gastro-entérites.
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	Bacillaceae	- Gastro-entérites.
<i>Candida albicans</i>	24433	/	Cryptococcaceae	- Lésions cutanées ; - Infections oesophagiennes - Infections génitales.

Tableau 6: Caractéristiques des souches microbiennes testées

7.1.3-Protocole expérimental

7.1.3.1-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.

7.1.3.2-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 trouvée 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.

7.1.3.3-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. Onensemence 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 paillasse.

7.1.3.4-Les huiles essentielles utilisées

Pour l'étude de l'activité antimicrobienne, les huiles essentielles employées sont à l'état pur pour pouvoir les utiliser dans la technique de l'aromatogramme.

7.1.3.5-Dépôt des disques

À l'aide d'une micropipette, en utilisant des cônes stériles, on prélève 20 à 30 µl d'huile essentielle pure, 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. Et enfin, incubé à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures.

7.1.3.6-Lecture des résultats

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

7.2-Etude quantitative : détermination de la CMI & CMB des HE

7.2.1-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

7.2.1.1-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 antimicrobiens en l'occurrence les HE étudiées dans ce cas.

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

7.2.1.2-Protocole expérimental

a-Préparation de l'inoculum microbien

A partir de culture jeune de 18h pour les bactéries et de 48h pour la levure, 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 *Bacillus 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 série 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 boîtes de petri, laisser solidifier. (Pour les bactéries, chaque boîte 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 μ l.

N.B : un témoin positif (+) ne contenant que le milieu (MH et/ou SAB) additionné de Tween 80 plus 3 μ 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 la levure.

d-Lecture des résultats

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

La figure 11 illustre le protocole expérimental utilisé pour la détermination CMI.

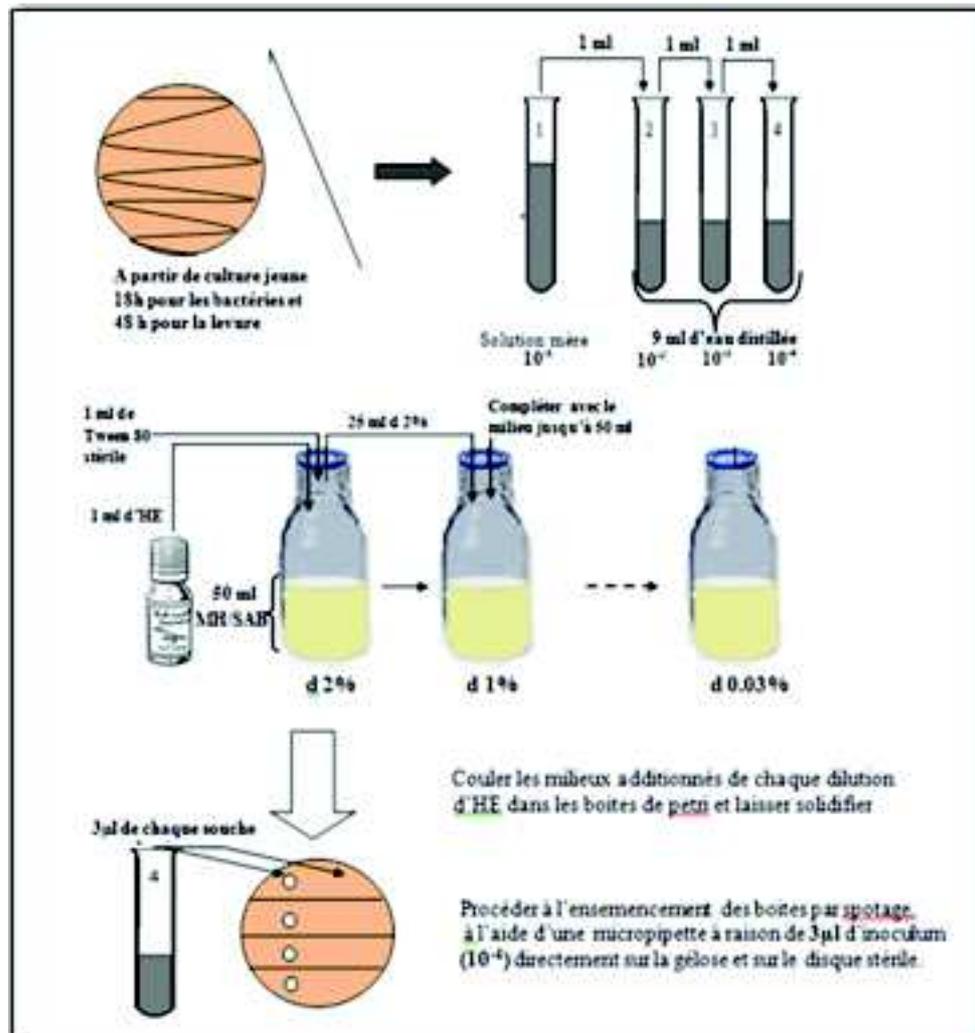


Figure 11: Méthode de détermination de la CMI en milieu solide.

7.2.2-Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

7.2.2.1-Principe

Le caractère bactéricide des HE étudiées par la détermination de la CMB qui 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 la levure.

Cependant, étant donné que la détermination de la CMB est peu courante, cette technique ne sera développée dans cette étude que pour deux des HE testées à savoir : *Salvia officinalis* et *Ruta montana*.

7.2.2.2-Protocole expérimentale

La détermination de la CMB se fait comme suit :

- A partir de la CMI déterminée pour les deux HE, on prélève les disques ensemencés qu'on va repiquer sur 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 la levure.
- La lecture des résultats se fait à l'œil nu, en indiquant la plus faible concentration d'HE traduisant par l'absence toute croissance bactérienne visible.

N.B : la CMB \leq la CMI.

Pour chaque expérience, 3 répétitions ont été réalisées.

8-Analyse statistique

L'analyse statistique de la variance à deux facteurs (ANOVA 2) des résultats obtenus pour l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de nos HE a été réalisée avec le logiciel **SPSS 20.0**

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

CHAPITRE II : Résultats et discussions

1-Les espèces étudiées

1.1-La sauge

Les coupes transversales observées sur les parties aériennes (rameaux feuillés) montrent essentiellement la présence des poils tecteurs et sécréteurs (Figure 12 et 13). Le poil glandulaire caractéristique de la famille des labiées se situe à la périphérie de la feuille (Figures 14). Seuls les poils glandulaires et sécréteurs ont l'aptitude de biosynthétiser, de sécréter et de retenir de l'HE en quantité significative (**Dubey et al., 2003; Wagner et al., 2004**).

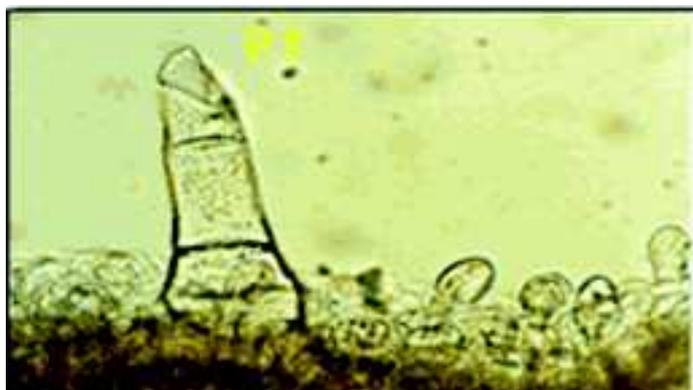


Figure 12: Coupe transversale de la feuille de sauge observée au microscope photonique mettant en évidence un poil tecteur (PT) (Gr. : 25 x 3,2).

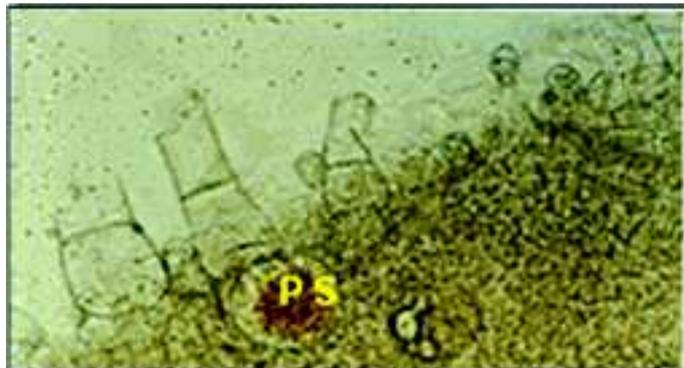


Figure 13: Coupe transversale de la tige de sauge observée au microscope photonique mettant en évidence un poil sécréteur (PS) (Gr. : 25 x 3,2).

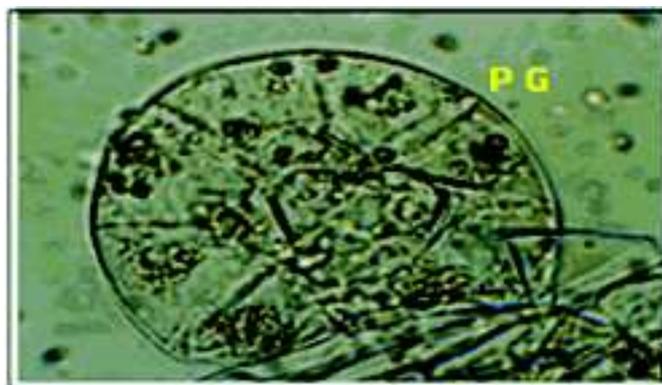


Figure 14: Coupe transversale de la feuille observée au microscope photonique mettant en évidence un poil glandulaire (PG) (Gr. : 100 x 3,2).

1.2-La rue de la montagne

Les photos des coupes transversales réalisées sur les parties aériennes (tiges et feuilles) de *Ruta montana* montrent essentiellement la présence de poches sécrétrices, ceci est illustré par les figures 15 et 16.

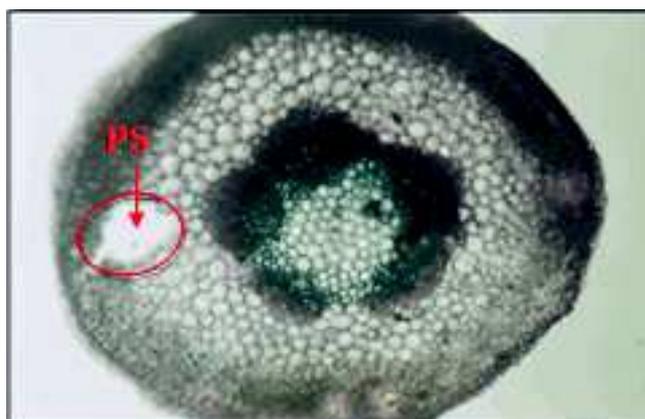


Figure 15 : Coupe transversale de la tige observée au microscope photonique mettant en évidence une Poche sécrétrice (PS) (Gr.12.5x 3.2).

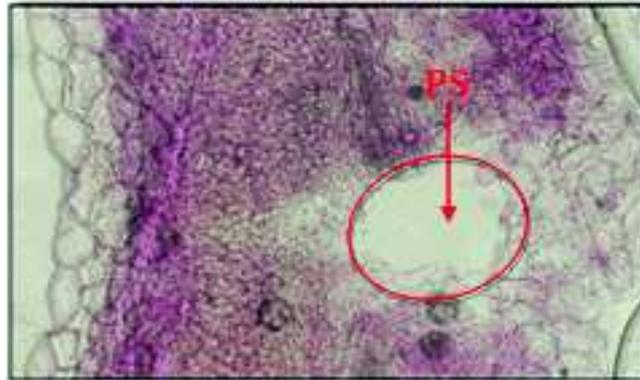


Figure 16 : Coupe transversale de la feuille de *Ruta montana* montrant la présence d'une Poche sécrétrice (Gr. : 12.5x3.2)

La figure 17 représente le schéma d'une poche glandulaire endogène d'une feuille de rue.

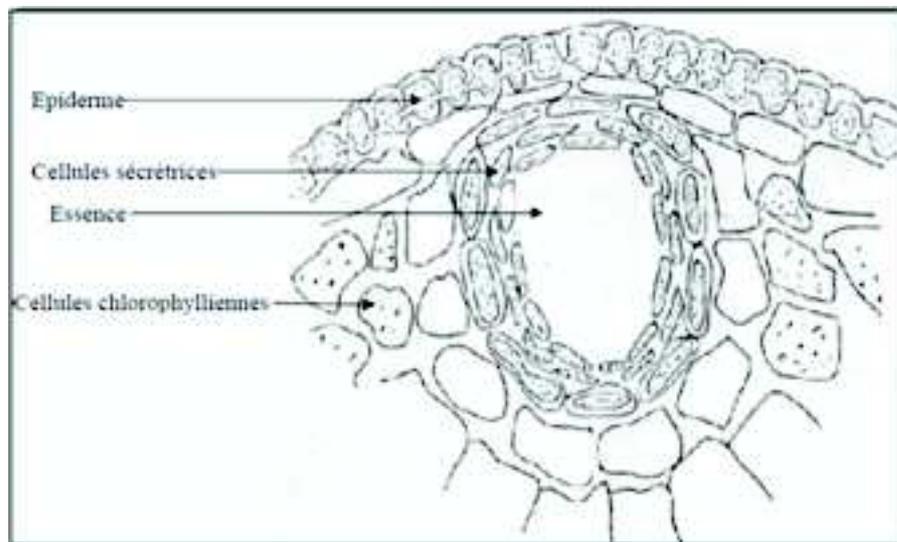


Figure 17 : Schéma d'une poche glandulaire endogène d'une feuille de rue (Gueorguiv, 1980).

1.3-L'aneth

Les Apiaceae possèdent, dans tous leurs organes, des canaux sécréteurs de gomme, résine ou d'huile essentielle et certaines d'entre elles sont très aromatiques (**Anonyme 6**).

Les observations effectuées à partir des coupes histologiques des tiges et du fruit d'*Anethum graveolens* révèlent la présence de canaux sécréteurs (CS) tout autour des tiges et des feuilles comme l'illustrent les figures 18 et 19.

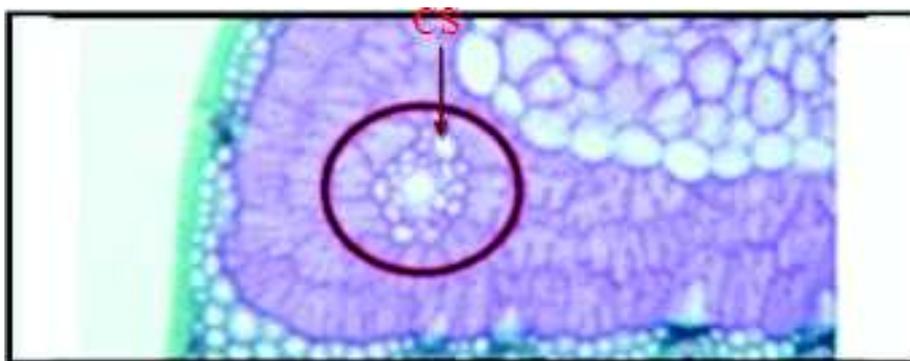


Figure 18 : Coupe transversale du fruit d'*Anethum graveolens* montrant la présence d'un canal sécréteur (CS) (Gr. : 12.5 x 3.2).

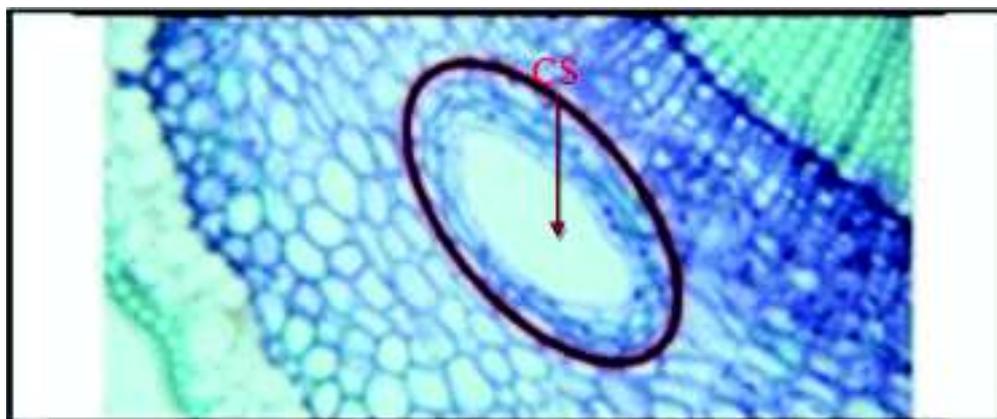


Figure 19 : Coupe transversale de la tige d'*Anethum graveolens* montrant la présence d'un canal sécréteur (CS) (Gr. : 25 x 3.2).

2-Rendement de l'extraction des l'huiles essentielles des plantes étudiées

L'extraction des HE de la sauge, de la rue et de l'aneth a fourni les rendements reportés dans le tableau 7 et exprimés en ml pour 100 grammes de matière sèche.

Tableau 7: Rendement en HE des espèces étudiées (ml/100 g. matière végétale).

Espèces	Rendement (%)
<i>Salvia officinalis</i>	0.65 %
<i>Ruta montana</i>	0,80 %
<i>Anethum graveolens</i>	0.88%

Pour la sauge

Le rendement obtenu est inférieur à ceux **Bouaziz et al., (2009)** en Tunisie, où ils ont noté un rendement de **0.72%**, de même les résultats rapportés par **Rasmy et al., (2012)** en Egypte : le rendement a atteint **1.2 ml/100 g** de matière sèche c'est-à-dire **1.2%**.

Cependant, le rendement obtenu par **Hussain et al., (2011)** à partir d'un échantillon de *Salvia officinalis* provenant du Pakistan est de **0.46%**.

Selon Rami et Zheng Guo, (2011), La teneur en huile essentielle de la plante *Salvia officinalis* collectée en Syrie est de 0,52% à 100 m d'altitude (région d'Al-bahloia) et de 0.14% à 500 m d'altitude (région d'Al-Hafa). Cette étude a mis en évidence l'importance de l'altitude sur les rendements d'extraction en huile essentielle.

Pour la Rue des montagnes

Il apparaît que la teneur en HE de notre échantillon est nettement inférieure à ceux enregistrés par (Zellagui et al., 2012) pour la même espèce cueillis dans deux régions d'Algérie : Oum El Bouaghi et Mila respectivement 4,5% et 1,0%, l'hydrodistillation des parties aériennes de *Ruta montana* provenant de la région d'Oran a donné un rendement en HE de 1,63% (Kambouche et al., 2008), alors que celui de *Ruta graveolens* L. d'Iran, obtenue par la même technique d'extraction est de 0,4% (Soleimani et al., 2009).

Selon Dob et al., (2008), le rendement en huile essentielle des parties aériennes de *Ruta chelepensis* est de 0,27%. Mejrid et al., (2010), ont obtenus une teneur en HE pour cette même espèce en Tunisie de l'ordre de 5.51%.

Pour l'aneth

Le rendement obtenu est inférieur à celui enregistré par Vokk et al., 2011 qui ont travaillé sur la même espèce en Estonie où ils ont remarqué un rendement en HE des feuilles d'*Anethum graveolens* de 0,65% (en été) et 0,56% (en hiver), alors que la teneur en HE extraite à partir de la graine est nettement supérieure (3,5%).

La teneur en HE produite par la graine est beaucoup plus importante que celle obtenue à partir des aux feuilles d'aneth (Callan et al., 2007).

Radulescu et al., 2010 qui ont travaillé sur les parties aériennes d'*Anethum graveolens* ont mentionné les rendements cités dans le tableau 8 :

Tableau 8: Rendements d'extraction en HE d'*Anethum graveolens*

Rendements		
Feuilles	Fleurs	Fruits
1,2%	3,2%	3,4%

(Radulescu et al., 2010).

Babri et al., 2012, ont mentionné un rendement en HE d'aneth issue des graines (1,45%) nettement supérieur à celui obtenu dans le cas de notre huile.

