République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Université Dr Yahia Farès de Médéa
جامعة الدكتور يحي فارس المدية
Faculté des Sciences
كلية العلوم
Département des Sciences de la nature et de la vie
قسم علوم الطبيعة والحياة

Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

Spécialité : phytopathologie

Thème

Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles et des eaux aromatiques extraites des feuilles sèches d'*Eucalyptus sp*

Présenté par

Melle : MEDDAHI Hadjer **Melle : OTMANI Mounira**

Devant le jury

Kirouani Abderrezzak	MCB	Promoteur
Boucelkha Ali	MCB	Examinateur
Benlameur Zahia	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

*Avant tout je remercie Dieu "**Allah**" le tout puissant qui m'a donné la force, le courage, la volonté, la puissance et les moyens afin de pouvoir accomplir ce travail.*

*Je tiens à remercier vivement mon encadreur **Monsieur kirouani Abderrezzak**., pour la proposition du thème et le suivi de ce travail ; pour ses conseils durant la période de la réalisation de ce travail ; je suis très honoré par son accompagnement et son aide ; je lui exprime ma gratitude pour tous ses efforts, tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'adressent également à **Madame Boukhalfoun Leila** pour son aide très précieuse et sa présence à tout les moments durant toute la période de la réalisation de ce travail ; pour sa gentillesse et son soutien, qu'il trouve dans ces pages l'expression de mon grand respect et ma gratitude.*

*Nos remerciements; **Madame Benlameur Zahia** et **Monsieur Boucelkha Ali** qui nous fait l'honneur de faire partie du jury, et pour avoir accepté d'examiner mon travail.*

*Un énorme remerciement pour tous **les membres de ma famille** qui m'ont aidés et encouragés durant toute la période de réalisation de ce travail.*

*Un grand merci pour **mes amis** pour leurs encouragements.*

Enfin, une profonde reconnaissance à tous ceux qui ont participé de prés ou de loin à la réalisation de ce travail et qui ne sont pas cité ici, nous les remercions tous très chaleureusement.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles réputées pour leurs vertus thérapeutiques, nous sommes intéressés à l'étude de deux espèces d'Eucalyptus: *Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* connues par leur richesse en substance active utilisée par la population locale dans différentes thérapies. Le présent travail est consacré d'une part, à l'extraction des huiles essentielles avec une caractérisation organoleptique et physicochimique et d'autre part à l'évaluation des activités biologiques de ces huiles telles que l'activité antioxydante et antimicrobienne. Nous avons procédé à l'extraction des huiles essentielles des feuilles sèches de deux plantes par la technique d'hydrodistillation. Le rendement d'extraction de l'*Eucalyptus blakelyi* est plus intéressant que celui de l'*Eucalyptus cladocalyx*. D'après les résultats de caractérisation organoleptique et physicochimiques des huiles essentielles de deux espèces, il apparait que ces huiles avaient de bonne qualité et obéissent aux normes édictées par AFNOR. Par la suite, l'activité antioxydante in vitro a été évaluée par le test de piégeage de radical libre DPPH, il ressort que les huiles essentielles d'*Eucalyptus cladocalyx* et *Eucalyptus blakelyi* avaient un potentiel antioxydant modéré. Dans l'ensemble, les résultats obtenus ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine des applications naturelles qui peuvent être une alternative valable pour remplacer les produits chimiques.

Mots clés: *Eucalyptus blakelyi*, *Eucalyptus cladocalyx*, huile essentielle, activité antioxdante, caractérisation physicochimique.

Abstract

This work is part of the development of natural resources known for their therapeutic virtues, we are interested in the study of two species of Eucalyptus: *Eucalyptus blakelyi* and *Eucalyptus cladocalyx* known for their richness in active substance used by the local population in different therapies. This work is devoted on the one hand to the extraction of essential oils with an organoleptic and physicochemical characterization and on the other hand to the evaluation of the biological activities of these oils such as antioxidant and antimicrobial activity. We have extracted essential oils from the dry leaves of two plants using the hydrodistillation technique. The extraction yield of *Eucalyptus blakelyi* is more interesting than that of *Eucalyptus cladocalyx*. According to the results of organoleptic and physicochemical characterization of the essential oils of two species, it appears that these oils had a good quality and obey the standards decreed by AFNOR. Subsequently, the antioxidant activity in vitro was evaluated by the DPPH free radical scavenging test, it appears that the essential oils of *Eucalyptus cladocalyx* and *Eucalyptus blakelyi* had a moderate antioxidant potential. Overall, the results obtained open up new perspectives in the field of natural applications which can be a valid alternative to replace chemicals.

Key words: *Eucalyptus blakelyi*, *Eucalyptus cladocalyx*, essential oil, antioxidant activity, physicochemical characterization.

ملخص

يعد هذا العمل جزءًا من تطوير الموارد الطبيعية المعروفة بفضائلها العلاجية ، فنحن مهتمون بدراسة نوعين من الأوكالبتوس: الأوكالبتوس بلاكيلي وأوكالبتوس كلادوكاليكس المعروفين بغناهم بالمواد الفعالة التي يستخدمها السكان المحليين في العلاجات المختلفة. هذا العمل مكرس من ناحية لاستخراج الزيوت الأساسية ذات الخصائص الحسية والفيزيائية الكيميائية ومن ناحية أخرى لتقييم الأنشطة البيولوجية لهذه الزيوت مثل النشاط المضاد للأكسدة ومضادات الميكروبات. استخرجنا الزيوت الأساسية من الأوراق الجافة لنبتين باستخدام تقنية التقطير المائي. محصول استخلاص الأوكالبتوس blakelyiأكثر إثارة للاهتمام من الأوكالبتوس cladocalyx. وفقًا لنتائج التوصيف الحسي والفيزيائي الكيميائي للزيوت الأساسية لنوعين ، يبدو أن هذه الزيوت كانت ذات نوعية جيدة وتتوافق مع المعايير التي أقرتها AFNOR بعد ذلك ، تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر من خلال اختبار مسح الجذور الحرة DPPH ، ويبدو أن الزيوت الأساسية من الأوكالبتوس cladocalyx والأوكالبتوس blakelyi لديها إمكانات متوسطة كمضاد للأكسدة. بشكل عام ، تفتح النتائج التي تم الحصول عليها آفاقًا جديدة في مجال التطبيقات الطبيعية والتي يمكن أن تكون بديلاً صالحًا لاستبدال المواد الكيميائية.

الكلمات المفتاحية: أوكالبتوس بلاكلي ، أوكالبتوس كلادوكاليكس ، زيت اساسي ، نشاط مضاد للأكسدة ، توصيف فيزيائي كيميائي

Sommaire

Remerciements

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction…….. ……..10

Chapitre 1 : Revue bibliographique…….11

1.1. Plantes médicinales……...11

1.1.1. Généralité…….... …..11

1.1.2.L'intérêt des plantes médicinales……... 12

1.1.3. Modes d'utilisation des plantes médicinales … ……...12

1.1.3.1. Usage par voie interne ……..……...……12

1.1.3.2. Usage par voie externe ……..……12

1.2. Présentation de la famille des Myrtacées……13

1.2. Généralité…….....13

.1.2.2. Le genre Eucalyptus ……...……..13

1.2.2. 1. Historique……..……..13

1.2.2. 2. Description botanique……..……..14

1.2.2. 3. Utilisation de l'Eucalyptus……14

1.2.2.4.principaux composants chimiques du genre Eucalyptus……..14

1.2.2.5. Propriétés thérapeutiques du genre Eucalyptus……..…….15

1.3. Les huiles essentielles…….…….…….15

1.3.1. Historique……...15

1.3.2. Définition……...16

1.3. 3. Répartition et Localisation ……...……...…….……...16

1.3.3.1. Répartition…….……..16

1.3.3.2. Localisation…….……17

1.3.4. Fonction…….…..…17

1.3.5. Propriétés physico-chimiques……... 17

1.3.6. Composition chimique des huiles essentielles……..….17

1.3.7. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles……...…20

1.3.7.1. Facteurs intrinsèques…….….20

1.3.7.1. 1. Cycle végétatif……21

1.3.7.1.2. Organe producteur……21
1.3.7.1.3. Origine botanique……21
1.3.7.1.4. Chémotype génétique……...21
1.3.7.2. Facteurs extrinsèques……...…...21
1.3.8. Techniques d'extraction des huiles essentielles……22
1.3.8.1. Expression à froid ……...22
1.3.8. 2. Hydrodistillation ……23
1.3.8.3. Entrainement à la vapeur ……24
1.3.8.4xtraction assistée par microondes……..24
1.3.8.5. Extraction au CO_2 supercritique……..25
1.3.8.6. Extraction par solvants……25
1.3.9. Techniques d'analyse des huiles essentielles……25
1.3.10. Qualité des huiles essentielles……..26
1.3.11. Emploi des huiles essentielles……27
1.3. 12. Conservation des huiles essentielles ……..28
1.3.13. Toxicité des huiles essentielles……29
1.4 Activités biologiques des huiles essentielles……..30
1.4.1. Activités antimicrobiennes ……30
1.4.1.1. Activité antibactérienne……...30
1.4.1.1.1. Mécanisme d'action des huiles essentielles ……31
1.4.1.1.2. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne ……32
1.4.1.2. Activité antifongique ……...34
1.4.2. Activité antivirale……35
1.4.3. Activité anti-inflammatoire……..35
1.4.4. Activité insecticide ……..36
1.4.5. Activité antioxydant……37
1.4.5.1. Les antioxydants……38
Chapitre 2 : Matériel et méthodes……..39
2. 1. Matériel utilisé……39
2.1.1. Matériel végétal……39
2.1.2. Souches microbiennes……...41
2.2. Méthodes……..41
2.2.1. Extraction des huiles essentielles……...41
2.2.1.1. Calcul du rendement ……42