Les conditions édapho-climatiques, la période de récolte (floraison ou état végétatif) ainsi que les conditions d'entreposage sont a priori considérées comme responsables des variations des rendements en huile essentielle.

3-Caractéristiques physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques des huiles essentielles des espèces étudiées sont reportés dans le tableau 09.

Tableau 9: Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques de l'HE de *Salvia officinalis*, de *Ruta montana* et d'*Anethum graveolens*

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

Caractéristiques des HE	Aspect	Densité relative à 20°C	Indice de réfraction à 20°C
<i>Salvia officinalis</i>	Liquide mobile Incolore à jaune claire Odeur caractéristique.	0,923	1,468
<i>Ruta montana</i>	Liquide mobile Couleur jaune pâle Odeur caractéristique, désagréable et prononcée	0,804	1,430
<i>Anethum graveolens</i>	Liquide mobile Couleur jaune Claire Odeur caractéristique d'anis	0.802	1.477

A titre comparatif, l'étude menée par **Hussain et al., (2011)** sur la sauge, rapporte dans le tableau10 les caractéristiques physicochimiques suivantes :

Tableau 10: Caractéristiques physicochimiques de l'HE de la sauge.

Huiles Essentielles	Densité relative à 25°C	Indice de réfraction à 25°C
<i>Salvia officinalis</i> (1)	0,912	1,4620

(1) Saugue de Pakistan.

A notre connaissance, les études concernant les caractères physico-chimiques et organoleptiques de l'HE de *Ruta montana* et d'*Anethum graveolens* sont limitées.

4-Analyse chromatographique des huiles essentielles

L'identification des composés des trois 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'huile essentielle de la sauge

L'analyse par CPG seule et CG/SM de l'HE de la sauge provenant de Bouderbala Daira de **Lakhdaria wilaya de Bouira** nous a permis d'identifier 56 composés représentant **96,1%** de l'ensemble des composés de l'HE analysée.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 11 et les figures 20 et 21.

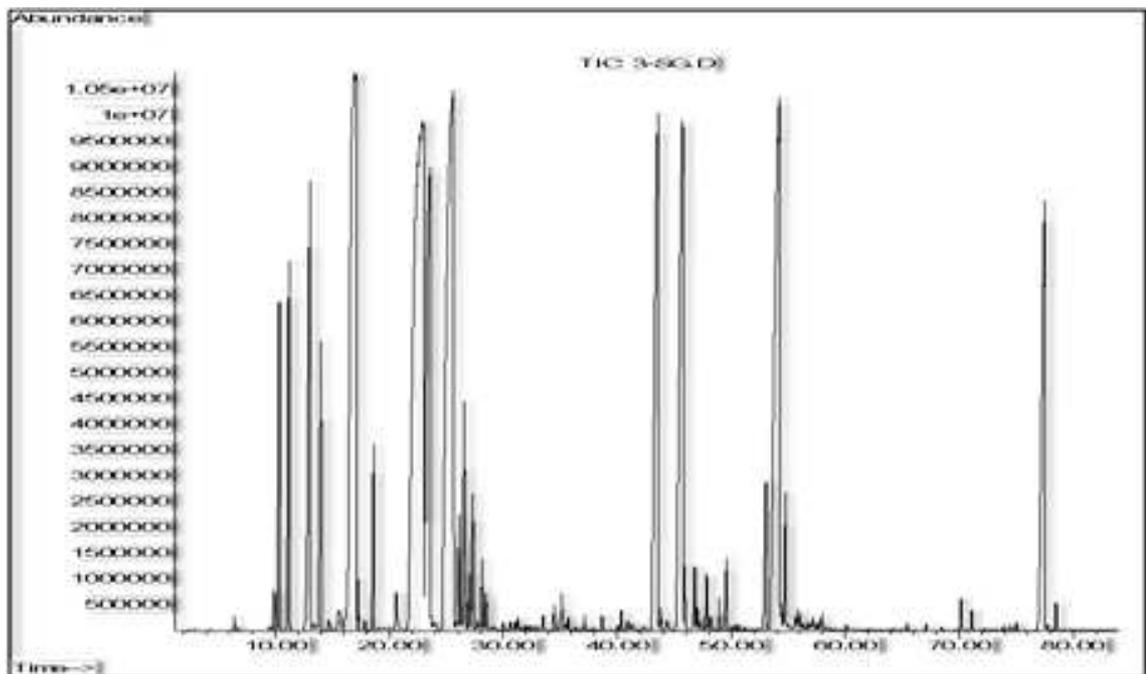


Figure 20 : Chromatogramme de l'HE extraite à partir des rameaux feuillés de *Salvia officinalis*

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

N°	Composé	*KI	%	**Identification
1	α-Sabinène	887	0,1	KS-SM
2	Thuyonène	933	1	KS-SM
3	o-Thujonène	938	0,2	KS-SM
4	α-Pinène	936	1,8	KS-SM-Sd
5	Camphène	950	1,8	KS-SM-Sd
6	sabinène	973	0,1	KS-SM
7	β-Pinène	978	3,9	KS-SM-Sd
8	1-Cineol-3-ol	990	0,1	KS-SM
9	β-Nerone	989	1,7	KS-SM-Sd
10	α-Pinelladiène	1004	0,1	KS-SM-Sd
11	δ-3-Caryène	1017	1	KS-SM
12	o-Terpinène	1024	0,3	KS-SM-Sd
13	p-Cymène	1033	0,1	KS-SM
14	1-8-Cineol	1038	13,0	KS-SM-Sd
15	cis-β-Cimène	1048	0,1	KS-SM
16	trans-β-Cimène	1061	1	KS-SM
17	γ-Terpinène	1067	0,8	KS-SM-Sd
18	cis-Sabinène hydrate	1087	1	KS-SM
19	Terpinolène	1105	0,2	KS-SM-Sd
20	o-Thujonène	1114	18,7	KS-SM
21	β-Thujonène	1124	6,2	KS-SM
22	o-Campholène aldéhyde	1144	1	KS-SM
23	Camphor	1158	14,1	KS-SM-Sd
24	Isobornol	1162	1	KS-SM-Sd
25	trans-Pin camphène	1166	0,5	KS-SM
26	endo-Bornol	1177	1,5	KS-SM
27	γ-Terpinolène	1183	0,8	KS-SM-Sd
28	p-Cymène-4-ol	1190	0,1	KS-SM
29	o-Terpinolène	1195	0,3	KS-SM-Sd
30	Myrcène	1284	0,2	KS-SM
31	Bornyl acétate	1290	0,1	KS-SM-Sd
32	Thymol	1300	0,2	KS-SM-Sd
33	Caryophyllène	1370	0,1	KS-SM-Sd
34	α-Cadinène	1576	0,1	KS-SM
35	α-Vlasène	1384	1	KS-SM
36	α-Copaène	419	0,1	KS-SM
37	β-Bourbonène	1454	1	KS-SM
38	β-Caryophyllène	1461	6,4	KS-SM-Sd
39	α-Humulène	1477	6,5	KS-SM
40	Allo-α-cedrol	1480	0,3	KS-SM
41	γ-Aurone	1486	0,3	KS-SM
42	Oenanthène D	1488	0,1	KS-SM
43	β-Selinène	1499	1	KS-SM
44	Lédène	1513	0,3	KS-SM
45	α-Maurodiène	1524	0,1	KS-SM
46	γ-Cadinène	1532	0,1	KS-SM
47	δ-Cadinène	1540	0,4	KS-SM
48	α-Cadinène-1,4-diène	1580	1	KS-SM
49	cis-α-Cadinène	1590	1	KS-SM
50	Caryophyllène oxide	1650	0,9	KS-SM-Sd
51	Vinidifolène	1652	10,2	KS-SM
52	ε-Cadinol	1844	1	KS-SM
53	β-Eudesmol	2057	1	KS-SM
54	α-Cadinol		1	KS-SM
55	Hexahydropharményl acétate		1	KS-SM
56	Magnolol		3,7	KS-SM
	Composé identifiés (%)		96,1	
	Monoterpènes		10,6	
43	β-Bourbonène et α-cedrol	1499	44,9	KS-SM
44	Lédène	1513	0,3	KS-SM
45	α-Maurodiène	1524	0,1	KS-SM
46	γ-Cadinène	1532	0,1	KS-SM
47	δ-Cadinène	1540	0,4	KS-SM
48	α-Cadinène-1,4-diène	1580	1	KS-SM
49	cis-α-Cadinène	1590	1	KS-SM
50	Caryophyllène oxide	1650	0,9	KS-SM-Sd
51	Vinidifolène	1652	10,2	KS-SM
52	ε-Cadinol	1844	1	KS-SM
53	β-Eudesmol	2057	1	KS-SM
54	α-Cadinol		1	KS-SM
55	Hexahydropharményl acétate		1	KS-SM
56	Magnolol		3,7	KS-SM
	Composé identifiés (%)		96,1	
	Monoterpènes		10,6	
	Monoterpènes oxygénés		16,9	
	Sesquiterpènes		14,7	
	Sesquiterpènes oxygénés		14,8	
	Autre		0,1	

Tableau 11: Composition chimique de l'HE de *Salvia officinalis* de Bouderbala (*Lakhdaria*) extraite par hydrodistillation.

*KI : indices de rétention sur colonne HP5 MS par rapport à la série d'alcane normaux C8-C21 ; **Identification : SM : par comparaison des spectres de masse à ceux de la littérature et à ceux de la banque de spectres de masse (NIST 2005); Sd : par comparaison à des standards analysés dans les mêmes conditions que les huiles essentielles. t= trace (concentration <.0,05%).

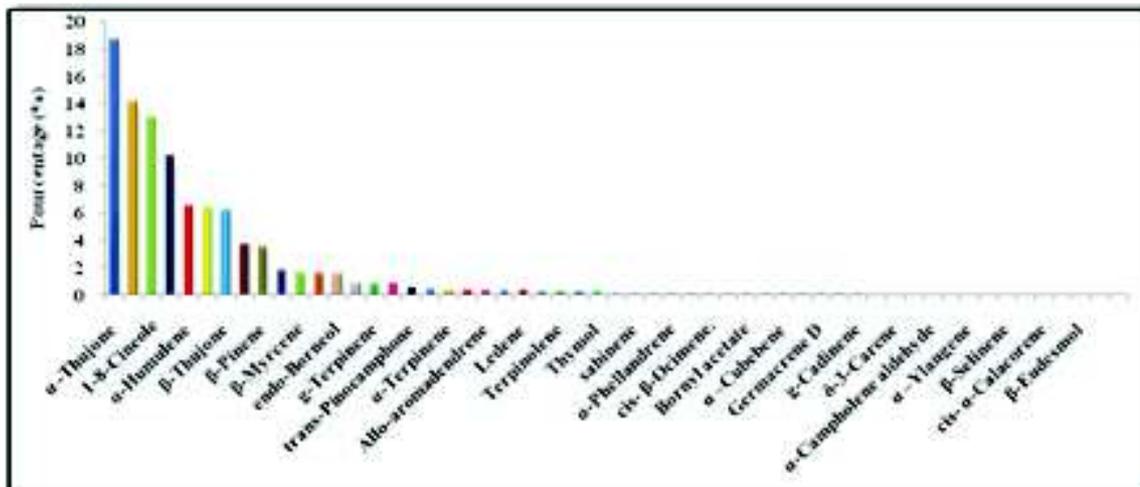


Figure 21 : Histogramme des différents constituants de *Salvia officinalis*.
 La figure 22 représente les différentes classes chimiques composant l'HE de la sauge.

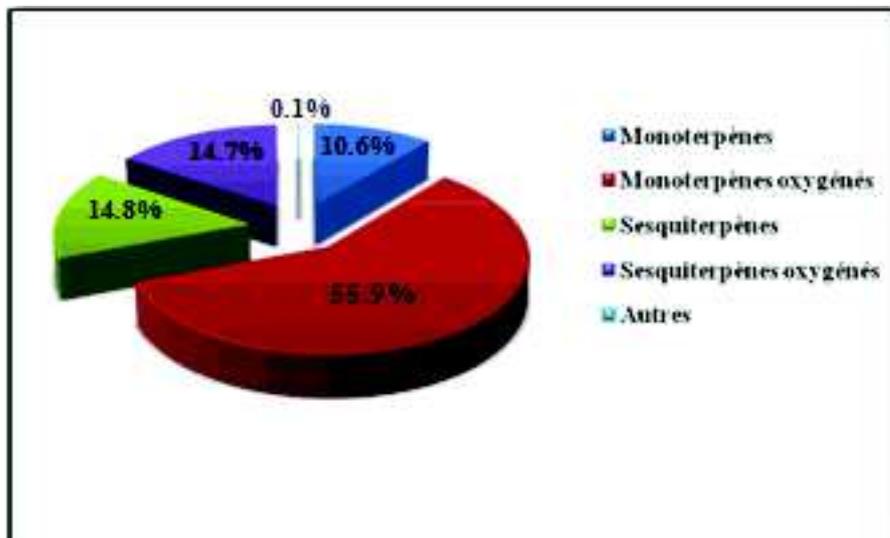


Figure 22 : Les différentes classes chimiques composant l'HE de la sauge.
 La figure 23 représente les constituants majoritaires de l'HE de la sauge.

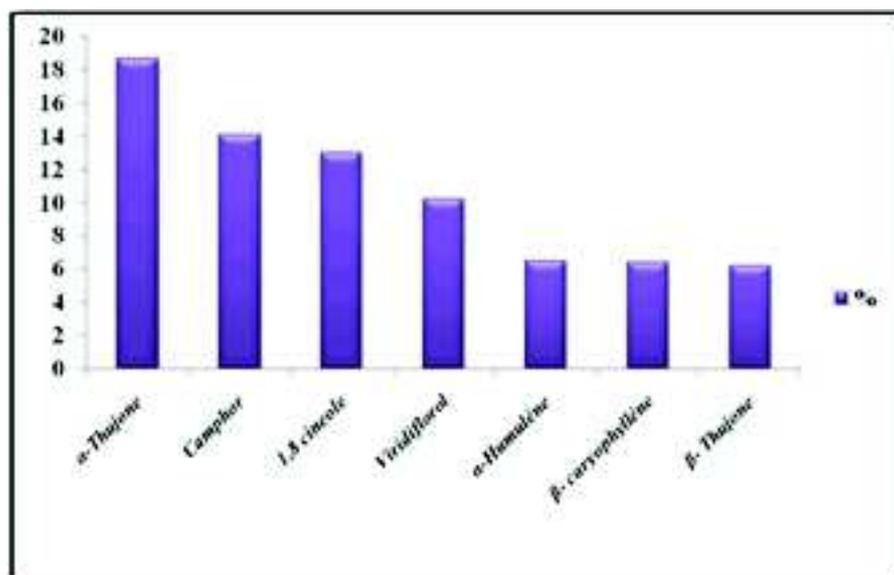


Figure 23 : Histogramme des constituants majoritaires de la sauge.

Les résultats obtenus nous permettent de constater que le composé principal est un Monoterpène oxygéné (α -Thujone) qui a une teneur de (18,7%), suivi du Camphor (14,1%), 1,8-cinéole (13%), Viridiflorol (10,2%), α -Humulène (6,5%) et β -Caryophyllène (6,4%).

Nous avons comparé la composition chimique de notre huile à celles provenant d'autres pays, les résultats sont indiqués dans le tableau 12.

Tableau 12: Comparaison des teneurs en composés majoritaires de l'HE de *Salvia officinalis*.

Composé	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
α -Thujone	18,7	0,72 à 1,5	41 à 48	7,41	40,37	42,97	24,8
Camphor	14,1	8 à 10	0,12	14,19	15,78	13,00	10,9
1.8 - cineole	13	62 à 55	7,94	16,29	8,07	7,54	14,8
Viridiflorol	10,2	-	5,85	4,63	-	-	-
α -Humulene	6.5	-	2,64	4,37	2,90	2,78	-
β -Caryophyllène	6,4	2 à 1	1,68	-	1,37	1,37	2,89
β -Thujone	6,2	0,72 à 1,5	6,75	17,76	8,12	5,86	3,97

S₀ : *Salvia officinalis* d'Algérie-Bouderbala (Lakhdaria) (Notre échantillon).

S₁: *Salvia officinalis* de Syrie (Rami et Zheng Guo, 2011)

S₂: *Salvia officinalis* d'Iran (Alizadeh et Shaabani , 2012).

S₃: *Salvia officinalis* de Tunisie (Bouaziz et al., 2009).

S₄ : *Salvia officinalis* du Brésil (Pieroza et al ., 2009).

S₅ : *Salvia officinalis* du Brésil (Pieroza et al ., 2009).

S₆: *Salvia officinalis* du Brésil (Delamare et al., 2007).

Nous remarquons que la composition chimique de notre huile présente des dissemblances par rapport à celles mentionnées dans les différentes études citées dans le tableau 12, cette variation réside dans la différence de concentrations en constituants

majoritaires de l'HE. Les variations notées dans le profil chimique de l'HE de *Salvia officinalis* provenant des différents pays est liée à plusieurs facteurs tels que :

Le facteur environnemental (**Bernath et al., 1991, Grella et al., 1988**), les conditions climatiques et géographiques (**Ristic et al., 1997**) qui changent d'un pays à un autre et à la période de la cueillette (**Desjobert et al., 1997**).

La différence dans la composition chimique de l'HE peut également être attribuée aux variations de l'ontogénèse (**Alizadeh et al., 2011**).

D'autres études réalisées sur *Salvia officinalis* à travers le bassin méditerranéen ont rapporté la composition chimique suivante :

- L'étude menée par **Place et al., (1995)** sur *Salvia officinalis* d'Italie ; a montré que les principaux composés sont : l' α -Thujone (**39,32%**), l' α -humulène (**12,42%**), le 1,8-cinéole (**7,73%**), le β -pinène (**7,22%**), β -Thujone (**3,07%**) et le camphre (**2,12%**).
- Les travaux de **Tsankova et al., (1994)** ont révélé que les constituants majoritaires de l'HE de sauge issue de Bulgarie sont : l' α -Thujone (**29,40%**), le β -Thujone (**17,40%**), le 1,8-cinéole (**12,50%**), le camphre (**11,70%**), l' α -pinène (**5,10%**) et le camphène (**3,60%**).
- L'étude réalisée par **Couladis et al., (2002)**, montre que l'HE de *Salvia officinalis* poussant en Serbie est composée essentiellement : du Camphre (**24,80%**), l' α -Thujone (**19,90%**), le 1,8-cinéole (**6,35%**), le camphène (**5,28%**), l'acétate de bornyle (**4,91%**) le β -Thujone (**3,79%**), l' α -humulène (**5,94%**).

4.2-Analyse qualitative et semi-quantitative de l'huile essentielle de la Rue

L'analyse par CPG seule et CG/SM de l'HE de la Rue provenant de la région de Tablat nous a permis d'obtenir les résultats de l'identification qui sont regroupés dans le tableau 13 et les figures 24 et 25.

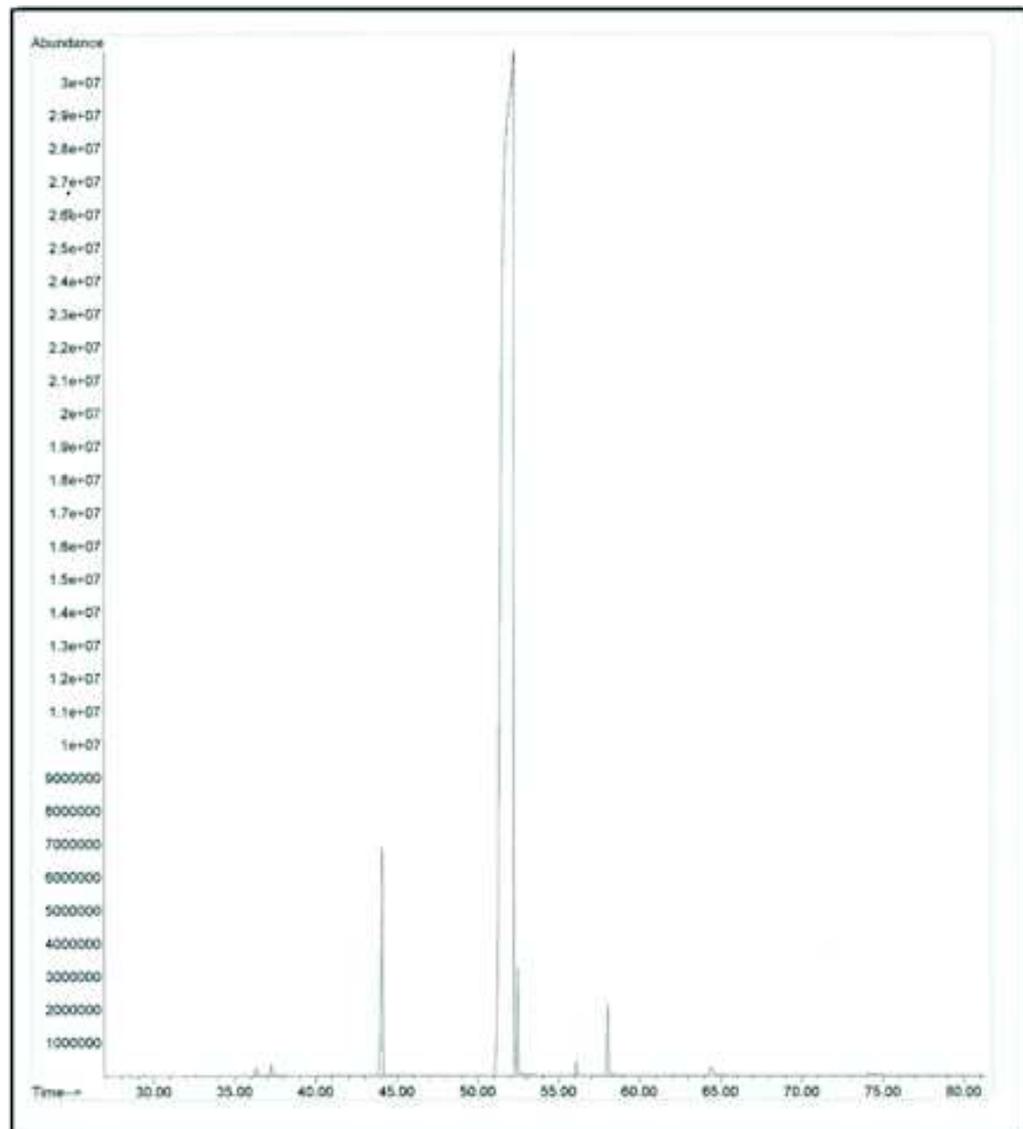


Figure 24 : Chromatogramme de l'HE extraite à partir des parties aériennes de *Ruta montana*

Tableau 13: Composition chimique de l'HE extraite par hydrodistillation à partir des parties aériennes de *Ruta montana*.

N°	¹ Composés	HP5MS	%	² Identification
1	α -Pinene	939	t	a, b, c
2	Camphene	951	t	a, b, c
3	2-Nonanone	1102	0.1	a, c
4	Nonanal	1105	0.2	a, c
5	Camphor	1145	t	a, b, c
6	Nortricyclene	1178	t	a, c
7	1-Nonanol	1215	t	a, c
8	2-Decanone	1192	3.3	a, c
9	2-Undecanone	1296	94	a, c
10	2-Dodecanol	1305	0.9	a, c
11	6-Dodecanone	1336	0.2	a, c
12	2-Dodecanone	1383	1.0	a, c
13	2-tridecanone	1502	0.2	a, c
	Composés identifiés (%)		99.9	
	Hydrocarbures monoterpéniques		t	
	Aldéhydes		0.2	
	Cétones		98.8	
	Alcools		0.9	

¹ **Composés** classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne non polaire HP5MS ; Indices de rétention relatifs aux n-alcanes C₇-C₂₃ ; ² **Identification** : a, Comparaison des spectres de masse avec ceux des banques de données ; b, Comparaison des indices de rétention avec ceux des étalons ; c, comparaison des indices de rétention avec ceux fournis par la littérature sur des colonnes de polarité identique ; t : trace (<0.05%)

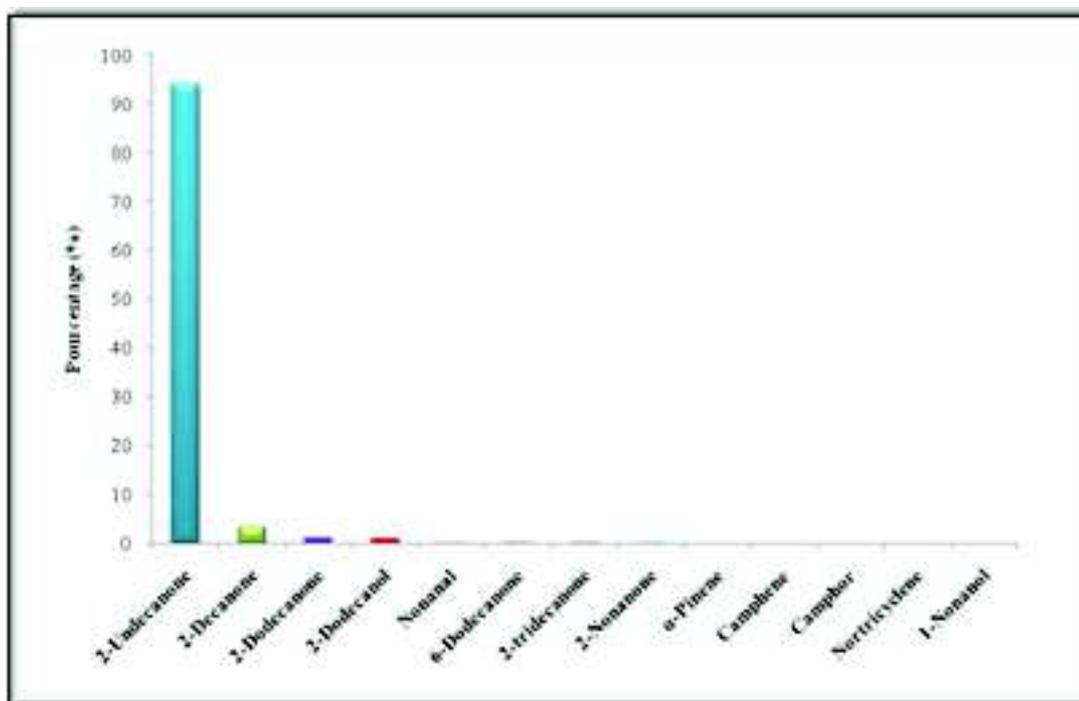


Figure 25 : Histogramme des différents constituants de *Ruta montana*.

La figure 26 représente les différentes classes chimiques composant l'HE de la Rue.

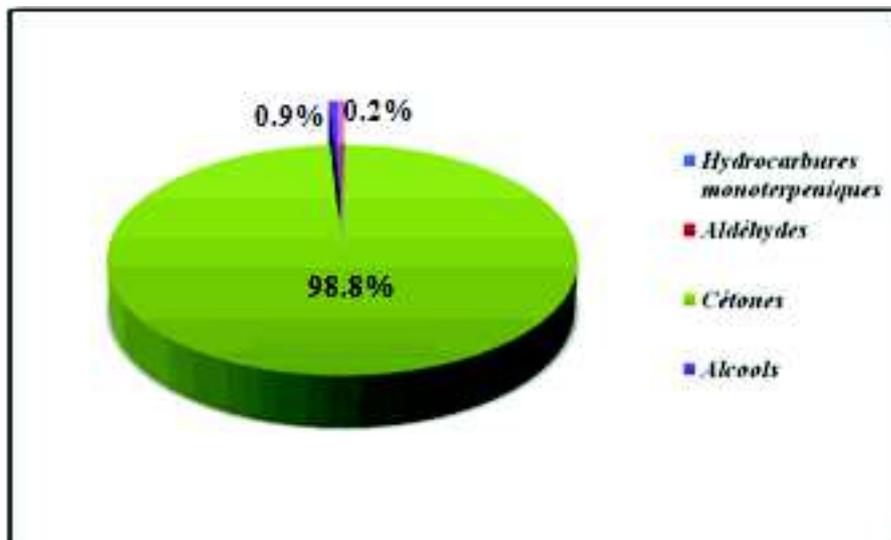


Figure 26 : Histogramme des différentes classes chimiques de *Ruta montana*.

La figure 27 représente les constituants majoritaires de l'HE de la Rue.

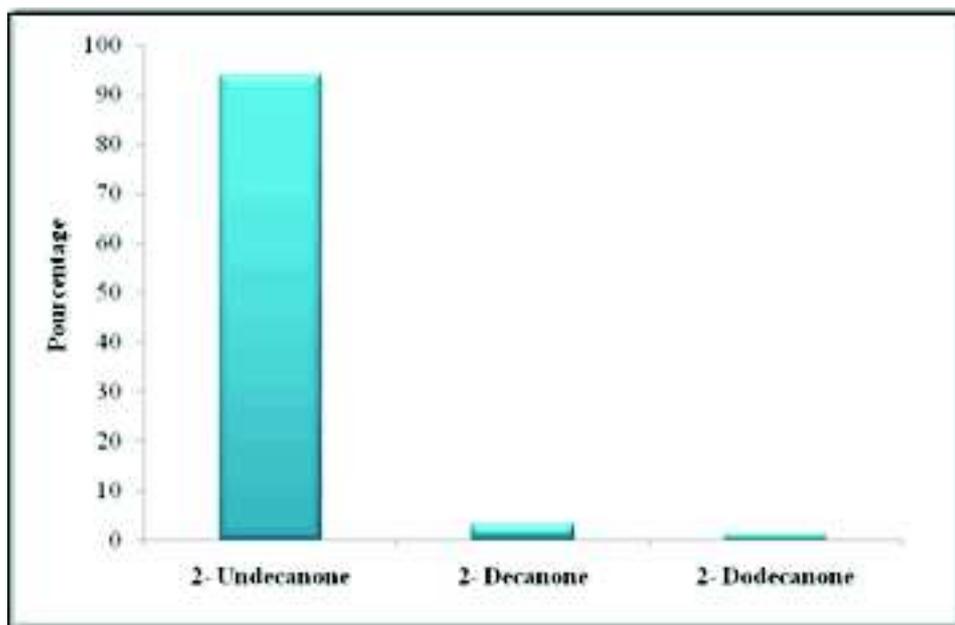


Figure 27 : Histogramme des constituants majoritaires de *Ruta montana*.

L'analyse par CPG seule et CG/SM de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles et des tiges de *Ruta montana* a permis d'identifier 13 composés qui représentent 99.9% de la totalité des pics. Nous remarquons que cette huile présente une dominance des **cétones** qui constituent 98.8% des composés de l'huile où la **2-undécanone** représente à elle seule la quasi-totalité de l'huile avec une teneur de 94 %.

A titre de comparaison, le tableau 14 donne les teneurs en composés majoritaires d'autres échantillons de *Ruta montana* et de quelques espèces du même genre (*Ruta sp*).

Tableau 14: Comparaison entre les teneurs (%) des composés majoritaires de l'HE de *Ruta montana* et de quelques espèces du même genre.

Composés	Espèces							
	R 0	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	R 7
2-Undecanone	94	32.8	60,19	90,4	1.3	23,82	22,59	-
2-decanone	3.3	-	6,2	1,4	-	1,64	1,49	0.5
2-Dodecanone	1	-	1,43	-	0.2	0,58	1,38	-
2-Nonanone	0,1	29,5	8,6	4,0	-	16,97	14,11	-
Monoethylhexyl – phtalate	-	-	6,4	-	-	-	-	-
2-Nonyl acétate	-	-	-	-	-	-	-	42,9

:($\leq 0.1\%$)

R0 : *Ruta montana* d'Algérie (Tablat) (Notre échantillon).

R1: *Ruta montana* d'Algérie (Oran) (Kambouche et al., 2008)

R2: *Ruta montana* d'Algérie (Mila) (Zellagui et al., 2012)

R3: *Ruta montana* d'Algérie (Oum El Bouaghi) (Zellagui et al., 2012)

R4:*Ruta graveolens* de Bulgarie(Ivanova, 2004).

R5:*Ruta chalpensis* de Tunisie (Sdira)(Fakhfakh et al., 2012).

R6:*Ruta chalpensis* de Tunisie (Thoujene)(Fakhfakh et al., 2012).

R7: *Ruta corsica* de France (Cedric et al., 2003).

D'après les résultats résumés dans le tableau 14, on remarque que la **2-Undecanone** est le composé prédominant dans notre HE (**94%**), ce qui est en accord avec les résultats cités par la littérature scientifique : L'étude de **Kambouche et al., 2008** et **Zellagui et al., 2012** sur *Ruta montana* ont révélé une teneur en **2 Undecanone** de **32.8 %**, **60,19%** et **90,4%** pour cette espèce provenant respectivement des régions d'Oran, de Mila et d'Oum El Bouaghi. De même, dans l'HE de *Ruta chalpensis* provenant des régions de Tunisie la **2-Undecanone** représente **23.82%** et **22,59%** pour les régions de Sdira et Thoujene respectivement (**Fakhfakh et al., 2012**). Alors qu'elle ne représente que 1.3% chez l'espèce *Ruta graveolens* (Ivanova, 2004) et n'est retrouvé que sous forme de traces chez *Ruta corsica* (Cedric et al., 2003) .

On peut aussi noter la présence du **2-decanone** comme deuxième composé majoritaire de notre huile après la 2-undécane avec une teneur de **3.3 %**. Ce composé représente 6,2 % chez *Ruta montana* de Mila et 1,4% chez *Ruta montana* d'Oum El Bouaghi, alors qu'il est présent à une teneur de 1,64%, 1,49% et 0,5% chez *Ruta chalpensis* (Sdira & Thoujene) et *Ruta corsica* respectivement ; et est quasiment absent chez les autres espèces.

4.3-Analyse qualitative et semi-quantitative de l'huile essentielle d'Aneth

L'analyse par CPG seule et CG/SM de l'HE de l'Aneth provenant de la région de Bir-Khadem (Alger) nous a permis d'obtenir les résultats de l'identification des constituants de cette dernière qui sont regroupés dans le tableau 15 et les figures 28 et 29.

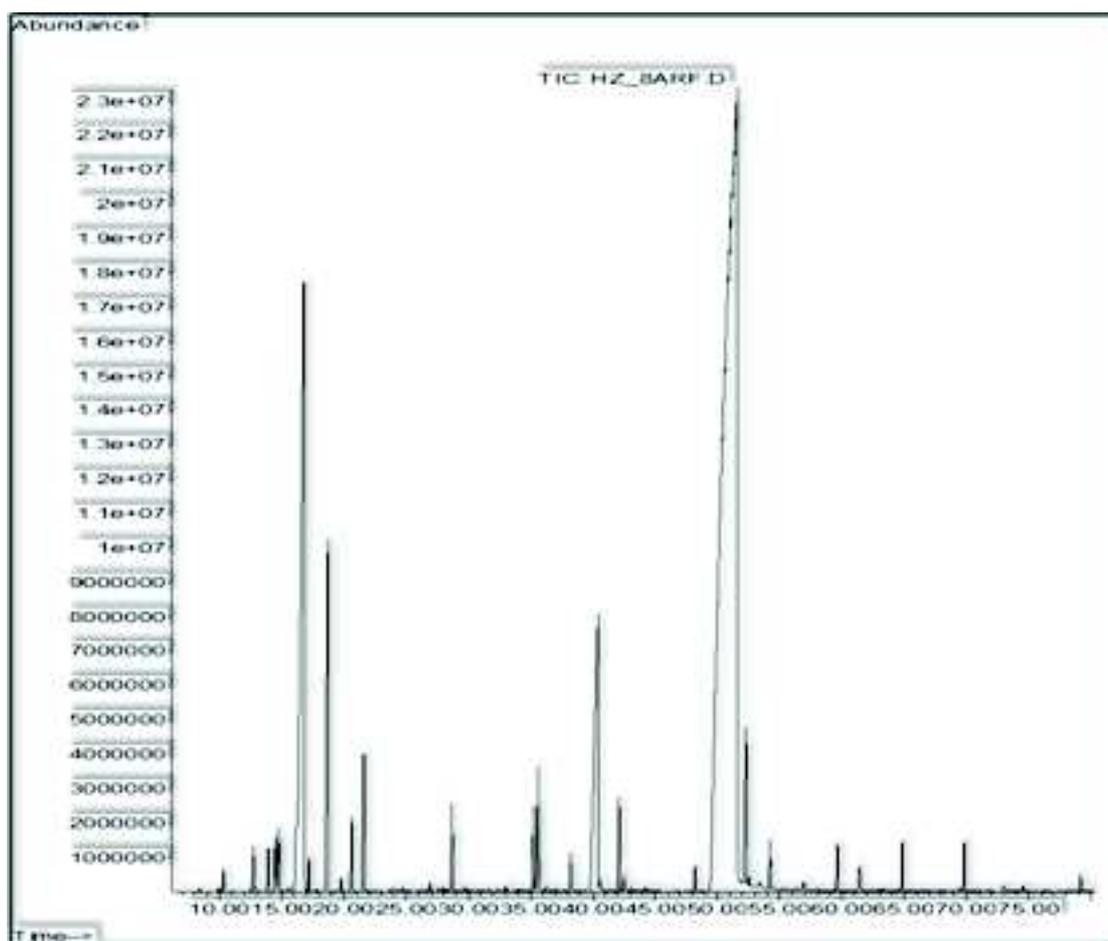


Figure 28 : Chromatogramme de l'HE extraite à partir des fruits d'Anethum graveolens.

N°	Composés	*KI	%	**Identification
1	α -Thujène	925	0,2	RI-MS
2	α -Pinène	935	2,1	RI-MS-E
3	Sabinène	972	1,4	RI-MS-E
4	β -Pinène	976	0,5	RI-MS-E
5	β -Myrcène	992	0,3	RI-MS-E
6	α -Phellandrene	1005	15,7	RI-MS-E
7	Limonène	1029	14,6	RI-MS-E
8	cis- β -Ocimène	1047	0,5	RI-MS
9	trans- β -Ocimène	1052	0,1	RI-MS
10	γ -Terpinène	1060	8,6	RI-MS-E
11	Fenchone	1094	7,2	RI-MS
12	Linalool	1104	0,6	RI-MS-E
13	Fenchol	1106	0,1	RI-MS
14	Chrysanthémone	1110	t	RI-MS
15	Terpinen-1-ol	1132	t	RI-MS
16	Camphor	1144	0,4	RI-MS-E
17	Terpinen-4-ol	1177	0,2	RI-MS-E
18	α -Terpineol	1190	0,3	RI-MS-E
19	Estragol	1195	0,6	RI-MS
20	Fenchyl acétate	1227	0,1	RI-MS
21	Pulegone	1245	0,1	RI-MS
22	Piperitone	1251	t	RI-MS
23	Bornyl acétate	1285	t	RI-MS-E
24	Thymol	1297	0,5	RI-MS-E
25	Carvacrol	1317	0,7	RI-MS-E
26	Piperitenone	1351	0,2	RI-MS
27	α -Copaène	1372	0,1	RI-MS
28	Piperitenone oxide	1370	1,7	RI-MS
29	Méthyleugénol	1409	0,1	RI-MS
30	β -Caryophyllène	1417	t	RI-MS-E
31	Germacrène D	1480	0,4	RI-MS
32	Bicyclgermacrène	1495	t	RI-MS
33	β -Bisabolène	1506	0,1	RI-MS
34	δ -Cadinène	1519	t	RI-MS
35	Myristicin	1530	39,2	RI-MS
36	Elemicin	1552	1,5	RI-MS
	Composés identifiés (%)		98,1	
	Monoterpènes		27,77	
	Monoterpènes oxygénés		48,33	
	Sesquiterpènes		22,00	

Tableau 15: Composition chimique de l'HE extraite par hydrodistillation à partir du fruit d'*Anethum graveolens*.