2.2.1.2. Caractérisation organoleptique des huiles essentielles…….……..42
2.2.1.3. Détermination des constantes physicochimiques des huiles essentielles et eaux aromatiques……..……42
2.2.2. Étude des activités biologiques des huiles essentielles et eaux aromatiques ……46
2.2.2. 1. Étude de l'activité antibactérienne…….46
2.2.2.2. Essai d'activité antifongique……...49
2.2.2.3. Evaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles et hydrolats……...50
Chapitre 3 : Résultats et discussion……..52
3.1. Extraction et rendement en huile essentielle…….52
3.2. Etude analytique de l'huile essentielle……..…...53
3.2.1. Caractéristiques organoleptiques……..……..53
3.2.2. Les indices physicochimiques des huiles essentielles étudiées……..…...54
3.3. Etude biologique des huiles essentielles ……..55
3.3.1. Evaluation de l'activité antioxydant……..55
Conclusion ……..57

Liste des tableaux et des figures

Tableau 3.1 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de l'*E blakelyi* et *E cladocalyx*…….53

Tableau 3.2 : Les propriétés physicochimiques de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus cladocalyx* et *E blakelyi*……..54

Figure 1.1 : Structure chimique de quelques composés terpéniques……..19

Figure 1.2 : Structure chimique de quelques composés aromatiques ……20

Figure 1.3 : montage d'hydrodistillation des huiles essentielles…….23

Figure 1.4: Mécanisme d'action des HEs sur la cellule bactérienne…….32

Figure 2.1 : Branches feuillées et inflorescences……40

Figure 2.2 : Extraction par hydrodistillation type clevenger……..41

Figure 2.3 : Méthode de Diffusion sur milieu gélosé…….47

Figure 2.4 : Forme libre et réduite du 2, 2- diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH) …….50

Figure 3.1 : Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydant d'*Eucalyptus blakelyi*…..55

Figure 3.2 : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus cladocalyx*…..*55*

Liste des abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

AFNOR : Association Française Normalisation.

GPC : Chromatographie en Phase Gazeuse.

IR : Indices de Rétention .

SM : Spectrométrie de Mass.

IRTF : Spectrométrie Infrarougepar Transformée de Fourier

CCM : Chromatographie sur Couche Minc.

CC : Chromatographie liquide sur Colonne ouverte .

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance.

CGP : Chromatographie en Phase Gazeuse Préparatoire .

ISO : Organisation Internationale de Standardisation.

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens .

FAO : Organisationdes Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

ROS : Réactives de l'Oxygène

INRF : Institut National de la Recherche Forestière

I.A : Indice d'Acide

I.S : Indices d'Ester

KOH : hydroxyde potassium.

I.S : Indice de saponification

IP :Indice de peroxyde.

IC50 : Concentration Inhibitrice Médiane

Introduction

Chaque année 31 à 42 % des pertes mondiales des cultures sont causées par les maladies et les ravageurs, et 14.1 % sont causées par les maladies seules (Agrios, 2005). La lutte contre ces ravageurs repose principalement sur l'utilisation des pesticides. Cependant, l'application excessive des pesticides de synthèse a été avertie suite à leur toxicité et à la pollution résiduelle qui en découle. De même, beaucoup de microorganismes pathogènes peuvent développer des résistances à ces fongicides. Pour cela, la lutte contre les microorganismes est orientée vers l'utilisation des méthodes biologiques.

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale: méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeables (15%) d'espèces endémiques**.** L'investigation de ces espèces représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances (Belmekki, 2009).

Les huiles essentielles sont d'intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison de leurs activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques (Hellal, 2011). Beaucoup de recherches ont été effectuées sur l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, notamment contre différentes espèces fongiques (Bouaine, 2017, Boukhalfoun et al., 2020). L'activité des huiles volatiles réside dans les centaines de molécules chimiques qui les constituent, comme les terpénoides (Hellal, 2011).

C'est dans le cadre d'une valorisation des matières végétales en vue des utilisations thérapeutiques que l'étude de deux espèces d'Eucalyptus : *Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* est présentée ici.

Une large variété de produits naturels caractérise ces espèces, les plus rencontrés sont les flavonoides, tanins et huiles essentielles. Ces deux espèces sont connues par leurs utilisations en médecine traditionnelle à cause de leurs diverses activités comme: antibactérienne, antifongique et antioxydante (Boukhalfoun et al., 2020).

Le présent travail consiste à effectuer:

- L'extraction des huiles essentielles et des eaux aromatiques des deux plantes ainsi qu'une caractérisation organoleptique et physicochimique de ces huiles
- Evaluation des activités biologiques telles que antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles.

Chapitre 1

Revue bibliographique

1.1. Les plantes médicinales

1. 1.1. Généralités

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine. On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (Schauenberg et Paris, 2006).

Les plantes aromatiques et médicinales ont des propriétés importantes, plusieurs médicaments pharmaceutiques ont été dérivés de plantes, ces derniers passent dans l'esprit de la population pour efficacité et tolérance du fait de son origine naturelle faisant partie de la médecine douce (Hami et al., 2011). Ces plantes naturelles ont joué un rôle très significatif dans la découverte des médicaments (Newman et Cragg, 2007). Il est reporté qu'au minimum 119 composés dérivés de 90 espèces de plantes peuvent être considérés comme des médicaments importants. La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicaux synthétiques et biologiques plus efficaces n'ont pas réduit l'importance de l'utilisation des plantes médicinales. Au contraire, la croissance démographique dans le monde en développement et l'intérêt croissant manifesté au niveau des nations industrialisées ont considérablement augmenté la demande spécifique aux plantes aromatiques et médicinales et à leurs produits dérivés (Benayad, 2013).

L'Algérie est considérée comme un pays riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes (Quézel et Santa, 1962). Ces plantes aromatiques sont à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines…) qui se présentent presque souvent comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation**.**

Les plantes ont de tout temps été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur thérapeutiques. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. Ces

métabolites interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes. On distingue plusieurs groupes de métabolites notamment les phénols (phénols simples, acides phénoliques, quinones, flavonoïdes, tannins et les coumarines), les alcaloïdes, les terpénoïdes et polypeptides. (Cowan, 1999).

1.1.2. Intérêt des plantes médicinales

La plante est un organisme vivant, soumis aux variations de son environnement. Son évolution au cours des millénaires s'est traduite par des différenciations à la fois externes et internes, c'est-ta-dire morphologiques et biochimiques.

Les différenciations morphologiques ont été à la l'origine de la naissance de la classification botanique ou systématiques, prenant aussi en compte de certains critères anatomiques.

Les différenciations biochimiques ont engendré, mutations successives, des différences importantes dans les vois de biosynthèse, et dans l'accumulation de secondaires inédits, ce qui fait d'ailleurs tout l'intérêt et l'usage des plantes thérapeutiques (Robert, 2003).

1.1.3. Modes d'utilisation des plantes médicinales

Les divers modes de préparation à base de plantes sont susceptibles d'être utilisés de différentes façons.

La médecine végétale, et ses nombreuses applications thérapeutiques possibles, pratique deux usages distincts :

1.1.3.1. Usage par voie interne

Il est un moyen d'action thérapeutique consistant uniquement en l'ingestion par voie buccale de tisanes généralement préparées sous forme d'infusion ou de décoction, de même que tout autre produit d'origine végétale présente sous forme extractive.

On recourt plus accessoirement à la poudre, aux sucs et à la cendre des végétaux (Chamouleau, 1979).

1.1.3.2. Usage par voie externe

Consiste essentiellement à recourir à diverses formes d'application locales ainsi qu'aux bains partiels et généraux; en vue d'agir thérapeutiquement sur des régions distinctes du corps (Chamouleau, 1979).

1.2. Présentation de la famille des Myrtacées

1.2.1. Généralités

La famille des Myrtacées est une famille de plantes dicotylédones qui sont réparties en 134 genres et 3000 espèces. Ce sont des arbustes et des arbres, souvent producteurs d'huiles essentielles des zones tempérées, sub tropicales à tropicales, poussant principalement en Ausralie, en Amérique tropicale, région méditerranéenne, tropicales et tempérées d'Asie et les îles du Pacifique. Les Myrtaceae constituent un modèle de choix pour l'étude de l'évolution chez les Angiospermes, puisque les genres sont caractérisés par un nombre important en espèces. Nous citons quelques exemples, le genre Syzygium contient entre 1200 et 1500 espèces (Biffin et Lucas, 2010), Eugenia inclue approximativement 1050 espèces, et Eucalyptus environ 700 espèces. On rencontre également des espèces dont les fruits sont comestibles. Beaucoup d'espèces de cette famille sont une source d'huiles essentielles pour l'usage thérapeutique ou pour la parfumerie (Bruneton, 1999).

Les fleurs des Myrtacées sont pollinisées par divers insectes, oiseaux ou mammifères, chez le genre Eucalyptus, et Callistemon, les étamines sont plus remarquables que les pétales, donnant ainsi à l'inflorescence un aspect de goupillon, les espèces à fruits capsulaires ont de petites graines parfois ailées qui sont disséminées par le vent ou par l'eau (Bruneton, 1999).

1.2.2. Le genre Eucalyptus

1.2.2. 1. Historique

Le genre Eucalyptus est originaire de Tasmanie en Australie. Il fait partie de la famille des Myrtacées, son nom a pour origine les mots grecs: eu «bien» et kaluptos «couvert». Il fut décrit et baptisé en 1788 par le botaniste français L'Heritier, après qu'il eut examiné des échantillons d'*Eucalyptus obliqua*, parmi les plantes Australiennes récoltées par Nelson, dix neuf espèces d'*Eucalyptus* avaient été nommées en 1800 et 28 en 1820. En 1840, 71 espèces d' *Eucalyptus* avaient reçu des noms et 149 en 1890. Depuis lors, des savants botanistes se sont succédés dans la description des espèces d'*Eucalyptus* et W.F Blakely, assistant de Maiden, décrivait 500 espèces dont 138 variétés en 1938 (Bigendako, 2004).

L'Eucalyptus fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen, Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, l'*Eucalyptus* assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux

de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom « d'arbre à la fièvre » ou Australien fever tree.

1.2.2. 2. Description botanique

La plupart des Eucalyptus ont des feuilles persistantes. Comme les autres membres de la famille des myrtaceae, les feuilles d'Eucalyptus sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre.

Les feuilles bleutées ont une curieuse caractéristique : sur les jeunes arbres, elles sont opposées, sessiles, ovales et glauque et quand l'arbre grandit, elles deviennent alternes, pétiolées, très allongées, parfois un peu courbées comme des lames de faux, et d'un vert luisant.

Les fleurs sont très variées. Elles ont de très nombreuses étamines qui peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, rose ou rouge.

Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol **(**Bruneton, 1999).

1.2.2. 3. Utilisation de l'Eucalyptus

L'Eucalyptus est l'une des espèces les plus largement cultivées, bien connue pour sa production d'HE avec une forte activité biologique utilisée dans différents domaines.

Des extraits de feuilles d'Eucalyptus ont été approuvés comme additifs alimentaires. Ainsi les extraits méthanolique et aqueux d'*Eucalyptus blakelyi* possèdent des propriétés antioxydantes puissantes dans la neutralisation des radicaux libres DPPH (Boukhalfoun et al., 2020). Les extraits sont également utilisés dans des formulations cosmétiques. L'huile riche en cinéole, est une substance active pour des savons (Herzi, 2013).

1.2.2. 4. Principaux Composants chimiques du genre Eucalyptus

Les principaux composés chimiques de ce genre sont :

1- Huile essentielle (Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole; monoterpènes : alpha-pinène, limonène, gamma-terpinène, paracymène ; Sesquiterpènes : aromadendrène ; Sesquiterpénols : globulol, lédol)

2- Flavonoïdes (des hétérosides de flavones avec les aglycones suivants : quercétine, myricétine, kaempférol et rutine).

3- Tanins.

1.2.2.4. Propriétés thérapeutiques du genre Eucalyptus

De nombreux pays ont intégré les usages médicinaux des feuilles d'Eucalyptus dans leur pharmacopée : Chine, Inde, Sri Lanka, Afrique du sud, Île de la Réunion, Europe, etc.

La production commerciale d'huile essentielle d'Eucalyptus a débuté en 1860, dans la région de Victoria en Australie. Actuellement, l'Australie, le Maroc, l'Espagne sont les principaux producteurs.

Au XIXe siècle, on utilisait l'HE pour aseptiser les cathéters urinaux dans les hôpitaux anglais. De nos jours, elle entre dans la fabrication de rince-bouche (Listerine, par exemple) et de dentifrices ; les produits et les solvants endodontiques utilisés en dentisterie comprenant de l'huile de plusieurs plantes entre autre l'huile de clou de girofle et d'*Eucalyptus* **(**Goldestein et Epstein, 2000**).**

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles d'Eucalyptus, de l'HE (*E. globulus*) pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme, pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses la bouche (voie interne) ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (voie externe).

L'huile essentielle d'Eucalyptus citronné (*E citriodora*) est un remède traditionnel pour éloigner les insectes piqueurs (Tesche, Metternich, 2008).

La fumée d'*Eucalyptus camaldulensis* est également employée dans les lieux de stockage des denrées comme agent de Conservation contre les insectes et les champignons. L'efficacité de cette pratique serait due à la richesse de la fumée en thymol et en cinéole (Kamal et al., 1997). **1.3. Les huiles essentielles**

1.3.1. Historique

La nomination 'huile essentielle' dérive du terme '*huile quintessentielle'*. Ceci provient de l'idée aristotélicienne que la matière se compose de quatre éléments, à savoir : l'air, la terre, le feu, et l'eau. Le cinquième élément, ou la *quintessence*, a été alors considéré comme l'esprit ou la force de la vie (Baser et Gerhard, 2010).

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis des millénaires en Chine (cannelle, anis, gingembre,...), en Inde, au Moyen Orient (Khella, pin, fenouil,…) en Egypte, en Grèce, en Amérique (bois de Hô, sassafras,…) et en Afrique (encens, myrthe, ravintsara,…), les HE tombent dans l'oubli au Moyen Age. Il faudra

attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouvent alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque. L'extraction des HE par distillation à la vapeur d'eau naît à l'époque de la révolution industrielle et permet le développement de produits alimentaires et de parfums. Les pionniers de l'aromathérapie sont Gattefossé puis Valnet et ses disciples (Franchomme et al., 2001).

1.3.2. Définition

De très nombreux auteurs ont tenté de donner une définition des huiles essentielles. L'association Française de Normalisation (AFNOR, 2000**)** définit les huiles essentielles comme étant « des produits obtenus à partir de matières naturelles végétales soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle ainsi obtenue est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

A ce jour, 3000 huiles essentielles sont connues, seulement 300 d'entre elles sont commercialisées (Burt, 2004).

Les huiles essentielles sont définies aussi comme étant des liquides concentrés, très complexes et hydrophobes. Ce sont des extraits volatils et odorants qu'on obtient par extraction mécanique, distillation à la vapeur d'eau ou distillation à sec de plantes aromatiques (fleur, feuille, bois, racine, écorce ou fruit). Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et donnent naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie (Möller, 2008).

1.3. 3. Répartition et Localisation

1.3.3.1. Répartition

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les huiles essentielles sont réparties dans une cinquantaine de familles dont beaucoup sont des Lamiaceae, des Myrtaceae, des Rutaceae, des Asteraceae, mais aussi des Apiaceae. Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux: sommités fleuries des Lamiacées (Lavande vraie, Sauge officinale), graines (Ambrette), racines (Vétiver), rhizome (Gingembre), fruits (Anis, Fenouil), bois (Santal), feuille (Eucalyptus), oléorésines (Myrrhe).

1.3.3.2. Localisation

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques, spécialisées selon trois principales catégories d'appareils sécréteurs: les poils glandulaires épidermiques, les poches et les canaux glandulaires schizogènes.

Les poches sécrétrices schizogènes sont vues par transparence sous forme de points réfringents, caractéristiques de la famille des Myrtaceae (Melaleuca, Myrtus, Eugenia, etc.), des Myoporaceae, des Rutaceae, et des Hypericaceae.

Les canaux sécréteurs sont caractéristiques des familles suivantes: Hypericaceae, Dipterocarpaceae, Burseraceae, Anacardiaceae, Rutaceae, Asteraceae, etc. (Franchomme, 1990)

1.3.4. Fonction

La fonction biologique des terpénoides des huiles essentielles est écologique et constitue une réponse à ses stress biotiques et abiotiques. Ces métabolites secondaires jouent un rôle fondamental de protection et de défense antimicrobien des plantes. (Tajkarimi, 2010). Ils participent dans les interactions entre la plante et son environnement, aussi bien dans le domaine des interactions végétales (inhibiteurs de la germination), que dans celui des interactions végétal-animal: protection contre les prédateurs, insectes, champignons et attraction des pollinisateurs. (Pichersky et Gershenzon , 2002).

1.3.5. Propriétés physico-chimiques

La plupart des huiles essentielles ont une densité inférieure à celle de l'eau (densité<1). Cela permet leur séparation dans l'essencier lors de leur extraction par hydro-distillation. Cependant certaines ont une densité supérieure à celle de l'eau telle que l'huile essentielle de girofle, de cannelle, de carotte et de sassafras (Baudoux et Zhiri, 2009).

En effet, elles sont généralement sous forme liquide à température ambiante, très volatile, insolubles dans l'eau mais solubles dans les alcools et la plupart des solvants organiques jusqu'à un certain pourcentage bien défini.

1.3.6. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être classées en plusieurs familles biochimiques. L'activité thérapeutique d'une huile essentielle est liée à sa structure biochimique, aux groupes fonctionnels de ses composés principaux (alcools, phénols, composés

terpéniques…)
et à leurs actions synergiques (Mayer, 2012).

L'HE contient un nombre de molécules différentes dont la plupart sont poly-moléculaires, composées d'un grand nombre de composants (jusqu'à 500 molécules différentes dans l'HE de rose). A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), il existe des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces. Généralement, on classe ces composés en deux groupes : les hydrocarbures terpéniques et les composés oxygénés (Marrouf, 2009). La structure des composés des HEs est constituée d'un squelette hydrocarboné constituant une chaîne plus ou moins longue.

La composition chimique d'une huile essentielle est assez complexe. On y trouve généralement de nombreux constituants. Ceux-ci appartiennent principalement à deux grands types chimiques :

- Les composés terpéniques
- Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane (Paris et Hurabielle, 1980 ; Bruneton, 1999).

-Les composés terpéniques

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par l'agglomération de plusieurs isoprènes (Dans les PAM on trouve souvent une famille d'arôme constituée d'une grande partie de ces terpènes).

Les terpènes peuvent être classés selon leur nombre de motifs isoprènes ainsi que leurs arrangements.

Les constituants les plus simples de la série des terpènes sont les monoterpènes qui comportent deux unités isoprènes (C_5H_8) dont les principaux se trouvent dans l'HE (90%) (Bruneton, 1999). Ils peuvent être bicycliques, monocycliques ou acycliques (Figure 1.1). Les dérivés hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ qui comportent trois unités isoprènes sont appelés les sesquiterpènes. Ils se trouvent sous deux formes, hydrocarbures et oxygénés tels que les aldéhydes et les acides présents dans la nature. Ainsi ces composés constituent la classe la plus diversifiée des terpènes et ils se trouvent dans de nombreuses catégories structurelles, polycycliques, tricycliques, bicycliques, monocycliques, acycliques (Bruneton, 1999).