*KI : indices de rétention sur colonne HP5MS par rapport à la série d'alcane normaux C8-C21 ; **Identification : SM : par comparaison des spectres de masse à ceux de la littérature et à ceux de la banque de spectres de masse (NIST 2005); Sd : par comparaison à des standards analysés dans les mêmes conditions que les huiles essentielles. t= trace (concentration < 0.05).

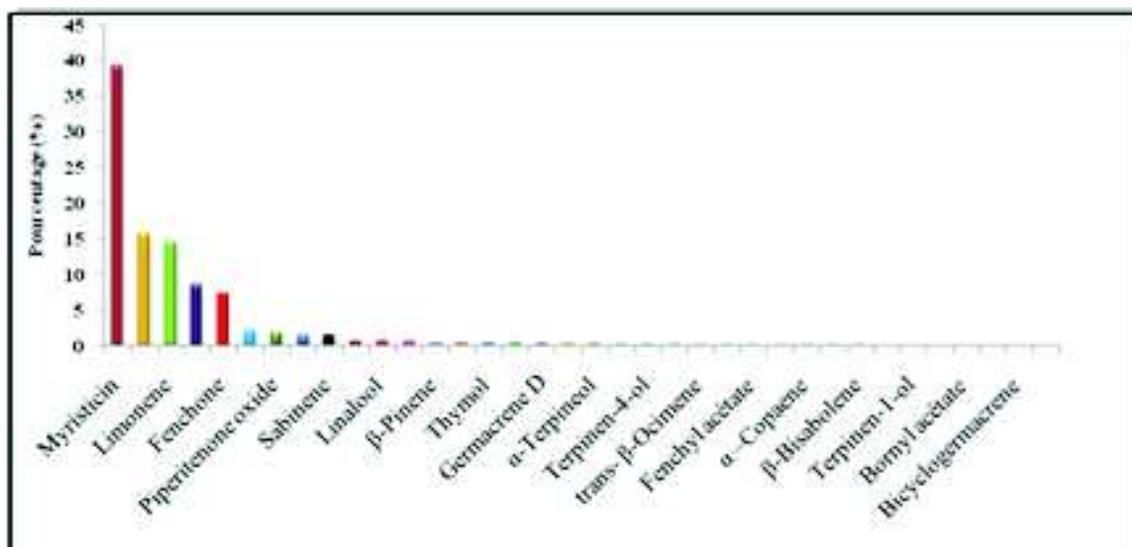


Figure 29 : Histogramme des différents constituants d'*Anethum graveolens*

La figure 30 représente les différentes classes chimiques composant l'HE de l'aneth.

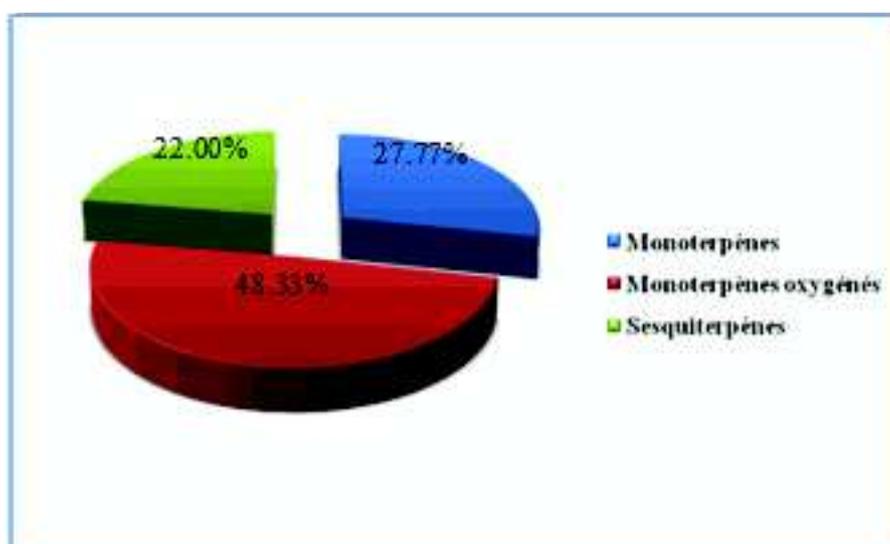


Figure 30 : Les différentes classes chimiques composant l'HE de l'aneth.

La figure 31 représente les constituants majoritaires de l'HE de l'aneth.

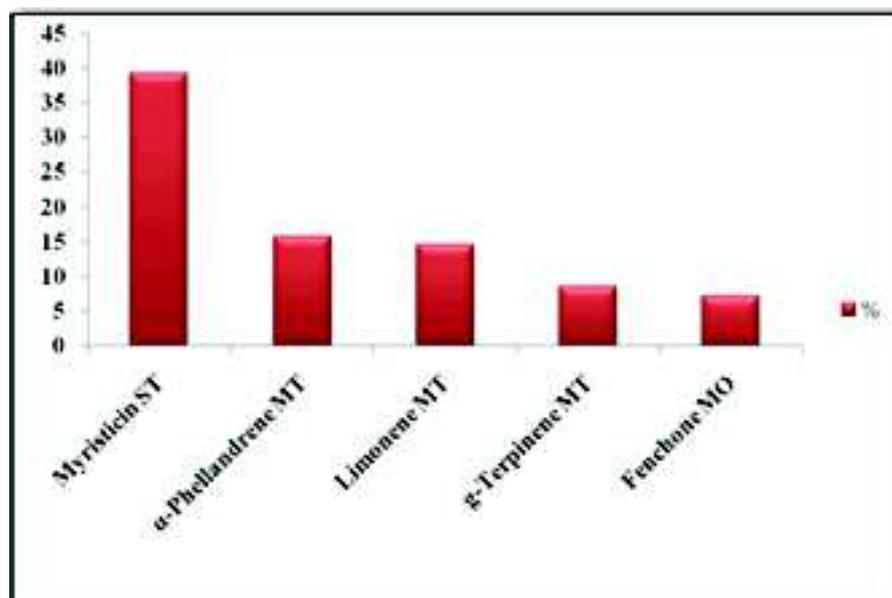


Figure 31 : Histogramme des constituants majeurs d'*Anethum graveolens*

Les 36 composés identifiés correspondent à une teneur de 98,1% de l'ensemble de l'HE injectée. Nous remarquons une dominance des composés Monoterpéniques oxygénés avec un taux de 48,33%. Le principal composé est le **Myristicin** avec une teneur de (39,1%) suivi l'**α-phellandrene** (15,7%), le **Limonene** (14,6%), **γ-Terpinene** (8,6%) et le **Fenchone** (7,2%).

Le tableau 16 regroupe les résultats comparatifs entre les teneurs de quelques constituants majeurs de l'HE d'*Anethum graveolens* cités dans la littérature.

Tableau 16: Comparaison des teneurs de quelques composés des HE de l'espèce *Anethum graveolens*.

Composé	A 0	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5
Myristicin	39,2	25,15	1,67	0,86	-	-
α-Phellandrene	15,7	47,74	62,49	-	-	-
Limonene	14,6	3,7	3,8	15,94	33	19,89
γ-Terpinene	8,6	1,75	0,05	0,19	-	0,34
Fenchone	7,2	-	-	-	-	-
β-phellandrene	6,2	7,40	7,48	-	20,61	0,75
Carvone	3,5	2,62	-	38,9	30 à 60	36,09
D carvacrol	0,7	-	-	-	-	0,21
Dill Apiole	-	0,62	0,05	30,81	-	16,83
E dihydrocarvacrone	-	0,06	0,08	10,99	-	6,59

A0: *Anethum graveolens* d'Algérie- Birkhadem (Alger) (Notre échantillon).

A1: *Anethum graveolens* d'Estonie récoltée en hiver (Vokk et al., 2011)

A2: *Anethum graveolens* d'Estonie récoltée en été (Vokk et al., 2011)

A3: *Anethum graveolens* du Pakistan (Babri et al., 2012)

A4: *Anethum graveolens* de Roumanie (Isopencu et Ferdes., 2012)

A5: *Anethum graveolens* d'Iran (Mahmoodi et al., 2012)

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

Le tableau 16 montre une variation dans la composition chimique des HE citées dans la littérature, cette différence est d'ordre qualitative est quantitative dans tous les cas mentionnés ci-dessus. La divergence notée dans le profil chimique des HE dépend d'un grand nombre de paramètres, à savoir :

- Les conditions climatiques, géographiques et saisonnières (la teneur en composés majoritaires de l'HE d'aneth extraite à partir des feuilles est plus élevée pendant la saison estivale par rapport à la période hivernale selon (**Vokk et al., 2011**).
- La période de récolte
- Les techniques d'extraction.

Selon l'étude menée par **Radulescu et al., 2010** en Roumanie, la composition chimique de l'HE d'*Anethum graveolens* est étroitement liée aux parties (organes) de la plante utilisées pour l'extraction de l'huile.

Tableau 17: Comparaison de la composition chimique en constituants majoritaires de l'HE d'*Anethum graveolens* extraite à partir des feuilles, fleurs et du fruit (Radulescu et al., 2010) avec nos résultats

Composés	Feuilles ^a	Fleurs ^a	Fruits ^a	Fruits ^b
α -phellandrene	62,71	30,26	0,12	15,7
Limonene	13,28	33,22	21,56	14,6
Carvone	-	10,29	75,21	3,5

a: *Anethum graveolens* (Feuilles, Fleurs et Fruits) de Roumanie (Radulescu et al., 2010).

b: *Anethum graveolens* (Fruits) d'Algérie (Notre échantillon).

Selon le tableau 17, on remarque que les résultats mentionnés par Radulescu et al., (2010) ne concordent pas avec les valeurs obtenues dans le cas de notre huile.

5-Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée *in vitro* par deux méthodes différentes : le test du DPPH et la mesure du pouvoir réducteur. A des fins comparatives l'antioxydant de synthèse: BHT (Butyl Hydroxy Toluène) est pris comme référence.

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

La méthode de mesure de l'activité antioxydante par le test du piégeage du radical

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

L'activité antioxydante des différents échantillons de *Salvia officinalis*, de *Ruta montana* et d'*Anethum graveolens* vis-à-vis du radical DPPH est évaluée par spectrophotométrie 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 32**).

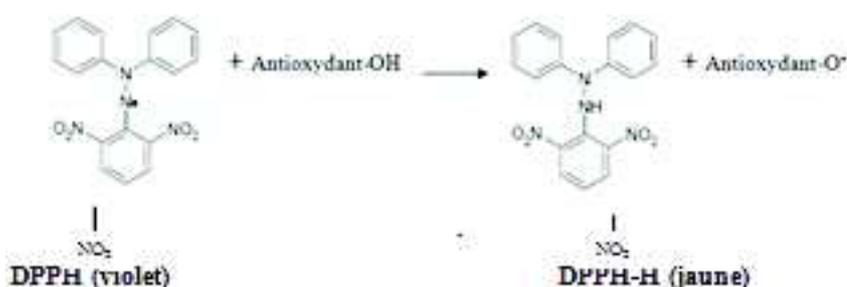


Figure 32 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

5.1.1-Activité de piégeage du radical DPPH par les HE étudiées

Les résultats de l'activité de piégeage du radical DPPH par les HE de *Salvia officinalis*, de *Ruta montana* et d'*Anethum graveolens* ainsi que celle du BHT sont représentés dans le tableau 18.

Tableau 18: Activité de piégeage du radical DPPH par les HE étudiées et le BHT

Concentration en mg/l	Activité de piégeage du radical DPPH ^a en %			
	HE sauge	HE rue	HE aneth	BHT
500	3.20 ± 0.17	6.90 ± 0.48	5.35 ± 0.11	73.15 ± 0.85
1000	5.18 ± 0.51	7.39 ± 0.19	6.61 ± 0.22	91.07 ± 0.12
1500	9.21 ± 0.23	10.11 ± 0.43	10.07 ± 0.15	ND
2000	10.16 ± 0.36	13.86 ± 0.44	10.36 ± 0.06	ND
4000	15.17 ± 0.36	23.14 ± 0.53	11.92 ± 0.17	ND

^a Les résultats sont moyennes ± écart type de trois mesures.

ND : Non disponible

Les concentrations inhibitrices de 50% des radicaux sont données dans le tableau 19.

Tableau 19: Concentration nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres par les HE étudiées et le BHT.

	Sauge	Rue	Aneth	BHT
b IC50	ND	ND	ND	28.00 ± 0.66

^b IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50% des radicaux.

ND : Non déterminé.

Les profils d'activité anti-radicalaire obtenus (**Figure 33**) révèlent que les HE étudiées possèdent une activité anti-radicalaire dose dépendante.

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH par les HE de *S. officinalis*, *R. montana* et d'*A. graveolens* a été établi puisqu'ils sont quand même capables de réduire la forme stable du radical DPPH. Ce pouvoir de piégeage augmente proportionnellement avec la concentration de ces huiles.

La concentration requise pour la neutralisation et la stabilité de 50% de la concentration du DPPH n'a pas été atteinte, étant donné qu'à la plus forte concentration (4000 mg/l), le taux d'inhibition ne dépasse pas les 24% (**Tableau 18**).

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

De manière générale, on peut dire; les HE testées présentent un faible effet « scavenger » du radical DPPH.

La figure 33 récapitule le pouvoir de piégeage du radical DPPH par le BHT les HE de *Salvia officinalis*, de *Ruta montana*, d'*Anethum graveolens*.

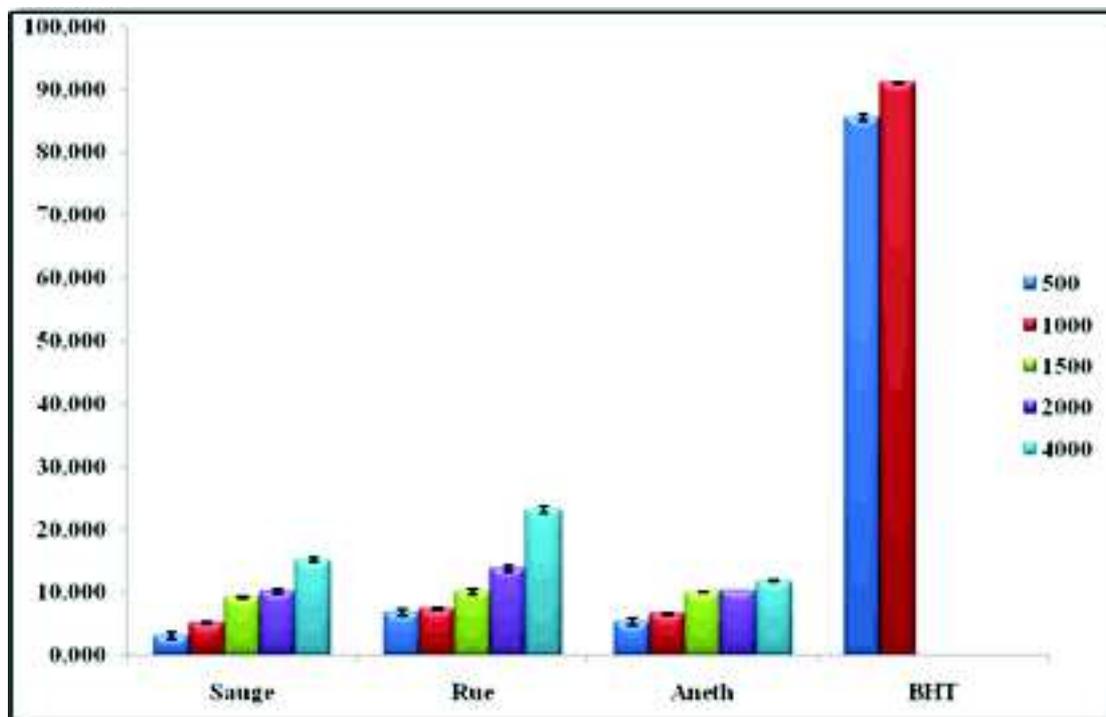


Figure 33 : Piégeage du radical DPPH par le BHT et les HE testées.

- Cas de la Sauge « *Salvia officinalis* »
- Il apparait clairement que l'HE de la sauge présente une capacité de réduction du radical DPPH relativement faible pour les concentrations étudiées ; même à la plus forte concentration (4000mg/l) le pouvoir de piégeage du radical DPPH n'atteint que 15.17%.
- Le tableau 20 illustre le pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'HE de quelques genres de sauge cités dans la littérature comparée à celui de notre échantillon.

Tableau 20: Comparaison entre l'activité de piégeage du radical DPPH (%) de l'HE de *Salvia officinalis* et deux espèces du même genre.

Concentrations (mg/l)	Echantillons		
	S ₀	S ₁	S ₂
400	ND	68.70	49.24
500	3.20	ND	ND
1000	5.18	75.26	55.43
2000	10.16	80.57	62.84
4000	15.17	ND	ND

ND: Non déterminé

S₀: *Salvia officinalis* d'Algérie (région de Bouderbala) (notre échantillon).

S1 : *Salvia palaestina* de Turquie (région de Gaziantep-Nizip) (Gürsoy et al., 2012)

S2 : *Salvia ceratophylla* de Turquie (région de Kayseri) (Gürsoy et al., 2012)

Les résultats rapportés par **Gürsoy et al., (2012)**, sont nettement supérieurs aux valeurs obtenues par notre huile.

L'étude menée par **Rasmy et al., (2012)** sur *S. officinalis* en Egypte, a montré un pouvoir antioxydant très satisfaisant exprimé à travers un effet « scavenger » du radical DPPH à de faibles concentrations. Le tableau 21 résume les résultats de cette étude.

Tableau 21:Activité de piégeage du radical DPPH par l'HE de *S.officinalis* (Egypte)

Concentrations (µl/ml)	5	10	15	20	25
* A(%)	33.57±1.27	51.00±3	60.00±2.8	59.16±6.4	79.50±0.9

(Rasmy et al., 2012).

* **A(%)** : Activité de piégeage du radical DPPH.

Les valeurs mentionnées dans le tableau 21 ne concordent pas avec nos résultats, cette divergence est probablement due à la différence dans la composition chimique de cette huile et celle de notre échantillon (tableau 12).

- **Hussain et al., (2011)** dans leur étude portant sur l'HE et les extraits de *S. officinalis*, ont enregistré une concentration inhibitrice de 50% des radicaux de l'ordre 62.3 mg/l. Cette forte activité de piégeage du radical DPPH, est a priori expliquée par la teneur élevée en **1,8 cineole** (composé majoritaire de cette huile).
- D'après **Bouaziz et al., (2009)** ; les huiles essentielles de *S. officinalis* ont montré une activité antioxydante remarquable ($IC_{50}=7,70\pm0,90\mu\text{g/ml}$) supérieure à celle l'antioxydant de synthèse BHT ($IC_{50}=8,13\pm1,07\mu\text{g/ml}$).
- L'activité antioxydante des HE est probablement liée au contenu phénolique. En effet, l'étude comparative sur la faculté de réduction du radical DPPH par des chemotypes différents a prouvé que les chemotypes phénoliques montrent *in vitro* des capacités antioxydantes plus exprimées et plus fortes que les chemotypes non phénoliques (**Jukić et Miloš , 2005**).
- Les propriétés antioxydantes des extraits de *S. officinalis* ont montré une activité anti-radicalaire plus que satisfaisante (**Alizadeh et Shaabani, 2012**).
 - Cas de la Rue « *Ruta montana* »
- Le tableau 18 montre que l'HE de Rue présente un pouvoir de piégeage du radical DPPH nettement inférieur à celui du BHT quel que soit la concentration utilisée.
- Malgré une concentration maximale de 4000 mg/l l'activité de piégeage du DPPH ne dépasse pas les 24%, par conséquent il nous a été impossible de déterminer la concentration inhibitrice de 50% des radicaux.
- Nos recherches sur l'activité antioxydante de l'HE de *Ruta montana* n'ont finalement abouti que sur une seule et unique étude, ce qui explique que les données sur ce sujet sont très limitées.
- D'après **Kambouche et al. (2008)** : les résultats du test de piégeage du radical DPPH par l'HE de *Ruta montana* montrent une faible activité.

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

- Ces résultats semblent être dus à la composition chimique de cette huile, compte tenu du fait qu'elle ne contient aucun composé phénolique. Donc, ce résultat était plus ou moins prévisible.
- **Fakhfakh et al., (2012)**, ont signalé dans l'étude menée sur *Ruta chalepensis* en Tunisie l'absence d'activité de piégeage du radical DPPH par cette HE en raison de l'absence de phénols ou de composés terpéniques oxygénés et une prédominance des cétones aliphatiques et des composants d'esters. Les huiles essentielles ne contenant pas de composés phénoliques, mais riches en monoterpènes oxygénés ont des propriétés de piégeage de DPPH relativement importantes (**Zouari et al., 2011**).
 - Cas de l'aneth « *Anethum graveolens* »
- L'HE d'aneth a montré une activité de piégeage du radical DPPH très faible quelque soit la concentration utilisée, à la plus grande concentration (4000mg/l) on remarque un pouvoir de piégeage du radical DPPH qui ne dépasse pas les 12%.
- A fin de comparer nos valeurs enregistrées pour le test de piégeage du radical DPPH avec celle de la littérature scientifique; nos recherches n'ont finalement abouti que sur très peu d'études, qui pour la plupart rapportent les propriétés biologiques bien connues de l'aneth : à savoir ; les effets antioxydants (Satyanarayana et al., 2004 et Singh et al., 2006) et anti-cancer de l'aneth (Zheng et al., 1992).

5.2-Pouvoir réducteur des HE étudiées

Le pouvoir réducteur mesure la capacité des HE de *Salvia officinalis*, de *Ruta montana* et d'*Anethum graveolens* à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{+2}). Le BHT a été pris comme antioxydant de référence. Donc, ce test mesure de l'aptitude d'une huile essentielle à interagir avec les espèces chimiques réactives en tant que donneur d'électrons tels que les radicaux libres. Ces radicaux ainsi réduits deviennent plus stables.

Les résultats du pouvoir réducteur des HE étudiées et du BHT exprimés par l'absorbance à 700 nm, sont résumés dans le tableau 22 et la figure 34.

Tableau 22: Pouvoir réducteur du BHT et des HE étudiées.

Concentration en mg/l	a Absorbance à 700nm			
	HE de sauge	HE de rue	HE d'aneth	BHT
500	0.180 ± 0.005	0.190 ± 0.006	0.450 ± 0.037	1.17 ± 0.01
1000	0.230 ± 0.001	0.350 ± 0.003	0.710 ± 0.004	1.30 ± 0.03
1500	0.380 ± 0.002	0.440 ± 0.079	0.750 ± 0.035	ND
2000	0.400 ± 0.007	0.640 ± 0.004	0.790 ± 0.013	ND
4000	0.480 ± 0.003	0.890 ± 0.004	0.900 ± 0.011	ND

^a Moyennes ± écart type de trois mesures.

ND : Non disponible

- D'après le tableau 22 et la figure 34, on remarque que les HE étudiées présentent un faible pouvoir réducteur par rapport à celui du BHT, mais croit proportionnellement avec l'augmentation de la concentration. Les capacités réductrices des HE de *S. officinalis*, de *Ruta montana* et d'*A. graveolens* sont toutes inférieures à celles de l'antioxydant de synthèse quelque soit la concentration utilisée.

L'absence ou la faible teneur en composés phénoliques (tels que le carvacrol et/ou le thymol) explique probablement cette faible capacité réductrice. Ces composés connus pour leur pouvoir réducteur sont appelés reductones. Ils sont capables de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}), céder des électrons et transformer les radicaux libres actifs en produits stables (Dorman et al., 2004, Singh et al., 2006).

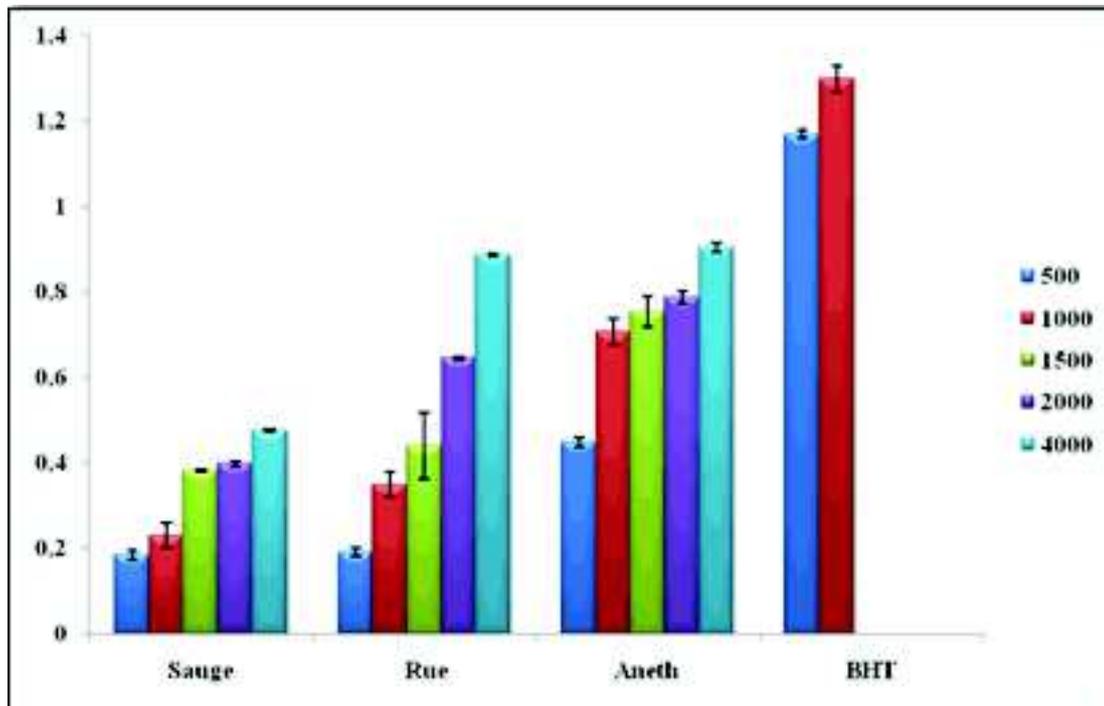


Figure 34 : Ppouvoir réducteur du BHT et des HE étudiées.

Dans le cas de la sauge, l'étude de Gürsoy et al., (2012) portant sur l'activité antioxydante de *S. palaestina* et *S. ceratophylla*, les résultats du pouvoir réducteur de ces huiles sont donnés dans le tableau 23.

Tableau 23: Pouvoir réducteur des HE de *S. palaestina* et *S.ceratophylla* par Gürsoy et al., (2012).

Echantillons	Concentrations (mg/l)		
	200	400	1000
<i>S. palaestina</i>	0.154 ± 0.005	0.273 ± 0.011	0.362 ± 0.002
<i>S. ceratophylla</i>	0.114 ± 0.012	0.189 ± 0.005	0.248 ± 0.008

Si on compare les valeurs obtenues dans le tableau 23, on voit clairement qu'ils se rapprochent de nos résultats, surtout dans les cas *S. ceratophylla*.

6-Evaluation de l'activité antimicrobienne des HE testées

6.1-Etude qualitative des HE analysées

L'évaluation de l'activité inhibitrice a été effectuée par la méthode des disques (Aromatogramme). Les mesures des diamètres des zones d'inhibition ont pour but de mettre en évidence l'action des HE sur les souches microbiennes testées.

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

A cet effet, une échelle de mesure de l'activité antimicrobienne émise par **Ela et al.**, (1996), **Meena et Sethi (1994)**, répartissant les diamètres des zones d'inhibition en 4 classes:

- Fortement inhibitrice: lorsque le diamètre de zone d'inhibition est > 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 < 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.

Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibition par les HE en utilisant le test de l'aromatogramme sont regroupés dans le tableau 24 et la figure 35.

(Diffusion en mm par disque \pm Standard déviation).

Figure 35 : Activité antimicrobienne des HE sur les différentes souches microbiennes.

Souche	Sauge	Rue	Aneth
<i>Bacillus subtilis</i>	15,00 \pm 1,41	13,50 \pm 0,71	19,00 \pm 0,00
<i>Escherichia coli</i>	14,00 \pm 1,41	10,25 \pm 0,35	14,00 \pm 0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,75 \pm 0,35	6,75 \pm 0,35	12,00 \pm 1,41
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,00 \pm 2,82	13,50 \pm 0,71	11,50 \pm 0,71
<i>Candida albicans</i>	11,00 \pm 1,41	36,50 \pm 2,12	19,50 \pm 0,71

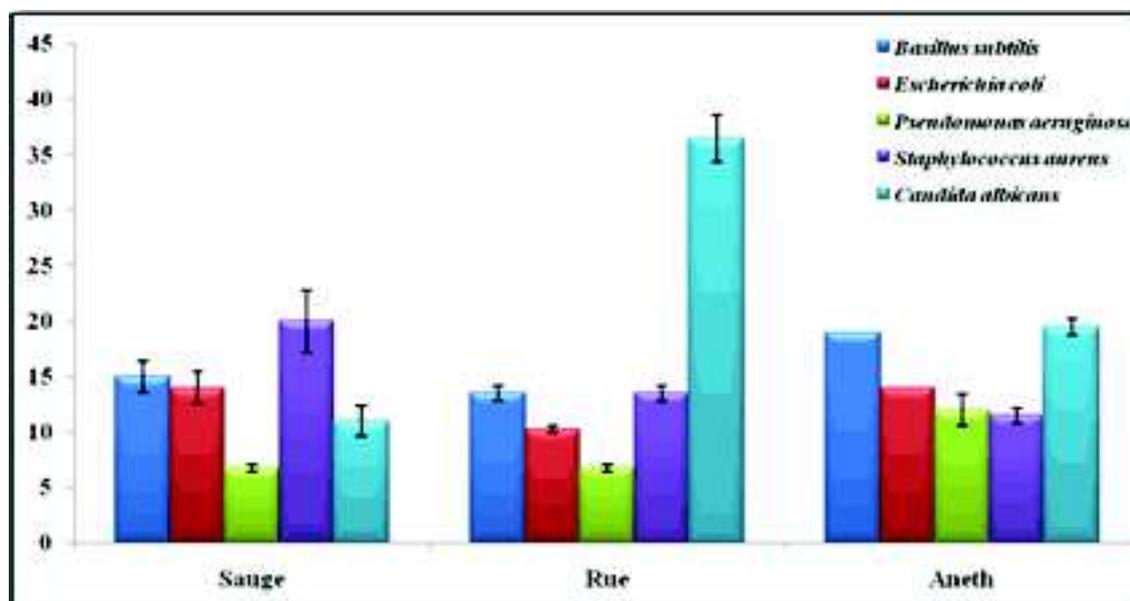


Figure 35 : Activité antimicrobienne des HE sur les différentes souches microbiennes.

Au vu des résultats résumés dans le tableau 24, on peut noter que l'HE de la sauge présente une légère activité inhibitrice vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, *E.coli* et *Candida albicans*. Une activité inhibitrice modérée dans le cas *Staphylococcus aureus*, alors qu'elle

n'a quasiment aucune activité contre *Pseudomonas aeruginosa* (la zone d'inhibition est presque inexistante).

L'HE de Rue montre une forte inhibition avec la plus grande valeur notée (36.5 mm) vis-à-vis de *Candida albicans*, un léger pouvoir inhibiteur est enregistré vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, *E.coli* et *Staphylococcus aureus*. Concernant *Pseudomonas aeruginosa*, elle présente une résistance marquée vis-à-vis de l'HE de rue avec le plus faible diamètre noté (6.75 mm).

On constate pour l'HE de l'aneth, une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Alors qu'un léger pouvoir inhibiteur est enregistré contre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

Cas la de sauge

L'étude de **Bouaziz et al., 2009**, démontre que les huiles essentielles de *Salvia officinalis*, montrent des effets antimicrobiens sur les bactéries, les levures et les moisissures. Ces effets étaient visibles par les faibles CMI, les valeurs des MCC et la forte réduction de la viabilité des microorganismes testés.

De même, **Delamare et al. (2007)** ont démontré les effets fongicides et bactéricides de l'HE de la sauge.

Alors que l'étude de **Marino et al. (2001)**, a révélé que les huiles essentielles de sauge avaient une capacité bactériostatique mais aucun effet bactéricide.

Les résultats obtenus par **Alizadeh et Shaabani (2012)**, montrent que huile essentielle *S. officinalis* présente d'importantes propriétés antimicrobienne contre les deux microorganismes testés : *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus*,

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle la sauge a augmenté lorsque la concentration en HE augmente. Des études récentes sur l'huiles essentielles de plusieurs Lamiacées montrent que ces plantes ont un large éventail d'activités biologiques, notamment leurs activités antimicrobiennes (**Baratta et al., 1998**), et cette activité est généralement liée à la composition chimique l'huile. Ainsi, l'activité antimicrobienne de l'HE de *S. officinalis*, pourrait être attribuée à une forte quantité de composants majeurs comme **α -thuyone, 1,8 - cinéole, β -caryophyllène**, et d'autres composants de l'huile essentielle. Plusieurs études portées sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du genre *Salvia* telles que : (**Kabouche et al., 2005**), ont rapporté que l'huile essentielle obtenue à partir de racines de *Salvia jaminiana* a une activité antibactérienne. De même, l'huile essentielle de *Salvia tomentosa* a montré une activité antibactérienne contre huit micro-organismes (**Haznedaroglu et al., 2001 et Kamatou et al., 2007**). L'activité antimicrobienne de *Salvia officinalis* reconnue il ya plusieurs décennies, a été attribuée à la présence du **1,8-cinéole, thuyone** et de **camphre**; en réalité, même si l'activité antimicrobienne est souvent attribuée à ses principaux composants, il est aujourd'hui reconnu que la synergie ou l'effet antagoniste d'un composé mineur doit être pris en considération (**Burt, 2004**).

La forte activité antimicrobienne des huiles essentielles contre presque tous les microorganismes sensibles peut être attribuée à la présence d'une forte concentration de mono-terpènes 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, ainsi que d'autres constituants mineurs des huiles essentielles ont une activité antimicrobienne (**Dorman et Deans, 2000**). En fait, les effets synergiques de la diversité des constituants majeurs et mineurs constituants présents dans les huiles essentielles doivent

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

être pris en considération pour rendre compte de leur activité biologique (**Delamare et al., 2007**).

Cas de la rue des montagnes

Les résultats obtenus par **Belkassam et al., (2011)**, ont montré que l'huile essentielle extraite de *Ruta montana* (Clus.) L. a empêché la croissance des micro-organismes testés (*Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*) avec un diamètre de la zone d'inhibition augmentant proportionnellement avec les concentrations des échantillons testés, l'inhibition obtenue sur ces souches bactériennes varie de 9,33 à 24 mm.

Zellagui et al. (2012), ont montré que l'huile essentielle de deux échantillons de *Ruta montana* provenant des régions d'Algérie : Mila et Oum El Bouaghi, montrent une forte activité contre les bactéries Gram positives et Gram négatives. Les deux échantillons ont empêché la croissance de tous les micro-organismes testés (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*), avec un diamètre de zone d'inhibition augmentant proportionnellement avec la concentration des échantillons testés. Le diamètre d'inhibition obtenue varie de **6,33 à 26,66 mm** (tableau 25) avec la valeur la plus élevée enregistrée avec *E. coli* ATCC25922 à **2.103 µg/ml**. L'échantillon d'Oum El Bouaghi contient **90,4%** de 2-Undecanone a montré un effet antibactérien très élevé contre toutes les bactéries des souches. La sensibilité mesurée par les zones d'inhibition respectives, a été établie comme suit: *E. coli* ATCC25922 > *K. pneumoniae* > *S. aureus* > *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Il est à noter qu'il y a très peu d'études portant sur l'activité antibactérienne sur *R. montana* (Clus.) L.

Micro-organismes		Concentration HE (µg /l)			
		25	100	500	2000
<i>E.coli</i> ATCC25922(G-)	E _M	-	20.33±1.15	23±0.00	25±1.00
	E _{OEB}	-	21.66±1.15	22.33±0.57	26.66± 0.57
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (G-)	E _M	-	18.33±1.15	21.66±1.15	22.00±2.00
	E _{OEB}	-	15.66±1.15	18±1.46	24.33±1.15
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	E _M	9.33±1.15	15.66±1.15	22.66±1.15	24±1.00
	E _{OEB}	20.66±1.15	21±1,00	22.66±1.00	24.33±1.15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	E _M	-	6.33±1.15	11±1.00	13.33±1.15
	E _{OEB}	6.33±0.57	13.33±1.15	16.66±1.15	18±1.00

Tableau 25: Sensibilité de quelques souches bactériennes vis-à-vis de l'HE de *R. montana* des régions d'Algérie: Mila et Oum El bouaghi (Zellagui et al., 2012).

E M : échantillon Mila / **E OEB** : échantillon Oum El Bouaghi

Selon Nogueira et al., (2008), les souches de *Candida* et de *staphylococcus* sont inhibées par l'huile essentielle de *Ruta graveolens*, et cela concorde avec nos résultats qui montrent une sensibilité très marquée (36.5 mm) de *Candida albicans* vis-à-vis de notre huile et une légère activité inhibitrice pour *Staphylococcus aureus* en présence de l'huile essentielle de rue.

Selon Nogueira et al., (2008) ainsi que Ross et al., (1980), qui ont montré que l'huile essentielle de *Ruta graveolens* est active contre les espèces de levures, mais pas contre *staphylococcus aureus*.

Toutefois, SA et al., (1995) in Nogueira et al., (2008) a remarqué que l'activité antimicrobienne de *Ruta graveolens* contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* cela est vérifié pour *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* où on note néanmoins une légère activité inhibitrice, mais concernant *Pseudomonas aeruginosa*, l'HE de *Ruta montana* a enregistré sa plus faible action d'inhibition.

Cependant, étant donné le peu de documentations concernant l'activité antimicrobienne de l'HE de *Ruta montana*, nos résultats ont été également comparés avec ceux obtenus par les huiles essentielles de *Ruta graveolens*.

Cas de l'aneth

L'HE de l'Aneth présente des propriétés antimicrobiennes nettement plus élevées au cours de la saison estivale (Vokk et al., 2011). Les constituants les plus actifs semblent être des composés phénoliques aromatiques avec un large éventail antimicrobien (Tajkarimi et al., 2010). Cependant, il est possible que l'activité antimicrobienne soit liée à la présence d'autres constituants mineurs (Hoet et al., 2006), Myristicine, α - thujene, α - pinène, sabinene et d'autres composés des huiles essentielles sont également signalés pour être responsables des activités antibactérienne et antifongique des épices et des herbes (Tajkarimi et al., 2010).

Selon Vokk et al., 2011, le test de sensibilité réalisé sur quatre souches microbiennes vis-à-vis de l'HE d'*Anethum graveolens* révèle des zones d'inhibition qui varie de 8 à 29.5mm tableau 26 récapitule les résultats obtenus.

Tableau 26: Sensibilité de quelques souches microbiennes vis-à-vis de l'HE d'aneth en fonction de la saison et de l'organe d'extraction (Vokk et al., 2011).

Micro-organismes testés	HE d'Aneth (saison hivernale)	HE d'Aneth (saison estivale)	HE d'Aneth (graine)
<i>Staphylococcus albus</i>	8.0	26.0	11.0
<i>Bacillus mesentericus</i>	-	25.0	15.0
<i>E.coli</i>	9.0	29.5	19.0
<i>Aspergillus flavus</i>	8.0	24.7	16.5

Dans le cas d'*E.coli* les résultats de cette étude sont en accord avec nos résultats (9mm <14 mm< 29.5mm).