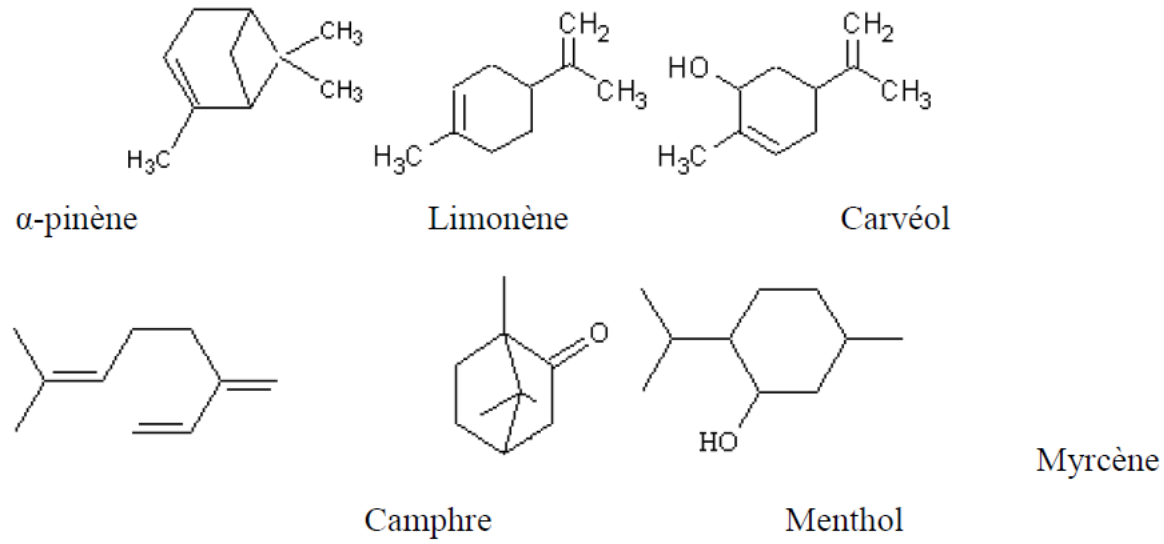


Figure 1.1 : Structure chimique de quelques composés terpéniques.

-Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés parmi les produits du métabolisme secondaire des PAM. Ils correspondent à un vaste ensemble de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique (Figure 1.2) portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ces composés, d'intérêt biologique, sont principalement présents dans les végétaux (fruits, légumes, céréales…) et dans les produits qui en dérivent (thé, jus de fruits, vin, bière, …).

Une des particularités des composés phénoliques réside dans leur importante diversité. En effet, on trouve aujourd'hui plus de 8000 composés phénoliques, dont 5000 sont des flavonoïdes (Bravo, 1998).

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet d'une littérature abondante. En effet, leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine seraient nombreuses : effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires, effets anti-inflammatoires, ou encore antiviraux pour n'en citer que quelques-uns. Par ailleurs ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leurs propriétés antioxydantes (Tapiero, 2002).

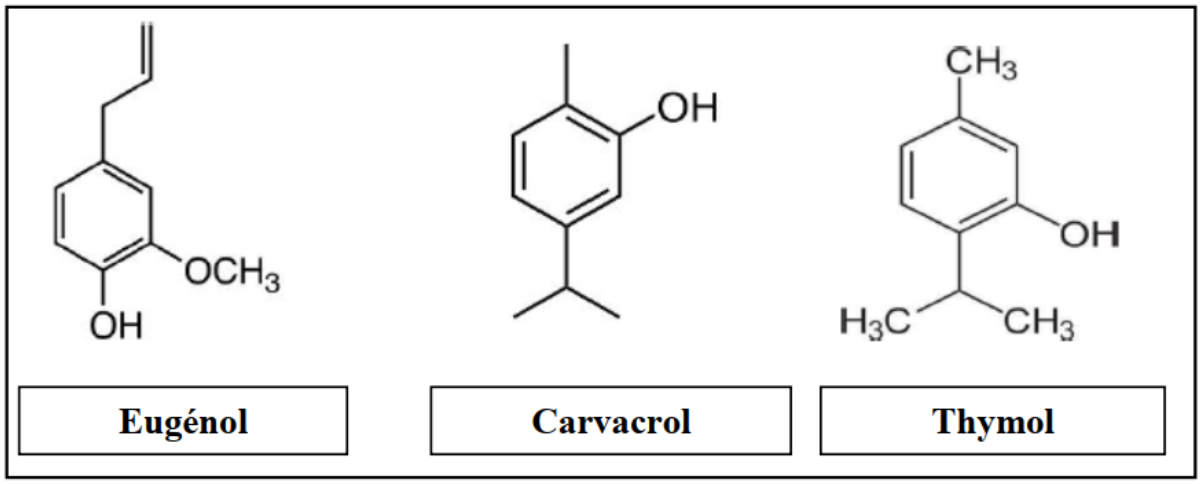


Figure 1.2 : Structure chimique de quelques composés aromatiques des huiles essentielles (Mayer, 2012)

-Composés aromatiques dérivés du phenylpropane :

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques plus particulièrement des composés « phenyl propanoides ».

Leur biogenèse conduit à l'acide prephenique précurseur de phénylalanine, de la tyrosine et d'autres composés en C6-C3, à partir de l'acide shiquimique. Ainsi Sont obtenus divers composés naturels ; certains possèdent dans leur chaine latérale une liaison éthylénique : exemple dérivés de l'acide et de l'aldéhyde cinnamiques ; d'autres sont porteurs de groupements OH ou OCH_3 sur le cycle aromatique, d'autres à structure en C_6-C_1 (Paris et Hurabielle, 1980 ; Guignard, 2000).

1.3.7. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très

grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories (Laib, 2012).

1.3.7.1. Facteurs intrinsèques

Les facteurs intrinsèques sont liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée.

1.3.7.1. 1. Cycle végétatif

Pour une espèce donnée la proportion des différents éléments constitutifs de l'huile essentielle peut varier de façon importante tout au long du développement (Moderres et Aichouni, 2018**).** L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants (Bouziaine, et al., 2016**).** Le stade végétatif au moment de la récolte est un facteur déterminant pour le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes de *Lavandula* (Chemloul, 2014).

1.3.7.1.2. Organe producteur

Tous les organes de mêmes espèces peuvent renfermer une huile essentielle, dont la composition peut varier selon sa localisation (Moderres et Aichouni, 2018). Le potentiel et la composition de l'huile essentielle dépend de l'organe. Par exemple les parties fleuries de la sauge ont une huile essentielle plus riche en certains terpènes que les feuilles (Bouziaine et Djebour, 2016).

1.3.7.1.3. Origine botanique

Toutes les plantes ne sont pas aromatiques et même quand elles le sont, les constituants sont variables tant dans leur nature que dans leur proportions (Moderres et Aichouni, 2018). La composition d'une H.E varie en fonction de l'espèce productrice. En effet, l'extraction de l'H.E d'un même organe de deux plantes différentes ne donne pas la même composition chimique (Bouaine, 2017).

1.3.7.1.4. Chémotype génétique

Le premier paramètre influençant la composition chimique d'une plante est son profil génétique. C'est la raison pour laquelle, une même espèce peut présenter plusieurs chémotypes de profils chimiques différents : polymorphisme chimique (Bouziaine et Djebour, 2016). Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'huile essentielle (Moderres et Aichouni, 2018).

1.3.7.2. Facteurs extrinsèques

Ce sont des facteurs environnementaux (température, nature du sol, ensoleillement …) et les pratiques culturales qui ont une influence certaine**.** (Moderres et Aichouni, 2018).

Les conditions environnementales influencent la composition des huiles essentielles (Moderres et Aichouni, 2018). Les mêmes auteurs rapportent que la formation

des principes actifs se fait spécialement pendant la période de croissance et durant les temps de métabolismes intensifs comme les périodes de floraison et de fructification. Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en huile essentielle.

La durée d'ensoleillement, représente une cause potentielle de variations de la composition chimique d'un plant aromatique donné (Moderres et Aichouni, 2018). Les facteurs écologiques prépondérants sont le climat et le sol. Chez *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées

favorisent celle du menthofuranne**.** Les *Citrus* sp ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée**.** Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* sont plus riches en huile essentielle sous l'effet de fertilisants (Bouziaine et Djebour, 2016). La pluviométrie influe également sur les variations de la composition chimique d'une plante aromatique donné (Moderres et Aichouni, 2018).

En plus de tous les facteurs cités ci-dessus, le stockage des matières premières avant distillation peut influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. Laib (2012) rapporte que, des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé au congélateur ont été notées, mais peu d'évolution de la composition.

1.3.8. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, …), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les H.Es, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (Hellal, 2011).

1.3.8.1. Expression à froid

L'expression à froid est une extraction sans chauffage réservée aux agrumes. Le principe de ce procédé mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau.

Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation (Kimball, 1999; Ferhat, 2007).

1.3.8. 2. Hydro distillation

L'hydrodistillation constitue le procédé d'extraction ou de séparation de certaines substances

organiques le plus anciens, apportés par les Arabes au IXème siècle. Cette opération s'accomplit traditionnellement dans un alambic (Bruneton, 1993). L'hydrodistillation est la technique de référence dans l'étude des composés volatiles d'une plante dans le domaine de la recherche. Le phénomène physique est identique à celui décrit précédemment. Cependant une verrerie adaptée a été mis en place permettant à la fois la circulation en circuit quasi-fermé de l'eau sous forme aqueuse et gazeuse et la cohobation de l'huile essentielle. Ces phénomènes ont étés rendus possibles à l'échelle du laboratoire grâce à l'utilisation d'un appareillage de type Clévenger.

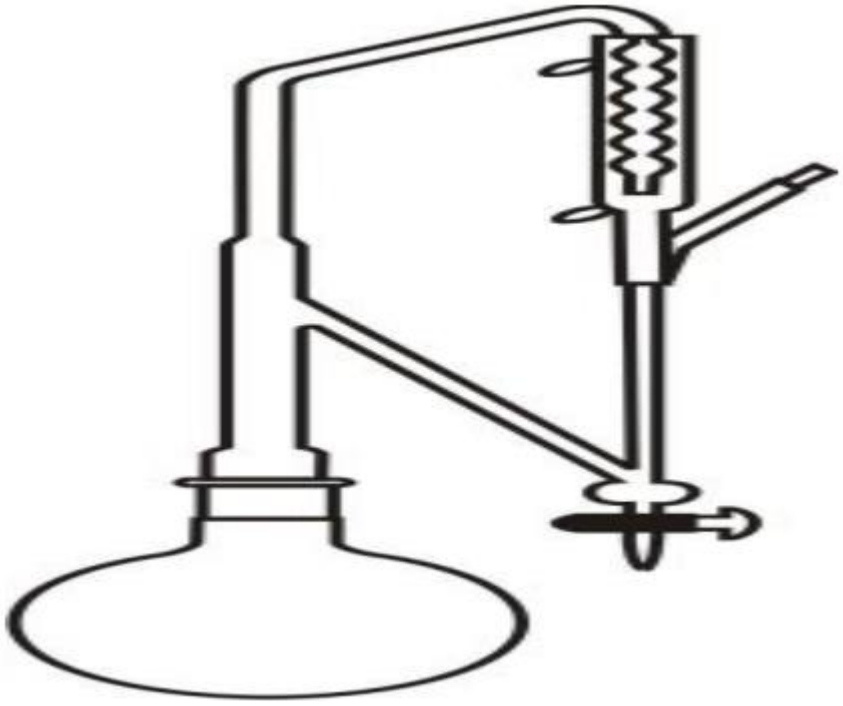


Figure 1.3 : montage d'hydrodistillation (Clévenger, 1928).

Lors de la distillation des huiles essentielles, des phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production.

Les expérimentations (Koedam, 1987 et Denny, 1988) conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées.

Cette différence est fortement liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des essences qui peuvent être superficielles ou internes. De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'hydrodistillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée.

Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule qui constituent les seules barrières à la libération de l'huile essentielle, est vite rompue à ébullition, les composés volatils sont aussitôt évaporés. Lorsque les essences sont sous cutanées, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur. Elles sont alors évaporées comme dans le cas des secrétions superficielles (Koedam, 1982).

En ce qui concerne la localisation des sites producteurs d'essence, les molécules odorantes sont rencontrées dans tous types d'organes : racine, tige, bois, écorce, feuille, fleur, fruit, etc… Elles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables (Paupardin et al., 1990).

1.3.8.3. Entrainement à la vapeur

Dans cette technique une source externe de vapeur d'eau est utilisée. La vapeur d'eau passe à travers du matériel végétal au niveau de l'unité d'extraction et sort par le condenseur. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle» (Meyer-Warnod, 1984). Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en deux phases bien distinctes: l'huile essentielle et l'eau aromatique (hydrolat). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire la qualité de l'huile (Lucchesi, 2005)

1.3.8.4. Extraction assistée par microondes

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par microondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie (température plus basse) considérable (Bey-Ould-Si-Said, 2014).

1.3.8.5. Extraction au CO_2 supercritique

L'extraction de fluide supercritique est un processus consistant à séparer une composante de l'autre en utilisant les fluides supercritiques au lieu d'un solvant d'extraction. Cette méthode est utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, dont 90% l'extraction est exécutée avec le dioxyde de carbone. Outre une pression critique relativement faible, une température de 32°C, le CO_2 est relativement non toxique, ininflammable, sans danger et s'élimine facilement de l'huile (Rozzi et al., 2002). Cette méthode d'extraction un meilleur rendement, un coefficient de diffusion plus élevé et une plus faible viscosité. L'huile supercritique s'est avérée pour être de qualité supérieure avec les meilleurs résultats d'activité (Capuzzo et al., 2013).

1.3.8.6. Extraction par solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très couteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité, de ce fait de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (Shellie et al., 2004).

1.3.9. Techniques d'analyse des huiles essentielles

Quel que soit le secteur concerné, l'analyse des HE reste une étape importante qui malgré les développements constants des méthodes de séparation et d'identification, demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques. L'analyse des HE comporte généralement plusieurs séquences (Joulain, 1994) :

- Une première séquence consiste à analyser les HE, tout d'abord par Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition (Arpino et al., 1995) et cette méthode permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (IR), puis à les analyser par le couplage de la CPG, avec une technique

d'identification spectrale, généralement la spectrométrie de masse (SM) ou quelques fois, la Spectrométrie Infrarouge par Transformée de Fourier (IRTF). L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention IR et des données spectrales (spectres de masse ou infrarouge) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres (Lafferty et Stauffer, 1994 **;** NIST**,** 1999 ; König et al., 2001 **;** Adams, 2007). La SM utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge m/z (De Hoffmann et al., 1996). Dans le secteur particulier des HE, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (Constantin, 1996).

- Une deuxième séquence est mise en œuvre lorsque l'HE est complexe ou encore lorsque l'analyse est réalisée dans une optique de recherche. Un fractionnement de l'huile est alors effectué, le plus souvent par chromatographie liquide sur colonne ouverte de silice ou d'alumine. Les fractions obtenues sont ensuite analysées de la façon décrite dans la première séquence. Cette étape est à privilégier lorsque l'on veut étudier les différentes familles de composés (esters, alcools, cétones,…).

- Enfin, une troisième séquence peut être mise en œuvre lorsqu'un ou plusieurs constituants de l'HE sont inconnus des bibliothèques de comparaison et qu'ils ne sont pas décrits dans la littérature. Il est alors nécessaire de les purifier par distillation fractionnée ou par des techniques chromatographiques préparatoires telles la Chromatographie sur Couche Mince (CCM), la Chromatographie liquide sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) ou encore la Chromatographie en Phase Gazeuse Préparatoire (CGP).

- Une nouvelle voie d'analyse est le recours à la RMN-13C (Tomi et al., 1993 et 1995 ; Bradesi et al., 1996) qui permet d'identifier les constituants d'un mélange complexe sans individualisation et sans séparation préalable. Cependant, si l'huile est jugée trop complexe, si les abondances des constituants sont trop faibles, il faudra procéder au préalable au fractionnement du mélange pour faciliter l'identification des constituants.

1.3.10. Qualité des huiles essentielles

La qualité de l'HE est mesurée par sa conformité à des normes qui peuvent varier selon l'utilisation de l'huile essentielle, par exemple : les normes '' AFNOR'' (Association Française pour la Normalisation) et ISO (Organisation Internationale de Standardisation) sont

les barèmes utilisés pour juger la qualité des huiles essentielles dans les secteurs des parfums.

- En phytothérapie, leur qualité peut être assurée par la présence d'une certaine quantité de substances des parfums.

- En pratique, la qualité des huiles essentielles est évaluée de deux façons : premièrement par des analyses chimiques et physico-chimiques et deuxièmement par les propriétés organoleptique de l'huile essentielle.

La première est effectuée par des laboratoires spécialisés et la deuxième par un panel de personnes expérimentées ou encore par un nez artificiel (Svoboda et Hampson, 1999).

1.3.11. Emploi des huiles essentielles

- En pharmacologie et thérapeutique

Les HEs utilisées en thérapeutique doivent posséder de nombreux critères de qualité (Franchomme et al., 2001 ; Baudoux et Zhiri, 2009) dont la certification botanique de l'espèce, l'organe producteur, l'origine géographique et le mode de culture. En Europe, les seuls labels autorisés sont ceux délivrés par les Ministères de l'Agriculture. Il en existe plusieurs tels que, le label BIO**,** label ECOCERT, le label HEBBD (HE Botaniquement et Biochimiquement Définie) et le label AB (Agriculture Biologique) (Baudoux et Zhiri, 2009).

Les HEs à usage pharmaceutique doivent être conformes aux normes des monographies de la pharmacopée européenne quand elles existent ou de la pharmacopée française ou d'un autre pays européen (Duval, 2012). Les HE possèdent de nombreuses propriétés (Valnet, 2003 ; Mayer, 2012), notamment :

- anti-infectieuses : antivirales, antifongiques, antiparasitaires, antiseptiques et insecticides également
- anti-inflammatoires
- régulatrices du système nerveux : antispasmodiques, calmantes, analgésiques et antalgiques
- drainantes respiratoires : expectorantes et fluidifiantes
- digestives
- cicatrisantes

-En parfumerie

C'est le débouché principal des huiles essentielles de concrètes, des absolues et autres résinoïdes. La cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût souvent élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier pour les formulations des grandes diffusions les produits synthétiques.

A la limite de ces secteurs, on notera la présence d'huile essentielle dans les préparations pour bains «calmants » ou «relaxants ».

-Dans diverses industries

Surtout chimiques qui utilisent les isolats (isomères des substances pures isolées des huiles essentielles, exemple : citronellal, linalol, comme matières premières pour la synthèse des principes actifs médicamenteux, de vitamines, de substances odorantes (Bruneton, 1995).

-Dans le domaine agroalimentaire

L'huile essentielle du citron sert à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries **(**Iserin et al., 1996 **;** Robert et Lobstein, 2005).

C'est en gastronomie que se fait le plus large emploi des plantes à essences sous forme d'épices. Celles-ci sont réparties en épices aromatiques (arômes amers et acres) comme dans le cas du faux poivrier, ou simplement en épice pour les desserts et pâtisseries (Bruneton, 1999). Les huiles essentielles peuvent également être ajoutées dans les produits alimentaires destinés à la conservation (produits de la quatrième gamme). Elles s'ajoutent sur les produits de consommation dans le but d'aromatisation (quelques gouttes déposées sur les morceaux du sucre) (Pingot, 1998).

1.3. 12. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines conditions, jusque cinq ans. Seules les essences de Citrus se gardent un peu moins longtemps (trois ans).

Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons.

Il est préférable de les conserver dans un flacon en aluminium ou en verre teinté (brun, vert, ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusque vingt degrés.

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HE (norme NF 75-002, 1996).