L'effet de l'HE d'*Anethum graveolens*, ainsi que la poudre de la plante d'aneth séchées sur la croissance d'*E. Coli* a été démontré (Isopencu et Ferdes, 2012).

Sur la base des résultats obtenus par Hong et al., 2011, on peut affirmer que l'huile essentielle extraite des graines d'*Anethum graveolens* possède une activité anti-*Candida in vitro* et *in vivo*.

Selon Valero et Salmeron (2003) et Pibiri (2006), il est très difficile de faire une comparaison entre les résultats trouvés et ceux rapportés par la littérature, ceci pourrait s'expliquer par:

- Nature du matériel végétal (l'espèce, l'HE, origine géographique, altitude, saison de cueillette) ;
- Procédé d'extraction ;
- Composition chimique des HE utilisées ;
- Niveau de pureté du produit final et sa conservation ;
- Nature des souches testées ;

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

- Méthodes utilisées pour estimer l'activité antimicrobienne ;
- Milieux de culture employés (milieu synthétique ou naturel) ;
- Qualité des souches testées.

Les zones d'inhibition des HE testées sur les différentes souches utilisées sont illustrées par les figures 36 à 40.

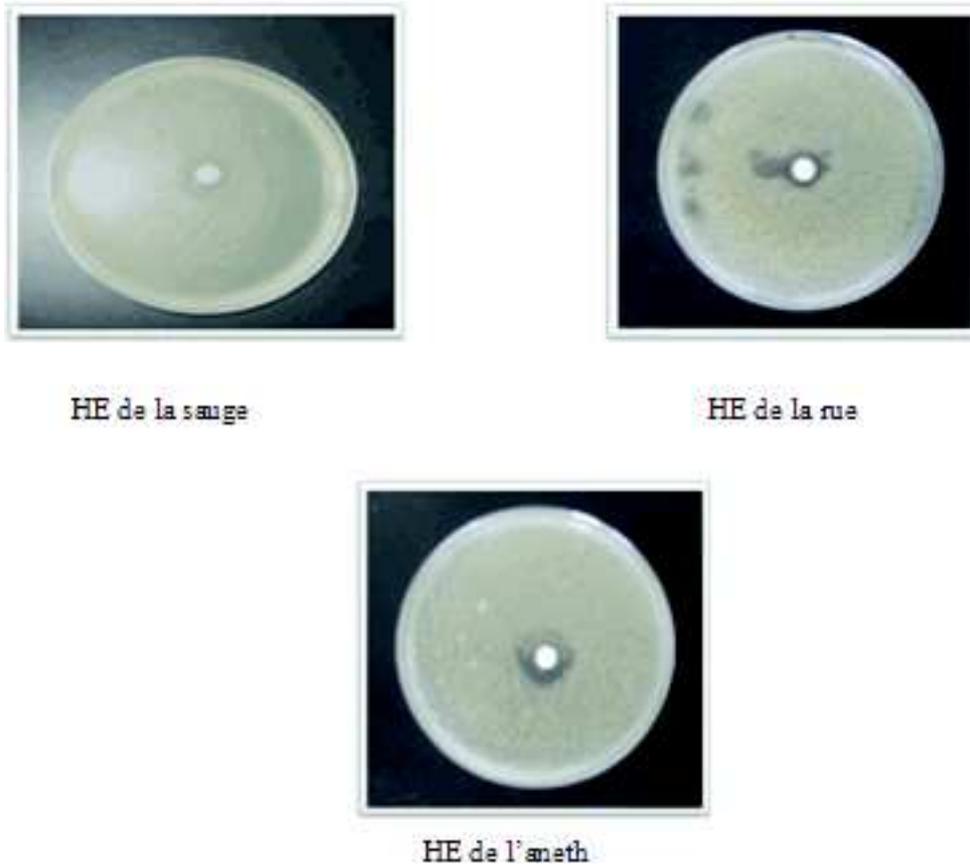


Figure 36 : Zones d'inhibition des huiles testées sur *Bacillus subtilis*



HE de la sauga



HE de la rue

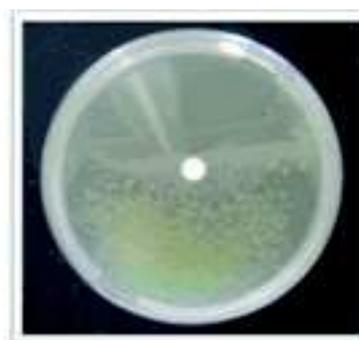


HE de l'aneth

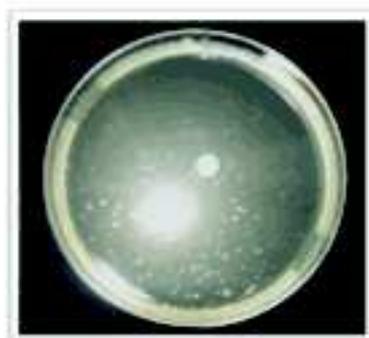
Figure 37 : Zones d'inhibition des huiles testées sur *Staphylococcus aureus*.



HE de la sauge

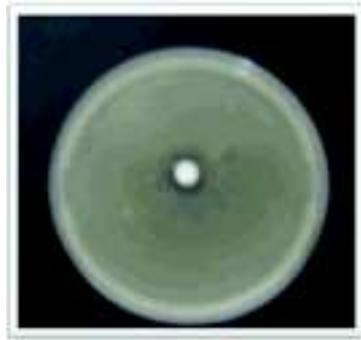


HE de la rue



HE de l'aneth —

Figure 38 : Zones d'inhibition des huiles testées sur *Pseudomonas aeruginosa*.



HE de la sauge



HE de la rue

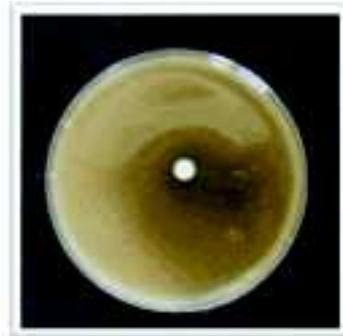


HE de l'aneth

Figure 39 : Zones d'inhibition des huiles testées sur *Escherichia coli*



HE de la sauge



HE de la rue



HE de l'aneth

Figure 40 : Zones d'inhibition des huiles testées sur *Candida albicans*

6.2-Détermination de la CMI & de la CMB

Afin de confirmer les résultats trouvés précédemment dans l'étude qualitative de l'activité antimicrobienne, nous avons procédé à la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des HE de *Salvia officinalis*, de *Ruta montana* et d'*Anethum graveolens* ainsi que la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) des HE de *Salvia officinalis*, de *Ruta montana*.

Les valeurs des CMI et des CMB des HE testées vis-à-vis des souches microbiennes sensibles sont représentées dans les tableaux 27, 28 et 29. Les résultats des CMI sont illustrés par les figures 41, 42, 43, 44, 45 et 46.

+ : croissance microbienne, - : absence de croissance, - : CMI.

D'après les résultats obtenus, *Pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus résistante vis-à-vis des HE étudiées, alors que *Bacillus subtilis* s'est avéré être la plus sensible (tableau 27).

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 28: Concentration Minimales Inhibitrices (CMI) des HE étudiées

Souches	CMI (v/v)		
	Sauge	Rue	Aneth
<i>Bacillus subtilis</i>	0.03	0.03	0.25
<i>E.coli</i>	0.25	> 2	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.06	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	> 2	> 2
<i>Candida albicans</i>	0.125	0.03	1

Tableau 29: Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) des HE de la sauge et de la rue.

Souches	CMB (v/v)	
	Sauge	Rue
<i>Bacillus subtilis</i>	0.03	0.25
<i>E.coli</i>	> 2	> 2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.125	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 2	> 2
<i>Candida albicans</i>	0.5	0.06

- Dans le cas de la sauge

L'HE de la sauge présente une assez bonne activité antimicrobienne à travers des CMI plus tôt 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= 6.75 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 supérieure à 2%.

Bacillus subtilis et *Staphylococcus aureus* se sont avérées être les souches les plus sensibles sous l'action de l'HE de la sauge avec des CMI de 0.03% et 0.06% respectivement, ces résultats concordent avec l'étude qualitative. La CMB est égale à la CMI dans le cas de *Bacillus subtilis* alors que pour *Staphylococcus aureus* la CMB est plus élevée 0.125%.

Dans le cas de la levure, l'HE de *Salvia officinalis* montre une CMI moyenne de 0.125% contre *Candida albicans*. Cela confirme également le test de sensibilité par la méthode de diffusion sur gélose.

Cas de la Rue des montagnes

D'après les résultats des tableaux 28 et 29 l'HE de *Ruta montana* montre une excellente activité antimicrobienne vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* avec les CMI les plus faibles de 0.03%. Les CMB sont plus élevées 0.25% et 0.06% respectivement. La valeur notée dans le cas de *Candida albicans* va dans le sens des résultats de l'étude qualitative.

La valeur de la CMI enregistrée dans le cas de *Staphylococcus aureus* est de 1% et est égale à la CMB.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* et *E coli* les CMI et CMB n'ont pas été déterminées (supérieure à 2%), cela confirme les résultats de l'analyse qualitative.

Cas de l'aneth

L'HE d'*Anethum graveolens* montre un pouvoir antimicrobien très moyen voir faible pour certaines souches, dans le cas de *Bacillus subtilis* on note une CMI de 0.25%, cette valeur est en accord avec les résultats de l'aromatogramme.

Les valeurs de la CMI pour *E.coli* et *Candida albicans* sont de 1%, et pour *Staphylococcus aureus* on note une CMI de 2% ces résultats concordent avec les valeurs obtenues par le test de sensibilité.

Dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* la CMI n'a pas été déterminé (supérieure à 2%).

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 30 résume les rapports des CMB/CMI des HE de la sauge et de la rue.

Tableau 30: Rapports CMB/CMI des HE de la sauge et de la rue.

Souches	CMB/CMI	
	Sauge	Rue
<i>Bacillus subtilis</i>	1	8.33
<i>E.coli</i>	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.08	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND	ND
<i>Candida albicans</i>	4	2

ND : Non Déterminé

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

Les rapports CMB/CMI déterminés dans le tableau 30, indiquent que l'HE de la sauge est bactéricide vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (CMB/CMI < 4), dans le cas de l'HE de rue le rapport CMB/CMI souligne le caractère bactériostatique de cette huile contre *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*.

La détermination des CMI des huiles testées sur les différentes souches utilisées est illustrée par les figures 41 à 46.

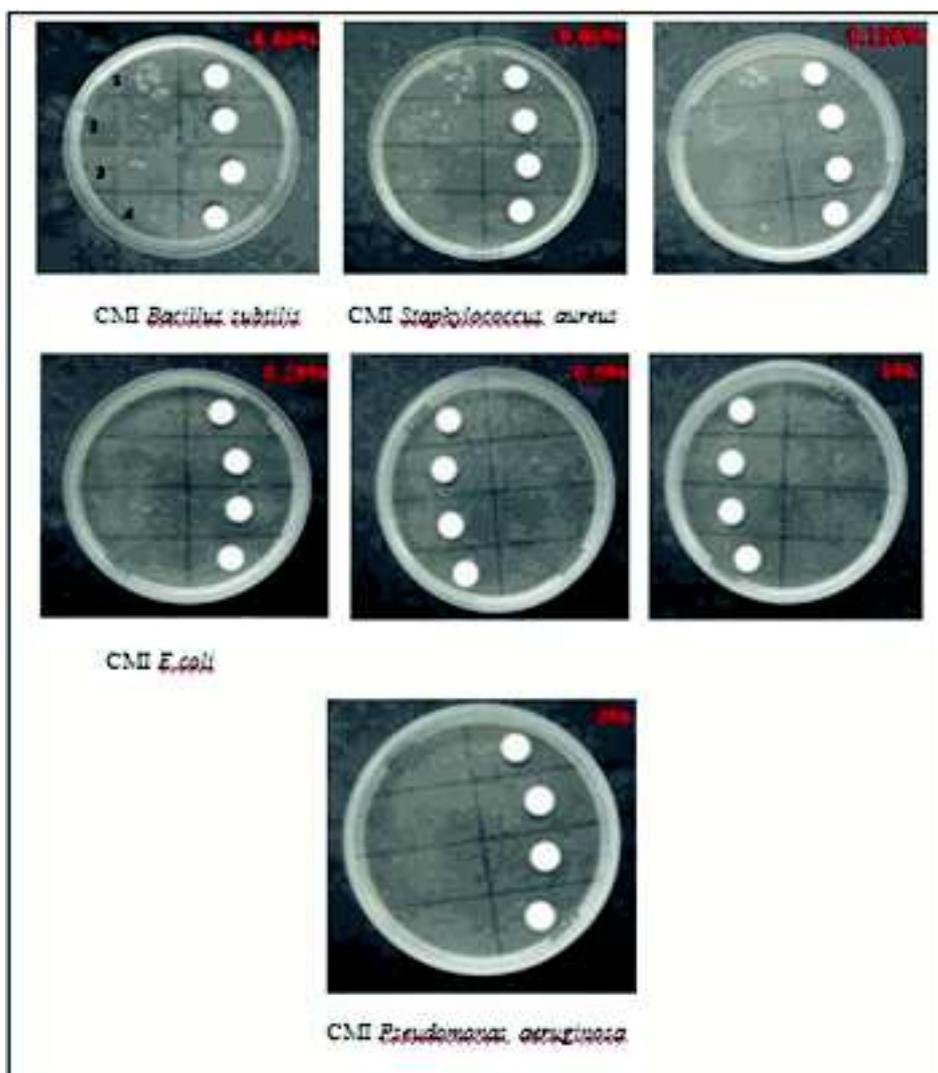


Figure 41 : Illustration de la CMI de l'HE de la sauge vis-à-vis des 4 souches bactériennes testées.

1 : *E. coli* / 2 : *Staphylococcus aureus* / 3 : *Pseudomonas aeruginosa* / 4 : *Bacillus subtilis*

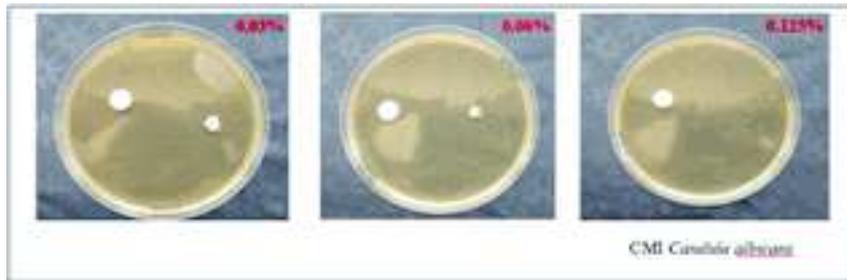


Figure 42 : Illustration de la CMI de l'HE de la sauge vis-à-vis de *Candida albicans*.

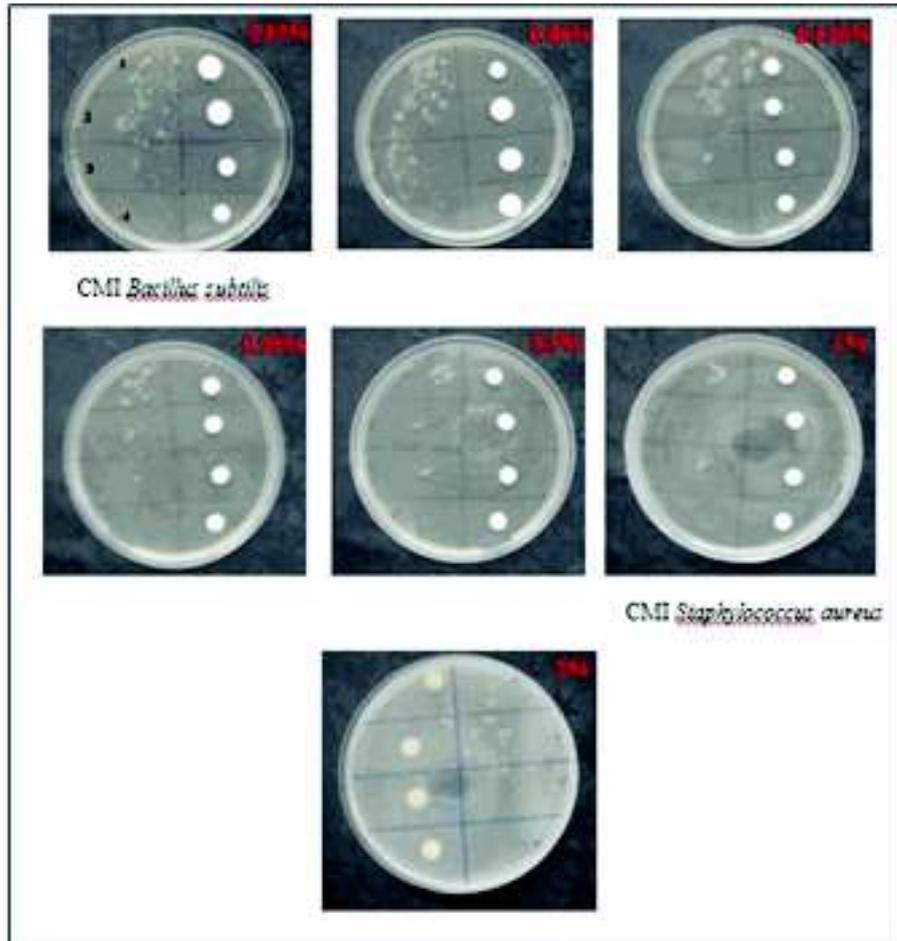


Figure 43 : Illustration de la CMI de l'HE de la rue vis-à-vis des 4 souches bactériennes testées.

1 : *E.coli* / 2 : *Staphylococcus aureus* / 3 : *Pseudomonas aeruginosa* / 4 : *Bacillus subtilis*



Figure 44 : Illustration de la CMI de l'HE de la rue vis-à-vis de *Candida albicans*

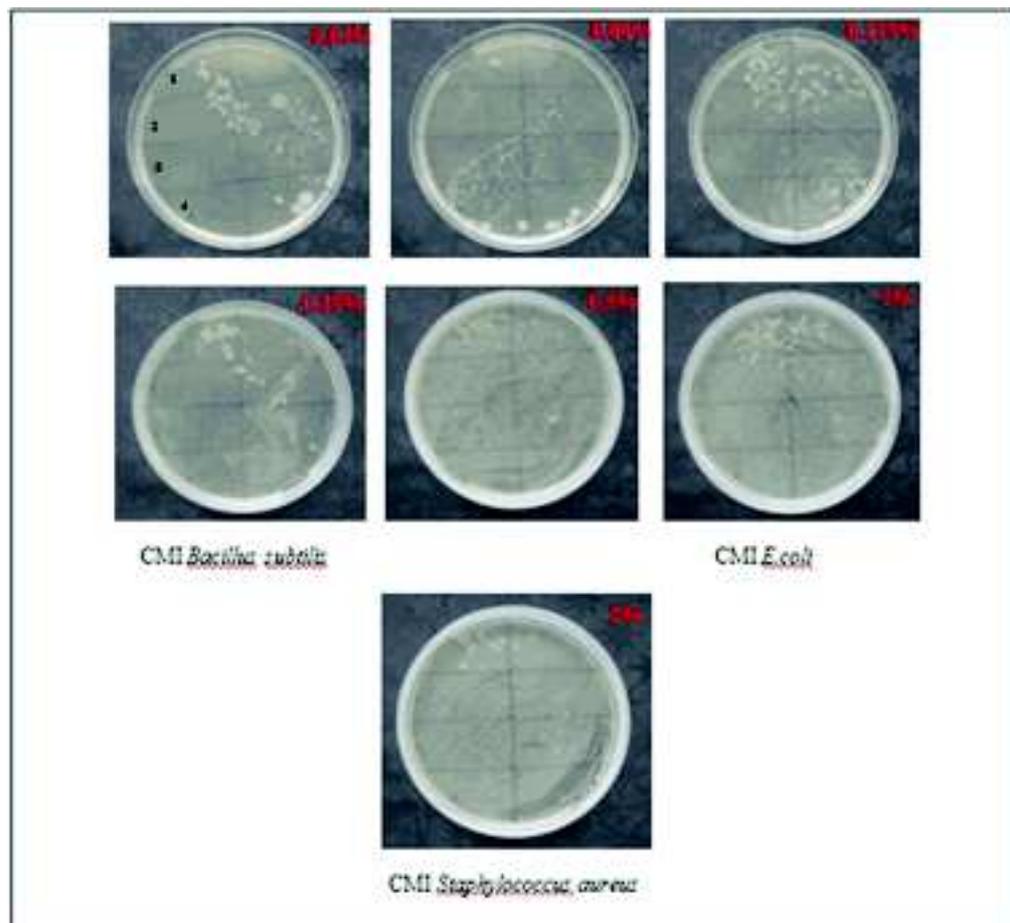


Figure 45 : Illustration de la CMI de l'HE de l'aneth vis-à-vis des 4 souches bactériennes testées.