1.3.13. Toxicité des huiles essentielles

L'utilisation des huiles essentielles du citron extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (Robert et Lobstein, 2005). Les huiles essentielles contenant des phénols, tels que le thym, la cannelle et le clou de girofle, devraient être employées avec prudence. La toxicité du foie peut se produire si les huiles essentielles sont utilisées à de fortes doses pendant un temps prolongé. Les cétones contenues dans l'armoise, la sauge et les huiles d'hysope peuvent ainsi causer ce genre de problème (Couderc, 2001). De plus, certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques (Meynadier et al., 1997), c'est en particulier le cas des huiles essentielles suivantes: la cannelle de Ceylan, la menthe, la Listée, la mélisse, le pin, ou la mousse de chêne. Les réactions de la maladie sont variées et peuvent apparaître jusqu'à 3 jours après le contact du produit avec la peau. Ils vont du simple prurit (démangeaison) à l'eczéma allergique en passant par des plaques, un aspect psoriasique, voire des pigmentations ou dépigmentations locales. La proportion de la population développant des allergies cutanées dues aux parfums est en augmentation car l'utilisation de parfums et de produits parfumés (cosmétiques, désinfectants parfumés, lessives, bâtons d'encens) ne cesse d'augmenter. Il a été démontré que les allergènes présents dans l'air jouent un rôle évident dans la formation d'eczéma de contact, soit par inhalation, soit par contact cutané .Les huiles essentielles qui sont utilisées en parfumerie peuvent irriter les muqueuses respiratoires et favoriser le déclenchement de crises d'asthmes pour les asthmatiques (comme par exemple les sprays désodorisants). Il a été rapporté qu'en présence de parfums, les personnes asthmatiques développant des allergies de contact montrent des détresses respiratoires plus fréquentes que les personnes saines. Cependant, les mécanismes immunologiques n'ont pas été démontrés (Elberling et Skov, 2007). Une ingestion accidentelle d'huile essentielle peut, selon la sorte et la quantité, générer une intoxication grave comme le coma et même la mort. Les huiles essentielles très liquides peuvent parvenir dans les voies respiratoires si elles sont malencontreusement avalées ou vomis. Cela peut conduire à une inflammation des poumons (pneumonie). Certaines huiles essentielles comme le citron, l'orange amère et la bergamote deviennent sensibilisantes et toxiques seulement sous l'influence de la lumière. La toxicité des huiles

essentielles peut aussi provenir des contaminants (si l'huile essentielle est impure) et/ou des produits de dégradation de celles-ci car elles se modifient à l'air, à la chaleur et à la lumière. En effet la combustion de bâtons d'encens et de bougies parfumées ou seulement l'évaporation à chaud d'huile essentielle peut libérer des substances de combustion, des poussières fines, du formaldéhyde et d'autres substances volatiles qui peuvent solliciter les voies respiratoires (Willem, 2006).

1.4. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Bouaine, 2017).

1.4.1. Activités antimicrobiennes

1.4.1.1. Activité antibactérienne

L'utilisation des antibiotiques pour lutter contre des micro-organismes pathogènes est limitée en raison de leurs effets cancérogènes, leur toxicité aiguë et leur danger potentiel pour l'environnement en plus du problème de résistance bactérienne à cette classe thérapeutique. Plus récemment, la prévalence de la résistance aux antimicrobiens a incité les chercheurs à rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes pour inhiber les diverses bactéries pathogènes humaines (Rudramurthy et al., 2016). À cet égard, l'exploitation des huiles essentielles pour contrôler l'épidémie des bactéries pathogènes peut être utile pour lutter contre diverses maladies infectieuses (Mulyaningsih et al., 2010). L'impact antimicrobien des huiles essentielles et de leurs composants chimiques est démontré par plusieurs études (Duschatzky et al., 2005 ; Lang and Buchbauer, 2012 ; Akhtar *et al*., 2016, Boukhalfoun et al., 2020). L'action des huiles essentielles s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positives et les bactéries à Gram négatives. La structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positives les rend toutefois plus sensibles à l'action des huiles essentielles (Raut et Karuppayil, 2014). La structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives les rend moins sensibles à l'action des huiles essentielles. La présence d'une membrane plasmique hydrophile externe chez les Gram négatives empêche la pénétration intracellulaire des molécules hydrophobes composant la majorité des huiles essentielles. Cette caractéristique confère aux bactéries

négatives une résistance à l'huile et même aux antibiotiques (Lewis et Ausubel, 2006). La composition chimique des extraits de plantes peut être influencée par de multiples facteurs, incluant l'espèce à laquelle appartient la plante prélevée, le matériel végétal (feuilles, fleurs, rameaux, fruits) utilisé pour produire les extraits, ainsi que le procédé employé pour réaliser l'extraction. La combinaison de ces divers paramètres semble être une explication aux différences d'activité antibactérienne observées entre les huiles essentielles (Burt et al., 2004). Les constituants chimiques de l'huile essentielle ont une propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne (Keita, 2002). Les molécules oxygénées qui entrent dans la composition des huiles essentielles sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées, connues pour leurs faibles propriétés antibactériennes. L'activité antibactérienne de ces molécules dépend à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Parmi les composés de l'huile essentielle les phénols sont du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, décrits comme les composés les plus actifs. Les composés carbonylés, avec des groupements aldéhydiques ou cétoniques, et les alcools sont également reconnus pour leurs propriétés antibactériennes (Kalemba et Kunicka, 2003).

1.4.1.1.1. Mécanisme d'action des huiles essentielles

Dans un premier temps, les HEs qui se propagent dans la paroi cellulaire d'une bactérie augmentent la perméabilité de la membrane, ce qui entraîne une perte subséquente de composants cellulaires. Ensuite, une acidification à l'intérieur de la cellule bloque la production d'énergie cellulaire (ATP) en raison de la perte d'ions, de l'effondrement des pompes à protons et de la réduction du potentiel membranaire (Figure 1.4). En dernier point, la destruction du matériel génétique qui entraîne la mort des bactéries. En outre, certaines études ont rapporté que les HEs peuvent également coaguler le cytoplasme et endommager les lipides, les protéines, les parois cellulaires et les membranes, ce qui peut conduire à la fuite des macromolécules et à la lyse cellulaire (Burt, 2004 ; Li et al., 2014).

L'efficacité des différentes huiles essentielles est moins évidente que la sensibilité variée des microorganismes aux extraits de plantes. Cette variabilité peut s'expliquer principalement par différents facteurs environnementaux, la croissance des plantes, les sources géographiques, les saisons de récolte, génotypes, climats, procédures de séchage, organes végétaux étudiés, méthodes d'extraction et d'analyse.

Tous les paramètres susmentionnés affectent la composition chimique et la concentration relative de chaque composant actif dans les huiles essentielles, qui jouent un rôle important dans leurs activités antimicrobiennes. En outre, l'interaction synergique et antagoniste entre les composants chimiques des HEs doit également être prise en compte du fait que des composants mineurs peuvent avoir une influence significative sur les activités antimicrobiennes des huiles essentielles (Li et al., 2014).

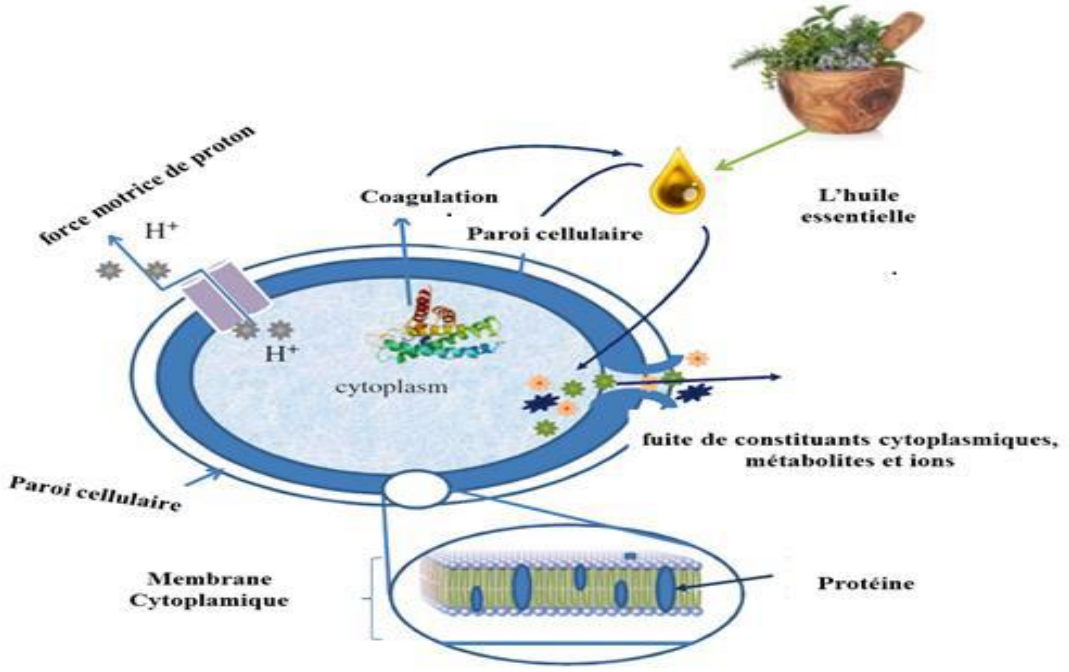


Figure 1.4: Mécanisme d'action des HEs sur la cellule bactérienne (Liet al., 2014).

1.4.1.1.2. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des HE. Le choix de la méthode est

conditionné par l'insolubilité des HE dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de

les tester à de faibles concentrations.

-Aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé. La technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une

suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité bactériostatique de l'HE sur le germe testé. On peut exprimer cette activité soit en indiquant directement le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre, soit en traduisant en croix le degré d'activité (Guerin et Carret, 1999).

-Méthode de diffusion en puits

Méthode proposée par Cooper et Woodman en 1946 et reprise par Shroeder et Messing en 1949. Elle assure une diffusion radiale de l'HE à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire dans la gélose et y verser une solution de l'HE de concentration connue. L'HE diffuse radialement en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec la suspension bactérienne (Eymard, 2003).

- Méthode de dilution

Les H.E à tester peuvent également être directement mélangées en concentration connue au milieu de culture, qu'il soit solide ou liquide (exige la dispersion homogène par un émulsifiant). Le milieu est ensuite inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture. La lecture peut-être visuelle ou à l'aide d'un spectrophotomètre, le degré d'inhibition est en rapport avec la turbidité du milieu (Robert-Demuet, 1995).

- Méthode de micro-atmosphère

Cette technique consiste à cultiver les microorganismes à tester dans les boites de Pétri sur milieu de culture approprié. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné d'HE qui est déposé au centre du couvercle de la boite de Pétri, renversée après fixation de l'HE sur le disque. Celui ci n'est donc pas en contact avec le milieu gélosé. L'huile s'évapore dans l'atmosphère de la boite, elle peut exercer son effet inhibiteur sur les microorganismes testés (Pibiri, 2005)

1.4.1.2. Activité antifongique

Les huiles essentielles constituent une source potentielle pour des nouveaux médicaments antifongiques, soit sous leur forme pure soit sous forme de dérivés des composés originaux pour une optimisation thérapeutique plus efficace et plus sûre (Peralta et al., 2015). Les huiles essentielles ou leurs composés actifs sont également employés comme agents antifongiques dans les industries agro-alimentaires (Zambonelli et al., 2004). L'eugénol est un composé antifongique efficace qui cause des dommages permanents aux cellules des levures tels que *Candida albicans* (Latifah-Munirah et al., 2015), et des champignons : *Aspergillus ochraceus*, A. *versicolor, A. niger, A. fumigates, Trichoderma viride et P. funiculosum* (Beatovic et al., 2015). Papajani et al. (2015) ont rapporté l'activité antifongique de l'huile essentielle de romarin sur les dermatophytes tels que : *Epidermophyton floccosum, Arthroderma cajetani, Microsporum gypseum, Microsporum canis, Trichophyton violaceum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum et Trichophyton tonsurans,* et des champignons phytopathogènes tels que *Botrytis cinerea et Pleomorphomonas oryzae.*

Les composés phénoliques des huiles essentielles modifient la perméabilité cellulaire fongique en interagissant avec les protéines de la membrane. Cela provoque la déformation de la structure cellulaire, et perturbe la fonctionnalité aboutissant alors à la perte des macromolécules conduisant à une inhibition de la croissance fongique (Pramila, et al., 2012). D'autre part, la pectine, composé essentiel des parois des cellules végétales nécessaire à l'adhésion cellulaire est hydrolysée par les pectinases fongiques. Il semblerait que les composés phénoliques des HE joueraient un rôle inhibiteur de celles-ci (Vermeriss et Nicholoson, 2006).

L'exposition des cellules fongiques à l'huile essentielle conduit généralement, à la coagulation des composants cellulaires dus à des dommages irréversibles de la membrane cellulaire. Chez la levure, l'huile essentielle établi un potentiel membranaire en perturbant la production d'ATP, ce qui conduit à la lyse cellulaire (Aleksic et Knezevic, 2014). Les huiles essentielles ont la capacité de pénétrer et de perturber la paroi cellulaire des champignons et des membranes cytoplasmiques grâce à un processus de perméabilisation, ce qui conduit à la désintégration des membranes mitochondriales. Ceci est causé par des altérations dans le flux. Cela peut aussi endommager les lipides, les protéines et les acides nucléiques contenus dans les cellules infectées par les champignons pathogènes (Arnal-Schnebelen et al., 2004). Les huiles essentielles pourraient également

perturber la dépolarisation de la membrane mitochondriale en agissant sur les canaux d'ions, surtout les ions du Ca2+, pompes à protons et pools d'ATP qui amène vers une diminution du potentiel membranaire. Ce changement dans la fluidité des membranes peut causer une perte d'électrolytes par la perturbation des voies de cytochrome C, des métabolismes des protéines et des concentrations d'ions du calcium. Par conséquent, cette modification de la perméabilité des membranes mitochondriales internes et externes peut entraîner l'apoptose des cellules conduisant à la mort cellulaire (Yoon et al., 2000).

1.4.2. Activité antivirale

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des HE telles que les monoterpénols et les monoterpénals. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des HE ont montrées des améliorations importantes. L'effet antiviral de l'HE de *Mentha piperita* a été étudié « *in vitro* » contre les virus de Herpes Simplex (HSV-1 et HSV-2), une inhibition de 50% est obtenue avec des concentrations entre 0,002% et 0,008% (Schuhmacher et Reichling, 2003).

1.4.3. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse physiopathologique de la blessure, d'une infection ou d'une destruction caractérisée par la chaleur, la rougeur, la douleur et le gonflement. L'inflammation est une réaction normale de corps pour se protéger des lésions causées par des traumatismes physiques, agents chimiques ou microbes pathogènes. C'est la réponse de l'organisme pour inactiver ou détruire les organismes envahisseurs, pour éliminer les irritants. Elle est déclenchée par la libération de médiateurs chimiques des tissus lésés et migration des cellules. Les médicaments les plus couramment utilisés pour la gestion d'affections inflammatoires sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), qui ont plusieurs effets indésirables en particulier l'irritation gastrique conduisant à la formation d'ulcères gastriques (Bennett, 2005 ; Tripathi, 2008). Les recherches approfondies sur les différentes espèces de plantes et leurs principes actifs thérapeutiques utilisés dans le traitement de la goutte, de l'arthrite et de la fièvre ont aboutis à la mise en évidence de nouveaux composés ayant des activités antiinflammatoires significatives (Joseph et al., 2015).

Un effet anti-inflammatoire a été décrit pour de nombreuses huiles essentielles, tels que celles de : *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani et al., 1999). L'huile essentielle des racines de *Carlina acanthifolia* est capable d'inhiber l'inflammation induite par une injection de carraghénane chez le rat (Dordevic et al.,

2007).

Les familles biochimiques à action anti-inflammatoire et/ou antalgique qui constituent les composés de différentes huiles essentielles sont : les aldéhydes monoterpéniques, les esters terpéniques, les sesquiterpènes et les monoterpènes, l'eugénol (phénol aromatique), l'eucalyptol (oxyde terpénique) ou 1,8 cinéole, alcools terpéniques (sesquiterpénols, monoterpénols), les cétones terpéniques, les phénol méthyl-éthers (Spinola, 2016).

1.4.4. Activité insecticide

Les denrées stockées peuvent être attaquées par les insectes, les champignons et les rongeurs. Les dégâts causés par les insectes sont les plus importants, ils peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et la quantité des produits stockés. D'après l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), les pertes dues aux insectes nuisibles correspondent à 35% de la production agricole mondiale (Bounechada et Arab, 2011). L'utilisation d'insecticides ou fumigènes de synthèse est l'une des méthodes de lutte efficace contre ces ravageurs (Haubruge et al., 1988 ; Relinger et al., 1988). Mais la présence dans les denrées de résidus et l'apparition de souches d'insectes résistants à ces insecticides deviennent de plus en plus préoccupants.

Il importe donc de rechercher des méthodes alternatives de lutte et le règne végétal offre à cet effet beaucoup de possibilités. De nombreuses études se développent actuellement pour isoler ou identifier des substances secondaires extraites de plantes qui ont une activité insecticide répulsive ou antiappétante vis-à-vis des insectes (Lichtenstein, 1966). De plus, des produits issus de plusieurs espèces florales ont des effets répulsifs, contre un certain nombre d'insectes Coléoptères qui attaque les produits entreposés (Hashem et al., 2012).

De même, les extraits de plantes sollicitent simultanément plusieurs mécanismes physiologiques (par opposition à des pesticides n'ayant qu'une seule cible moléculaire), ce qui peut retarder l'apparition de populations résistantes d'insectes. Ainsi, des populations du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulz.), traitées avec des extraits purifiés de neem ont développé 9 fois leur niveau initial de résistance en 40 générations, alors que des populations traitées avec des mélanges bruts n'avaient pas développé de résistance (Feng et Isman, 1995). Cependant, les mécanismes d'action des propriétés pesticides des HEs sont méconnus et Relativement peu d'études ont été réalisées à ce sujet (Isman, 2000). On considère que ces mécanismes sont uniques et que les biopesticides à base d'huiles essentielles peuvent être des outils de choix dans les programmes de gestion de la résistance des ravageurs aux pesticides. Avec ces mécanismes d'action particuliers, ces

biopesticides peuvent être utilisés seuls et à répétition sans potentiellement inciter le développement de la résistance chez les ravageurs aux pesticides (Chiasson et Beloin, 2007).

1.4.5. Activité antioxydante :

La formation des radicaux libres est un processus continu et évolutif. Ces molécules jouent un rôle vital dans la signalisation cellulaire, contrôle de tonalité vasculaire, défense contre les micro-organismes, la génération de cellule et la régulation de l'homéostasie (Basu, 2010). Toutefois, lorsqu'il y a un excès des radicaux libres, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) participent également à la pathogenèse liées à des dommages de l'ADN et aux protéines causant des modifications des gènes et des mutations protéiques, des dommages glucooxydatifs et une dégradation des lipides membranaires des cellules (Carocho et Ferreira, 2013).

Le mécanisme de défense de l'organisme en général diminue avec l'âge et peut être compromis par les diverses formes de stress oxydatif résultant de facteurs environnementaux causant des troubles de santé : le cancer, le diabète, l'athérosclérose. Toutes ces conditions, ainsi que le processus de vieillissement, sont associés à un stress oxydatif en raison de l'élévation des ROS ou une désintoxication insuffisante de ces espèces, favorisant ainsi le processus de vieillissement précoce ou prématurée de la peau (Igwe et Echeme, 2014). Il a été démontré qu'in vitro les plantes possédaient une capacité antioxydante en convertissant les radicaux libres en produits stables et en inhibant l'activité dégénérative de certaines enzymes de la peau (Ndlovu et al., 2013).