1 : *E. coli* / 2 : *Staphylococcus aureus* / 3 : *Pseudomonas aeruginosa* / 4 : *Bacillus subtilis*

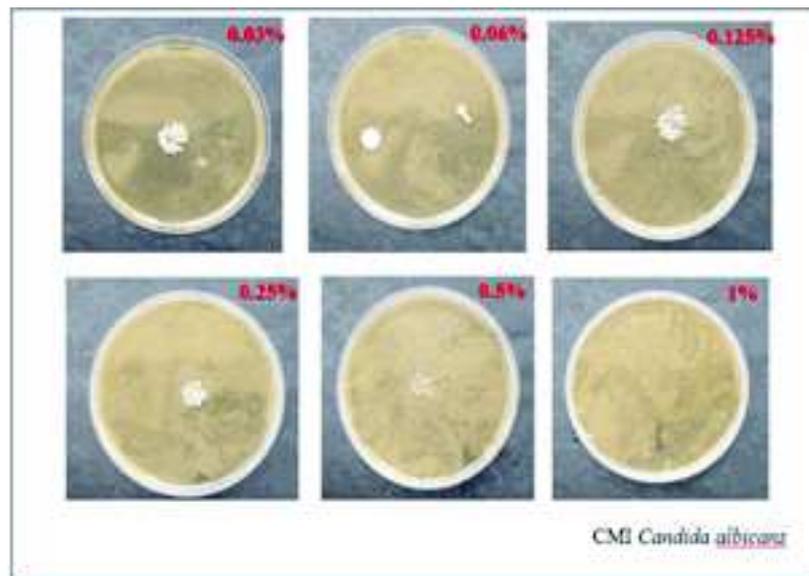


Figure 46 : Illustration de la CMI de l'HE de l'aneth vis-à-vis de *Candida albicans*.

7-Analyse statistique

L'analyse de la variance concerne l'essai des activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de la sauge, de la rue et de l'aneth.

7.1-Activité antioxydante

7.1.1-Activité de piégeage du radical DPPH

- L'essai
 - Variable dépendante **Y** : Activité de piégeage du radical DPPH.
 - Facteur **A** : HE avec trois possibilités (sauge, rue, aneth).
 - Facteur **B** : Concentration avec 5 possibilités (500, 1000, 1500, 2000, 4000 mg/l).
- Hypothèses testées
 - H_0^A : Absence de l'action du facteur **A** (Pas de différence significative en termes d'activité de piégeage du DPPH entre les trois huiles).
 - H_0^B : Absence de l'action du facteur **B** (Pas de différence significative en termes d'activité de piégeage du DPPH entre les 5 concentrations).
 - H_0^{AxB} : Absence d'interaction entre **A** et **B**.
- Règles de décisions
 - On accepte H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} si les valeurs de significations sont supérieures à 0.05, dans le cas contraire, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} sont rejetées.

- Analyse de la variance

Source	Sommes des carrés	ddl	Moyennes des carrés	F	Signification
HE	42327	2	21163	-	.000
Concentrations	252391	4	63098	-	.000
HE * Concentrations	42864	8	5358	-	.000
Erreur	0.000	0			
Total corrigé	337.582	14			

Tableau 31: Tests des effets inter-sujets (pouvoir de piégeage du radical DPPH)

R deux = 1.000 (R deux ajusté = 1.000)

D'après les résultats obtenus dans le tableau 31, et en se référant aux règles de décisions, on rejette les hypothèses : H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} .

Donc au seuil de 5% :

- **Le facteur A agit** : L'HE a un effet significatif sur l'activité de piégeage du radical DPPH
- **Le facteur B agit** : La concentration a un effet significatif sur l'activité de piégeage du DPPH.
- **Le facteur AxB agit**: L'interaction entre les deux variables qualitatives : « HE » et « Concentration » a un effet significatif sur le pouvoir de piégeage du radical DPPH.
- **Test de Student-Newman-Keuls**

Lorsque l'hypothèse H_0 est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

Tableau 32: Facteur B « Concentration » (pouvoir de piégeage du radical DPPH)

Concentration	Moyenne
500 mg/l	5.153
1000 mg/l	6.398
1500 mg/l	9.801
2000 mg/l	11.464
4000 mg/l	16.747

Les résultats du test de Student-Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement suivant :

- Classement des **Concentrations** selon leurs l'activité de piégeage du DPPH:
- 500 mg/l < 1000 mg/l < 1500 mg/l < 2000 mg/l < 4000 mg/l

7.1.2-Pouvoir réducteur

- L'essai
 - Variable dépendante **Y** : Pouvoir réducteur.
 - Facteur **A** : HE avec trois possibilités (sauge, rue, aneth).

- Facteur **B** : Concentration avec 5 possibilités (500, 1000, 1500, 2000, 4000 mg/l)
- Hypothèses testées
 - H_0^A : Absence de l'action du facteur **A** (Pas de différence significative en termes de pouvoir réducteur entre les trois huiles).
 - H_0^B : Absence de l'action du facteur **B** (Pas de différence significative en termes de pouvoir réducteur entre les 5 concentrations).
 - H_0^{AxB} : Absence d'interaction entre **A** et **B**.
- Règles de décisions
 - On accepte H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} si les valeurs de significations sont supérieures à 0.05, dans le cas contraire, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} sont rejetées.
- Analyse de la variance

Tableau 33: Tests des effets inter-sujets (pouvoir réducteur)

Source	Sommes des carrés	ddl	Moyennes des carrés	F	Signification
Huiles	0.375	2	0.187	-	.000
Concentrations	0.396	4	0.099	-	.000
Huiles * Concentrations	0.069	8	0.009	-	.000
Erreur	0.000	0	-	-	
Total corrigé	0.840	14	-	-	

R deux = 1.000 (R deux ajusté = 1 .000)

D'après les résultats obtenus dans le tableau 33, et en se référant aux règles de décisions, on rejette les hypothèses : H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} .

Donc au seuil de 5% :

Le facteur A agit : L'HE a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur B agit : La concentration a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

Le facteur AxB agit : L'interaction entre les deux variables qualitatives : « HE » et « Concentration » a un effet significatif sur le pouvoir réducteur.

- **Test de Student-Newman-Keuls**

Lorsque l'hypothèse H_0 est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

Concentration	Moyenne
500 mg/l	0.275
1000 mg/l	0.430
1500 mg/l	0.526
2000 mg/l	0.611
4000 mg/l	0.756

Tableau 34: Facteur B « Concentration » (pouvoir réducteur)

Les résultats du test de **Student-Newman-Keuls**, nous permettent d'aboutir au classement suivant :

- Classement des **Concentrations** selon leurs pouvoirs réducteurs :
500 mg/l < 1000 mg/l < 1500 mg/l < 2000 mg/l < 4000 mg/l

7.2-Activité antimicrobienne

7.2.1-Aromatogramme

- L'essai
 - Variable dépendante **Y** : Diamètre de la zone d'inhibition.
 - Facteur **A** : HE avec trois possibilités (sauge, rue, aneth).
 - Facteur **B** : Souches avec 5 possibilités (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*).
- Hypothèses testées
 - H_0^A : Absence de l'action du facteur **A** (Pas de différence significative en termes diamètre de la zone d'inhibition entre les trois huiles).
 - H_0^B : Absence de l'action du facteur **B** (Pas de différence significative en termes diamètre de la zone d'inhibition entre les 5 souches).
 - H_0^{AxB} : Absence d'interaction entre **A** et **B**.
- Règles de décisions

On accepte H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} si les valeurs de significations sont supérieures à 0.05, dans le cas contraire, les hypothèses H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} sont rejetées.
- Analyse de la variance

Source	Sommes des carrés	ddl	Moyennes des carrés	F	Signification
Huiles	19.658	2	9.829	-	.000
Souches	305.150	4	76.288	-	.000
Huiles * Souches	400.925	8	50.116	-	.000
Erreur	.000	0			
Total corrigé	725.733	14			

Tableau 35: Tests des effets inter-sujets (zone d'inhibition).

R deux = 1.000 (R deux ajusté = 1.000)

D'après les résultats obtenus dans le tableau 35, et en se référant aux règles de décisions, on rejette les hypothèses : H_0^A , H_0^B et H_0^{AxB} .

Donc au seuil de 5% :

- **Le facteur A agit** : L'HE a un effet significatif sur le diamètre de la zone d'inhibition.
- **Le facteur B agit** : La souche a un effet significatif sur le diamètre de la zone d'inhibition.
- **Le facteur AxB agit** : L'interaction entre les deux variables qualitatives : « Extrait » et « Souche » a un effet significatif sur le diamètre de la zone d'inhibition.
- Test de Student-Newman-Keuls

Lorsque l'hypothèse H_0 est rejetée, on effectue ce test pour classer les moyennes pour chaque facteur.

Tableau 36: Facteur B « Souches »

Souches	Moyenne
Pseudomonas aeruginosa	8.500
Escherichia coli	12.750
Staphylococcus aureus	15.000
Bacillus aureus	15.750
Candida albicans	22.333

Les résultats du test de Student-Newman-Keuls, nous permettent d'aboutir au classement suivant :

- Classement des **souches** selon leurs diamètres d'inhibition:

Pseudomonas aeruginosa < Escherichia coli < Staphylococcus aureus < Bacillus subtilis < Candida albicans.

Conclusion générale & Perspectives

Les produits naturels sont et restent toujours une source inépuisable de structures complexes et diverses. Ils jouent un rôle important dans de nombreuses applications : la parfumerie, l'industrie pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire.

Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.)

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antioxydante et antimicrobienne. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. L'évaluation de telles propriétés demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agents antioxydants et antimicrobiens naturels. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer la composition chimique et les activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles extraites à partir de trois plantes qui poussent spontanément en Algérie : *Salvia officinalis*, *Ruta montana* et *Anethum graveolens*.

Les observations des coupes anatomiques des parties aériennes des espèces étudiées sous microscope photonique ont révélé la présence de **poils sécréteurs**, **tecteurs** et **glandulaires** pour la sauge, de **poches sécrétrices** dans le cas de la rue des montagnes et de **canaux sécréteurs** pour l'aneth.

La détermination du profil chimique des HE testées par CPG seule et CG/SM nous a permis d'identifier:

- **56** composés qui correspondent à **96.1 %** de l'ensemble de l'HE de *Salvia officinalis* avec un chémotype riche en monoterpènes oxygénés (**55.9%**), dont les composés majoritaires sont l'**α-Thujone (18.7%)** suivi du **Camphor (14.1%)**, du **1,8 cineole (13%)** et du **Viridiflorol (10.2%)**.
- **13** composés qui correspondent **99.9%** de l'ensemble de l'HE de *Ruta montana* avec une forte prévalence des cétones, et la dominance quasi-totale de la **2-undecanone (94%)**.
- **36** composés dans l'HE d'aneth représentant **98.1%** de la totalité de l'HE analysée avec une abondance des monoterpènes oxygénés (**48.33%**) : la **Myristicin (39.1%)**, **α-phalendrene (15.7%)**, suivis du **Limonene (15.7%)**, **γ-Terpinene (8.6%)** et de la **Fenchone (7.2%)** comme constituants majoritaires.

L'analyse de la capacité antioxydante des HE étudiées estimée par deux méthodes : le pouvoir de piégeage du radical DPPH et le test de réduction du fer, de cette étude ressortent les résultats suivants:

- Le pouvoir de piégeage du radical DPPH par les HE de sauge, de la rue des montagnes et de l'aneth, augmente proportionnellement avec la concentration. Néanmoins l'activité anti-radicalaire des HE testées reste faible par rapport à celle de l'antioxydant de synthèse (BHT), aussi la concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres (**IC₅₀**) n'a pas été déterminée étant donné que le taux d'inhibition ne dépasse pas les **24%** à la concentration la plus élevée (4000 mg/l).
- Les résultats du pouvoir réducteur viennent confirmer ceux du test de piégeage du radical DPPH : les HE testées présentent une capacité réductrice du fer mais elle reste toutefois faible.

L'étude de l'activité antimicrobienne des HE testées a été évaluée par un test de sensibilité par la méthode de l'aromatogramme (étude qualitative), et par une étude quantitative par le biais de la détermination des CMI et CMB vis-à-vis de cinq souches microbiennes.

De l'étude qualitative découle les points suivants :

- L'HE de la sauge présente une légère activité inhibitrice vis-à-vis de *Bacillus subtilis*, *E.coli* et *Candida albicans*. Une activité inhibitrice modérée dans le

cas *Staphylococcus aureus*, alors qu'elle n'a quasiment aucune activité contre *Pseudomonas aeruginosa*.

- Dans le cas de l'HE de la rue une forte inhibition est constatée vis-à-vis de *Candida albicans*, un léger pouvoir inhibiteur est enregistré contre *Bacillus subtilis*, *E.coli* et *Staphylococcus aureus*. Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* montre une résistance très marquée avec le plus faible diamètre.
- Pour l'HE de l'aneth, on note une activité inhibitrice modérée vis-à-vis de *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Alors qu'un léger pouvoir inhibiteur est enregistré contre *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

La mise en évidence de la résistance des souches microbiennes testées à travers la détermination des CMI révèle un niveau de sensibilité très hétérogène d'une souche à une autre vis-à-vis des HE étudiées ; *Pseudomonas aeruginosa* s'est avérée être la souche la plus résistante (CMI $\geq 2\%$) alors que *Bacillus subtilis* est la plus sensible (CMI $\leq 0.25\%$).

Dans le cas de l'HE de la sauge, les CMI obtenues varient entre 0.03 et 2 %, pour l'HE de rue ; les CMI notées s'échelonnent de 0.03 à 1% et dépassent 2% dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli*. Pour l'aneth, les CMI enregistrées varient entre 0.25 à 2% et sont supérieures à 2% dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Les valeurs des CMB enregistrées pour les HE de la sauge et de la rue sont plus ou moins proches s'échelonnent de 0.03 à 0.5%. Cependant, dans le cas *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli* les CMB n'ont pas été déterminées ($\geq 2\%$).

Les rapports CMB/CMI (≤ 4) révèlent que les deux HE étudiées (sauge et rue) semblent exercer une action bactéricide contre *S. aureus* et *C. albicans*. Aussi l'HE de *S. officinalis* présente un effet bactériostatique contre *B. subtilis*.

L'activité antimicrobienne des HE est hautement dépendante de leurs compositions en constituants principaux, c'est derniers appartiennent à la classe des alcools terpeniques (les phénols principalement).

Enfin, ces résultats restent préliminaires et notre travail ouvre de nombreuses perspectives :

- De tester d'autres méthodes d'extraction et leur influence sur la composition chimique et les capacités biologiques.
- Compléter l'étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des HE étudiées par d'autres tests qui viendront confirmer les résultats obtenus.
- Extraction des composés phénoliques des plantes testées et étude de leurs capacités biologiques.
- Etude *in vivo* par une administration orale des HE testées chez les souris pour déterminer les niveaux de toxicité.
- Tester l'activité antivirale de l'HE de la rue qui est composée d'un constituant quasi majoritaire appartenant à la famille des cétones et qui a priori présente des propriétés antivirales intéressantes.
- Vérifier les résultats expérimentaux dans un aliment sélectionné afin de les utiliser dans le domaine agroalimentaire

A travers ce modeste travail, nous espérons avoir contribué à la valorisation de *Salvia officinalis*, *Ruta montana* et *Anethum graveolens* comme plantes médicinales traditionnelles largement utilisées dans le monde.

Références bibliographiques

A

- 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.146, n.6, p.p.1739-1747.
- AFNOR, 2000.** Association française de normalisation. Normes française : huile essentielle. Ed. Afnor, Paris.
- Alizadeh A., Alizadeh O., Sharafzadeh S.H., Mansoori S., 2011.** Effect of different ecological environments on growth and active substances of garden thyme. *Adv. Envir. Bio.*, vol. 5, p.p. 780-783.
- Alizadeh A., Shaabani M., 2012.** Essential Oil Composition, Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity in *Salvia officinalis* L. Cultivated in Iran. *Advances in Environmental Biology*. Vol. 6(1), p.p. 221-226.
- Anonyme 1:** <http://www.aroma-zone.com/aroma/fichesaugeofficinale.asp> (dernière consultation août 2013)
- Anonyme 2:** Pages infinit. Net/belber/annehtm/Ruta.htm-6k.
- Anonyme 3:** Arnold Werner web site: www.awl.ch (dernière consultation juillet 2013).
- Anonyme 4:** Toiledepices : www.toiledepices.com (dernière consultation juillet 2013).
- Anonyme 5:** <http://www.aroma-zone.com/aroma/ficheaneth.asp> . (dernière consultation août 2013)
- Anonyme 6:** http://www.plantes-botanique.org/famille_apiaceae (dernière consultation juin 2013).
- Anonyme 7 :** <http://www.mon-aromatherapie.com/que-dit-la-science/huile-essentielle-antibiotique-la-fin-des-pathogenes-resistants> (dernière consultation août 2013).
- Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Paris, Lavoisier, 522p. (Technique et Documentation)
- Arnaud P., 1985.** Cours de chimie organique. Ed. bordas, Paris.

B

- Baba Aissa F., 1999.** Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ; Ed : LIBRAIRIE MODERNE – ROUIBA ; p.p.243-244.
- Babri R.A., Khokhar I., Mahmood Z., Mahmud S., 2012.** Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Anethum graveolens* L. *Sci.Int. (Lahore)*, vol. 24(4), p.p.453-455.
- 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.

- Banthorpe D.V., Charwood B.V., 1972.** Chemistry of terpènes and terpenoïdes. Ed.A.A. New man Academic Press, London and New York, p.p.337-374.
- Baratta M.T., Dorman H.J.D., Deans S.G., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Ruberto G., 1998.** Antibacterial and anti-oxidant properties of some commercial essential oils. *Flav. Frag. J.*, vol. 13, p.p. 235-244.
- Bartosz G., 2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. Vol.9, p.p.5-21.
- Belaiche P., 1979.** L'aromatogramme : traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome 1. M. S. A. Editeur, Paris, 204p.
- Belkassam A., Zellagui A., Gherraf N., Lahouel M., Rhouati S., 2011.** Essential Oil Composition of Algerian *Ruta Montana* (Clus.) L. and its Antibacterial Effects on Microorganisms Responsible for Respiratory Infections. *Advances in Natural and Applied Sciences*, vol 5(3), p.p. 264-268.
- Benhabiles N.E., 1995.** Comparaisons des huiles essentielles de deux espèces Algériennes de romarin : extraction et étude analytique. Thèse magister, ENP, Alger.
- 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.
- Berlette B.S., Stadtman E.R., 1997.** Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry.*, vol.272, p.p. 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.
- Bernarth J., Danos B., Hethelyi E., 1991.** *Herba Hung*, p.p. 30-35.
- Bezanger B.L., Pinkas M., Torck M., 1976 .**Les Plantes Dans La Thérapeutique Moderne, Maloine, Paris.
- Bezanger B.L., Pinkas M., Torck M., 1986 .**Les Plantes Dans La Thérapeutique Moderne, 2^{eme} Ed.
- Blakewa y J., Salerno M., 1987.** Pour la science. Institut des renseignements scientifiques et techniques, Paris.
- Bonnier G., 1999.** La Grande Flore en Couleur; Ed : BELIN; Tome 3; p.p.205-206.
- Bossard R. et Cuisance P., 1981 .** Arbres Et Arbustes D'ornement Des Régions Tempérées Et Méditerranéennes, Paris, France.
- Bouaziz M., Thabèt Yangui T., Sayadi S., Dhouib A., 2009.** Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 47, p.p. 2755-2760.
- 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.

- 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).
- Burits M. et 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.
- Burton G.W., Traber M.G., Acuff R.V. et al. 1998.**Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentration in reponse to supplementation deuterated natural and synthetic vitamin E. Am J Clin Nutr.vol. 64, p.p. 669-684.
- C
- Caillet S., Lacroix M., 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Science Appliquée à l'Alimentation (RESALA) INRS- institut Armand-Frappier, Université de LAVAL (Québec).
- Callan W., Johnson D. L., Westcott M. P., Weity L. E., 2007.** Herb and oil composition of dill (*Anethum graveolens* L): effects of crop maturity and plant density. Ind. CropsProducts. vol. 25, p.p. 282–287.
- 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).
- Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., 2002.** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (teatree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob. Agents Chemother.Vol.46, p.p.1914-1920.
- Cédric B., Nicolas F., [Claude M.](#), 2003.** A new coumarin glucoside, coumarins and alkaloids from *Ruta corsica* roots. [Fitoterapia](#) . [vol.75 \(2\)](#) , p.p.242-244.

- Chahardehi A.M., Ibrahim D., Sulaiman S.F., 2010.** Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of pileamicrophylla. International Journal of Microbiology, Article ID 826830, 6p.
- 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.
- Chavanne M. 1986.** Chimie organique experimentale. Ed. Morula, Berlin.
- Cheftel H., Cheftel J.C., 1977.** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. vol.1. Edition Lavoisier, Paris, p.381.
- Clevely A., Richmond K., 1997 .** Plantes Et Herbes Aromatiques, Connaître Et Préparer, Larousse Paris.
- Conner D.E., 1993.** Naturally occurring compounds: Antimicrobials in foods. New York, Davidson In. P. & Branen A.L., 468p.
- Couladis M., Tzakou O., Mimica-Ducki Y.N., Janic R., Stojanovic D., 2002. Flavour. Frag. J. 17, 119p.
- 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.
- Cronquist A. , 1968.** The Evolution and Classification of Flowering Plants, 396p.
- Cuendet M. , Hestettmann K., Potterat O., 1997.** Iridoid glucosides with free radical scavenging proprieties from *Fragariae blumei*. Helvetica Chemica Acta, vol. 80, p.p. 1144-1152.
- D
- De Jussieu A.L., 1789.** *Genera Plantarum*, 296p.
- 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.
- Delamare A.P.L., I.T. Moschen-Pistorello, L. Artico, L. Atti-Serafini, and Echeverrigaray S., 2007.** Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food Chem., vol 100, p.p. 603-608.
- 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, pp.101-109.
- Desjobert J.M., Bianchini A., Tomi P., Costa J., Bernardini A.F., 1997.** Analisis Mag., vol. 25(6), 13p.
- Djerroumi A. et Nacef M., 2004.** 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed Palais du livre. p.p.135-131.
- Dob T., Dahmane D., Gauriat-Desrdy B., Daligault V., 2008.** Volatile Constituents of the Essential Oil of *Ruta chalepensis* L. subsp. *angustifolia* (Pers.) P. Cout. The Journal of essential oil research, vol.20, n.4, p.p.306-309.

- Dotd K.C., 1996.** The Essential Oils Book (Creating Personnel Blends For Mind and Body); Ed: STOREY BOOKS; p.p.21-52.
- Doerper S., 2008.** Modification de la synthèse des furo-Coumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique ; Thèse de Nancy – Université, INRA ; p.p.12-34.
- Dorman D.H.G., Bachmayer O., Kosar M. et Hiltunen R., 2004.** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Tuekey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 52, p.p. 762-770.
- 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.
- Dubey V.S., Bhalla. Ret Luthra R., 2003.** Sucroze mobilisation in relation to essential oil biogenesis during palmarosa inflorescence development. J. Biosci., vol. 28, n.4, pp.479-487.
- Duling E.N., Owen J.C., John B.G., Rosmary F.W., Kevin A.M., Yeap L.F., Nigel B.P. 2007.** Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. Food chemistry, vol. 101, p.p.1417- 1424.
- Dung N.T., Kim J.M., Kang S.C., 2008.** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology, vol.46, p.p.3632-3639.
- Durande, 1782.** Notions Elémentaires de Botanique, 284p.
- E
- 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.
- Ernes S., 1995 .** Arbres, Arbustes Et Arbrisseaux en Algérie, Offices des publications universitaires-Alger-Ed., 686p.
- 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.
- F
- Fakhfakh N., Zouari S., Zouari M., Loussayef C., Nacim Zouari N., 2012.** Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (Rutacea). Journal of Medicinal Plants Research. Vol. 6(4), pp. 593-600.
- 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.

Filliat P., 2012. Les plantes de la famille des Apiaceae dans les troubles digestifs. Faculté de Pharmacie de Grenoble, 129p.

Forment M., Roques H., 1941.Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, Ed. OFALAC, 59p.

Frontquer P., 1962.Plantes Médicales El Discorides Renovado, Ed Hebon S.A Barcelona, 426p.

G

Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chem., vol. 102, p.p.898-904.

Garneau F-X., 2005. Le materiel vegetal et les huiles essentielles. Huiles essentielles: de la plante à la commercialisation. Manuel pratique : Ed. Corporation la seve. Universite de Chicoutimi, Québec.

Garnero J., 1996. Huiles essentielles.Techniques de l'ingénieur, p.p.1-45.

Ghrib A., 1995. Etude comparative des huiles essentielles de menthe poussant en Algérie. Thèse de magister, chimie organique, USTHB.

Giamperi I., Fraternele D. , Ricci D., 2002. The in vitro 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.

Gil M.I., Thomàs-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M. et Kader A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, J. Agric. Food Chem., Vol.48, p.p.4581-4589.

Grella, G.E., Picci V., 1988. Variazioni stagionali dell'olio essenziale di *Salvia officinalis*. Fitoterapia. vol. 59, p.p. 97-102.

Guenther E., 1972. The essential oils. New York, Ed Robert Krieger publishing co. vol. 3.

Gueorguiv E., 1980. Technologie des produits aromatiques. Ed. Plovdiv.

Guiraud J.P., 2003. Microbiologie Alimentaire. Ed. Dunod, Paris, 652 P.

Gürsoy N., Tepe B. and Akpulat H.A., 2012. Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Salvia palaestina* (Benth) and *S. ceratophylla* (L.). Records of Natural Products, vol. 6(3), p.p. 278-287.

Gunston F., Norris F., 1983. In: lipids in Food- Chemistry. Biochemistry and Technology Pergamon Press, p.p.161-165.

H

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.

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.

Hans W.K. 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition

- Haznedaroglu, M.Z., Karabay N.U., Zeybek U., 2001.** Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil, *Fitoter.*, vol.72, p.p. 829-831.
- 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.
- Heywood V.H., 1996.** Les plantes à Fleurs, Ed. Nathan, Paris.
- Ho C.L., Wang E.I.C., Su Y.C., 2009.** Essential oil compositions and bioactivities of the various parts of *Cinnamomum camphora* Sieb. var. *linaloolifera* Fujuta. #####. vol. 31(2), p.p. 77-96.
- Hoet, S., Stevigny, C., Herent, M. F., Quetin-Lecleroq, J. 2006.** Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Med.*, vol.72, p.p.480-482.
- Hong Z., Jun T., Yuechen Z., Xiaoquan B., Jingsi Z., Yehong M., Youwei W., 2011.** In Vitro and In Vivo Activities of Essential Oil from the Seed of *Anethum graveolens* L. against *Candida* spp., *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p.p.1-8.
- 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., Iqbal T., Bhatti I. A., 2011.** Antioxidant attributes of four lamiaceae essential oils. *Pak. J. Bot.* Vol. 43(2), p.p. 1315-1321.
- I
- Isopencu G., Ferdes M., 2012.** The effet of *Anethum graveolens* upon the growth of *E.coli*. *U.P.B. Sci. Bull., Serie B.* vol. 74 (3), p.p. 85-92.
- Ivanova A., Kostova I., Rodriguez Navas H., Villegas J., 2004.** Volatile Components of Some Rutaceae Species. *Z. Naturforsch.*, vol. 59, p.p.169-173.
- J
- 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.
- Juki# M. et Miloš M., 2005.** Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croatica Chemica Acta.* Vol. 78(1), p.p. 105-110.
- 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.
- K
- Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z. et Benlabed K., 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*, vol. 15, p.p.129-133.
- Kalemba D., Kunicka A., 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* Vol. 10, p.p. 813-829.

- Kamatou G.P.P., Van Vuuren S.F., Van Heerden F.R., Seaman T., Viljoen A.M., 2007.** Antibacterial and antimycobacterial activities of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. chamelaeagnea*, South African J. Botany., vol.73, p.p. 552-557.
- Kambouche N., Merah B., Bellahouel S., Bouayed J., Dicko A., Derdour A., Younos C., Soulimani R., 2008.** Chemical Composition and Antioxidant Potential of *Ruta montana* L. Essential Oil from Algeria. Journal of Medicinal Food, vol.11, n.3, p.p.593-595.
- 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.
- 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 and on fish cubes. J. Food Sci., vol.60, p.p.1364-1374.
- 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.
- Kortenska V.D., Yanishlieva N.V., Kasaikina O.T., Totzeva I.R., Boneva M.I., Russina I.F., 2002.** Phenols oxidant efficiency in various lipid substrates Containing hydroxyl compounds. European Journal of Lipid Sciences and Technology, vol.104, p.p.513-519.
- L
- 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.
- Leclerc H., Gaillard J. L., Simonet M., 1995.** Microbiologie générale: La bactérie et le monde bactérien. Ed. Doin, Paris. 535 p.
- 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.
- Longaray Delmare A.P., Ivete T.M.P., Liane A., Luciana A.S., et Sergio E., 2007.** Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* and *Salvia triloba* cultivated in south Brazil. Food chemistry, vol.100, p.p.603-608.
- M
- Mahmoodi A., Roomiani L., Soltani M., Basti A.A., Kamali A., Taheri S., 2012.** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils and Extracts from *Rosmarinus officinalis*, *Zataria multiflora*, *Anethum graveolens* and *Eucalyptus globulus*. Global Veterinaria. Vol. 9 (1), p.p. 73-79.
- Maksimovic M., DAnijela V., Mladen M., Marija E.S., Sabaheta A., et Sonja S.Y. 2007.** Effet of the environmental condition on essential oil profile in two dinaric *Salvia*

species: *Salvia brachydon vandas* and *Salvia officinalis* L. Biochemical Systematics and Ecology., vol.35, p.p.473-478.

Marino M., Bersani C. et Comi G., 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. Int. J. Food Microbiol., vol. 67, p.p.187-195.

Martínez-Cayuela, 1995. Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. vol.77, p.p. 147-161.

Maydani M^a., 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.

Maydani M^b., 2000. Vitamin E and prevention of heart diseases in high-risk patients. Nutr Rev., vol.58, p.p.278-281.

Meena M.R., Setid V., 1994. Antimicrobial of essential oils from spices. J Food.SCI. And tech. Mysore, vol.31, p.p.68-70.

Mejrib, J., A. Manef, M. Mejria, 2010. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. Influence of drying, hydrodistillation duration and plant parts. Industrial Crops and Products.Vol. 32, p.p. 671-673.

Mioulane P., 2004. Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins ; Larousse ; Ed : PROTEA ; p.p.7-50.

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.

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^{ème} édition, Paris, Technique et Ingénierie, serie Agro-alimentaire.

Morel Y., Barouki R., 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. Biochem J. vol.342, n.3, p.p. 481- 496.

Moulin J.P., Pareau D., Rakib M. et Stambouli M., 2002. Transfert de matière. Extraction liquide – liquide. Techniques de l'ingénieur, p.p.1-13.

N

Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T., Trakoontivakorn G., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). JARQ, vol. 37(4), p.p. 249-252.

Naves Y.R. 1974. Qu'est ce qu'une huile essentielle. Ed. Masson, Paris.

Nessrien M.N.Y., Mohamed A.T., 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coated refrigerated semi fried mullet fish fillets. World J. Dairy & Food Sci., vol. 2 (1), p.p. 01-09.

Nogueira J. C. R., Melo Diniz M. F., Edeltrudes O.L., 2008. In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. Bras Otorrinolaringol, vol.74, n.1, p.p.118-124.

Novelli G.P., 1997. Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol.* vol.48, p.p.517- 527.

O

Odoul M., 2003. Les huiles essentielles. La lettre de l'Institut français de Shiatsu, n.2, p.p.1-12.

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.

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.

Ownagh A., Hasani A., Mardani K., Ebrahimzadeh S., 2010. Antifungal effects of thyme, agastache and satureja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. *Veterinary Research Forum.* 2; p.p. 99-105.

Oyaizu M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, vol.44, p.p.307-315.

Ozenda P., 2000. Les Végétaux : Organisation et diversité biologique, Ed. Dunod, 425p.

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.

P

Paris R., Godon M., 1979. Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.

Pascal G., 1979. Les antioxygènes alimentaires. *Cahier de Nutrition et de Diététique*, n°14, p.p.271-290.

PDR for herbal medicines, Ed. Thomson, Montvale, 2004, third edition, 258p.

Place L., Piccaglia R., 1995. *J. essent. Oil. Res.*, vol. 7, 443.

Pellerin P., 2001. Extraction par CO₂ a l'état super critique Annales des falsifications et de l'Expertise de Chimique, vol.94, p.p.51-62.

Perry J., Staley J., Lory S., 2004. *Microbiologie.* Collection : Sciences Sup, Dunod, 912p.

Pibiri M. C., 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilations au moyen d'huiles essentielles. Th. Doctorat, école polytechnique fédérale, Lausanne, 161 P.

Pierozan M.K., Pauletti G.F., Rota L., Santos A. C. A.D., Lerin L. A., Di Luccio M., Mossi A.J., Atti-Serafini L., Cansian R. L., Vladimir Oliveira J., 2009. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. Vol. 29(4), p.p. 764-770.

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.

Pradeau D. et Cohen Y., 1992. L'analyse protéique du médicament. Ed. médicales internationales, p.p. 418-428.

Q

Quezel P. et Santa S., 1963 . Nouvelle Flore De l'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales, vol. 1-2 Ed.CNRS, Paris, France.

R

R#dulescu V., Popescu M. L., Ilie# D. C., 2010. Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L. (*umbelliferae*) cultivated in Romania. Farmacia., vol. 58(5), p.p. 594-600.

Radulescu V., Silvia C., et Eliza O., 2004. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of *Salvia officinalis*. Journal of Chromatography A., vol.1027, p.p.121-126.

Rami K., Zheng-Guo L., 2011. Antibacterial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. African Journal of Biotechnology. Vol. 10(42), p.p. 8397-8402.

Rashid ch. A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J., Arshad M., 2010. Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica*. Analele Universit##ii dinBucure##ti – Chimie (*serie nou#*), vol. 19, n°1, p.p. 23-30.

Rasmy N. M., Hassan A. A., Foda M.I., El-Moghazy M.M., 2012. Assessment of the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts on the Shelf Life of Mayonnaise. World Journal of Dairy of Food Science. Vol. 7(1), p.p. 28-40.

Rasooli I., Abyaneh M.R., 2004. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and afltoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control, vol.15, p.p. 479-483.

Richard H., 1992. Epices et aromates. Paris, Lavoisier, 339p. (Technique et Documentation).

Ristic , Brikic D., Zalfija N.T., 1999. *Salvia officinalis* L. Bric D (ed) Institutue for medicinal plants Josif Panacic. Belgrade and Art Grafik Belgrade; p.p.151-167.

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.

Ross S.A., El-Keltawi N.E., Megalla S.E., 1980. Antimicrobial activity of some Egyptian aromatic plants. Fitoterapia, vol.51, n.2, p.p.201-206.

Rouessac F. et Rouessac A., 1995. Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes. Ed. Masson, Paris.

S

Satyanarayana S., Sushruta K., Sarma G.S., Srinivas N., Subba Raju G.V., 2004. Antioxidant activity of the aqueous extracts of spicy food additives-evaluation and comparison with ascorbic acid in *in-vitro* systems J. Herb. Pharmacother., vol. 4(2), p.p.1-10.

Schoderet M. et collaborateurs, 1989. Pharmacologie: Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Ed. Frison et Roche Paris, vol.2, p.p.509-918.

Siddhuraju P., 2007. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated Tamarindus indica seed coat. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologic, Vol.40, p.p. 982–990.

- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* vol.269, p.p.8022-8028.
- Singh G., Maurya S., De Lampasona M.P., Catalan C., 2006.** Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52, *Journal of Food Science*, vol. 70(4), p. 208-215.
- 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-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.
- Soleimani M., Azar P.A., Tehrani1 M.S., Rustaiyan A., 2009.** Volatile Composition of *Ruta graveolens* L. of North of Iran. *World Applied Sciences Journal*, vol.7, n.1, p.p.124-126.
- Sorg O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies.* vol. 327, p.p. 649-662.
- 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.
- 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.
- T
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D.O., 2010.** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*,. vol.21, p.p.1199-1218.
- Teuscher E., Anton R., Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques, épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec&Doc, Lavoisier, Paris, 105p.
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L. et Bryne D. H., 2006.** Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol.19, p.p.669–675.
- Tranchant J., Arpinaud P, Prevote A., Serpinet J., Vergnol A. et Witier P., 1995.** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 4^{ème} édition, Ed. Masson, 700p.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G., 2005.** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* vol.49, p.p. 2474-2478.

Tsankova E., Konkchiev A.N., Genova E M., 1994. J. Essent. Oil. Res., vol. 6, 375.

U

Ultee A., Bennik M.H., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. Vol.68, p.p. 1561-1568.

V

Valero M. et Salmeron M.C., 2003. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology, vol. 85, p.p.73-81.

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.

Vansant G., 2004. Radicaux libres et antioxydant : principes de base. Symposium «Antioxydants et alimentation ». Institut Danone.

Vermin G., 1982. Arome alimentaire et développement récents. Paris, Apria.

Vokk R., Lõugas T., Mets K., Kravets M., 2011. Dill (*Anethum graveolens* L.) and Parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) from Estonia: Seasonal Differences in Essential Oil Composition. Agronomy Research. Vol. 9, (Special Issue II), p.p. 515–520.

W

Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W., 2004. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the plant trichome. Annals of botany, vo1.39, n.1, p.p.3-1.

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.

Y

Yangui, T., Bouaziz, M., Dhoub, A., Sayadi, S., 2009. Potential use of Tunisian *Pituranthos chloranthus* essential oils as natural disinfectant. Lett. Appl. Microbiol. Vol.48, p.p.112-117.

Z

Zellagui A., Belkassam A., Belaidi A., Gherraf N., 2012. Environmental impact on the Chemical Composition and yield of essential oils of Algerian *Ruta Montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. Advances in Environmental Biology. Vol. 6(10), p.p. 2684-2688.

Zheng G., Kenney P.M., Lam L.K.T., 1992. Anethofuran, Carvone and Limonene: Potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil, *Planta Medica*, vol.58, p.p.339-341.

Zouari N., Fakhfakh N., Zouari S., Bougatef A., Neffati M., Ayadi MA.,
2011.Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant
and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et
Reut. (Lamiaceae). Food Bioprod. Process., vol.89(4), p.p. 257-265.