Les substances polyphénoliques des huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques, mais la propriété la mieux décrite dans tous les groupes de composés phénoliques est leur capacité d'agir comme antioxydant. L'activité antioxydante des phénols dépend de la disposition des groupes fonctionnels autour de la structure nucléaire, la configuration, la substitution et le nombre total des groupes hydroxyles qui influencent considérablement les différents effets antioxydants des radicaux et la chélation des métaux (Kumar et Pandey, 2013). De nombreux auteurs ont rapporté les propriétés antioxydantes et antiradicalaires des huiles essentielles (Sacchetti et al., 2005).

Les huiles essentielles, ont été largement évaluées concernant leurs activités antioxydantes puisqu'ils ont été utilisés dans lesaliments industriels comme des antioxydants naturels (Hellali, 2016). Ruberto et Baratta (2000), qui avaient étudié l'activité antioxydante de 98

composants pure de l'huile essentielle de *Teucrium marum*, représentant les principales classes des composés typiques des huiles essentielles, ont montré que les hydrocarbures sesquiterpèniques exercaient un effet antioxydant faible, alors que les hydrocarbures monoterpéniques ont montré un effet antioxydant significatif, avec plusieurs variantes en raison des différents groupes fonctionnels. Teixeira et al., (2013) qui ont décrit que l'activité antioxydante élevée de l'huile essentielle du clou de girofle indienne est due à son composé majoritaire l'eugénol qui est un phénylpropanoïde, connu comme un puissant antioxydant.

L'effet antiradicalaire de l'huile essentielle pourrait être dû à la présence d'une grande proportion des composés phénoliques (Almeida et al., 2011). Il est rapporté que les composés phénoliques peuvent donner un atome d'hydrogène aux radicaux libres arrêtant de ce fait la réaction en chaîne de propagation pendant le processus d'oxydation des lipides (Sánchez -Mareno et al., 1998). Les composés phénoliques réagissent selon un mécanisme proposé par Sherwin (1976), l'antioxydant cède un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de protons, pour donner un intermédiaire radical stabilisé.

1.4.5.1. Les antioxydants

L'antioxydant est une substance capable de neutraliser ou de réduire les dommages causés par l'oxygène ou les radicaux libres dans l'organisme. Dans les végétaux, les principaux antioxydants sont les vitamines C et E, les caroténoïdes et le sélénium. Ces antioxydants sont définis aussi comme des agents redox qui réagissent avec les oxydants afin de stopper ou ralentir le processus d'oxydation, et ainsi ajustent l'équilibre redox cellulaire. En plus de leur utilisation en thérapeutique, ils sont utilisés dans différentes industries telles que les industries agro-alimentaires. Ainsi, l'antioxydant constitue un additif alimentaire pouvant protéger les denrées alimentaires des altérations provoquées par l'oxydation par l'oxygène moléculaire, telles que le rancissement des matières grasses. Plusieurs types d'antioxydants existent tels que les antioxydants moléculaires, les antioxydants exogènes, les antioxydants phénoliques naturels dans les plantes médicinales et aromatiques **(**Marrouf, 2009).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2. 1. Matériel utilisé

2.1.1. Matériel végétal

Notre travail a porté sur les feuilles séches de deux plantes appartenant à la famille des Myrtacées *Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* récoltées aux mois de Juin et Juillet respectivement en 2016 dans la forêt de Bainem, située dans la commune d'Elhammamet (Alger, 36°45, 37" N et3°25, 55" E).

Les deux plantes sont séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité dans un endroit sec et aéré pendant deux semaines. Elles sont ensuite laminées sans être broyées pour servir à l'extraction de l'huile essentielle. L'identification des espéces a été effectuée par des chercheurs au niveau de l'institut national de la recherche forestiére, INRF, Bainem, Alger.

L'*Eucalyptus blakelyi* est un arbre pouvant atteindre 20à 25 m de hauteur, il se caractérise par une écorce lisse se détachant en morceaux au cours de l'année. Les feuilles juvéniles sont arrondies, les feuilles adultes sont vertes, alternes et lancéolées (9-16cm de long et de 0.7-4.5 cm de large) (Figure 2.1a). Les inflorescences sont axillaires, en ombelles de 7 à 11fleurs de couleur banche, la corolle est constituée d'un opercule conique (5-8mm de long), le calice est formé d'un tube hémisphérique (3-4mm de longueur, 3-5mm de largeur) (Figure 2.1a). Ses boutons floraux sont fusiformes et sont groupés en groupe de sept. Les fruits sont ovoïdes à hémisphériques, présentant 3à 4 valves, les graines sont de couleur noire (Pryor, 1982).

Eucalyptus cladocalyx est un arbre pouvant atteindre 40m de haut. Son écorce est lisse, de couleur blanc-grisâtre. Les feuilles jeunes sont opposées ou légèrement alternées, pétiolées ou elliptiques de couleur vert clair de 5-6cm de long, les feuilles adultes sont alternes, lancéolées ou légèrement falciformes de 8-14 cm de long et de 2à 3cm de large de couleur vert sombre et lustrées à l'extérieur, vert clair à la face inférieure, le pétiole est mince, rond de 2 à 2.5cm de long, la nervure médiane est mince, apparente de couleur claire légèrement verdâtre, les nervures latérales sont peu apparentes, reliées entre elles sur les bords du limbe par une nervure également peu apparente (Figure 2.1c). Les inflorescences sont en

ombelles et axillaires à 5 ou 6 boutons cylindriques (Figure 2.1b). Les fruits ont la forme des disques étroits, obliques avec des valves qui se soulévent pour laisser échapper les graines (Pryor, 1982).



Figure 2.1 : Branches feuillées et inflorescences
a. *Eucalyptus blakelyi*, **b & c.** *Eucalyptus cladocalyx*

2.1.2. Souches microbiennes

Deux espèces fongiques redoutables des céréales ont été obtenus du laboratoire de recherche « Amélioration Intégrative des productions végétales » de l'Ecole Nationale Supérieurs Agronomique. Ces agents fongiques sont :

- ✓ Bipolaris sorokiniana isolé du blé, l'agent causal de l'helminthosporiose sur Blés
- ✓ Pyrenophora teres isolé de l'orge, l'agent causal de l'helminthosporiose sur Orge

2.2. Méthodes

2.2.1. Extraction des huiles essentielles :

L'extraction des huiles essentielles d'*E blakelyi* et *E cladocalyx* a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un dispositif de type Clevenger pendant 2h et 30mn. Une quantité du matériel végétal (200g) est introduite dans un ballon contenant d'eau distillée, le mélange est porté à ébullition. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans un collecteur et chutent dans une ampoule à décanter. En fin de décantation, on obtient deux phases (huile essentielle+hydrolat), l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Elles sont alors conservées dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4 à 5ºC) (Figure 2.2).



Figure 2.2 : Extraction par hydrodistillation type clevenger

2.2.1.1. Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse de la matière végétale utilisée **(AFNOR, 1986)**. Le rendement (R) est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$R = Ph / Pp \times 100$$

Ph : poids de l'huile essentielle en g

Pp : poids de la plante en g.

2.2.1.2. Caractérisation organoleptique des huiles essentielles

Les caractéristiques organoleptiques à savoir l'apparence, couleur, odeur et gout étaient autrefois les indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle.

2.2.1.3. Détermination des constantes physicochimiques des huiles essentielles et eaux aromatiques

- **Propriétés chimiques**

- Indice d'acide (NFT 75 103, 1982)

L'indice d'acide (I.A) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g de substance.

Mode opératoire

Peser 2 g d'H.E. Introduire la prise d'essai dans le ballon. Ajouter 5 ml d'éthanol à 95% et 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine. Titrer le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium (0,1 M) jusqu'à obtention d'une couleur rose persistante pendant 30 secondes. Noter le volume de solution d'hydroxyde de potassium utilisé. Mettre en réserve le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester. L'indice d'acide (I.A) est donné par l'équation suivante :

I.A = V* 5,61/m où :

V : est le volume en millilitres de solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour le titrage

m : est la masse en grammes de la prise d'essai

5,61 : correspond à 0,1 mole/l de KOH ajoutée.

-Indice d'ester (NFT 75 104, 1982)

L'indice d'ester (I.E) est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libres par l'hydrolyse des esters présents dans 1 g de substance.

Mode opératoire

Ajouter 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium ainsi que des fragments de pierre ponce dans le ballon provenant de la détermination de l'indice d'acide. Adapter le réfrigérant à reflux au ballon et le placer ensuite sur le manteau chauffant qui sera maintenu sur le ballon pendant une heure. Laisser ensuite refroidir le ballon et démonter le tube. Ajouter 20 ml d'eau et quelques gouttes de solution de rouge de phénol .Titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique. En parallèle, effectuer un essai à blanc dans les memes conditions mais en prenant soin d'ajouter au préalable 5 ml d'éthanol neutralisé (ce volume correspond au volume introduit lors de la détermination de l'indice d'acide).

L'indice d'ester est donné par la relation suivante :

I.E = 28,05 (V0-V1') où :

V0 : est le volume en millilitres de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour l'essai à blanc ;

V1' : est le volume en millilitres de solution d'acide chlorhydrique utilisée dans la détermination de l'I.E

28,05: correspondant à 0,5 M de KOH.

- **Propriétés physiques**

- Densité relative à 20°C (NFT 75 111, 1982)

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un égal volume d'eau distillée à 20°C.

- Pouvoir rotatoire (NFT 75 113, 1982)

Le pouvoir rotatoire est un critère important de pureté de l'huile essentielle qui permet de savoir si elle est optiquement active **(Guenther, 1972).** Si un faisceau lumineux polarisé dans un plan traverse une solution d'une substance, le plan de polarisation est dévié selon un angle qui est fonction :

• de la longueur d'onde de la lumière utilisée

• de la température

• de la nature de la substance

• de la nature de la solution.

Une telle substance est dite douée d'une activité optique. On mesure la valeur de l'angle de déviation du plan de polarisation à l'aide d'un polarimètre. La lumière monochromatique utilisée est le plus souvent la raie D du sodium ; les mesures sont en général réalisées à la température de 20 C°.

Mode opératoire

Calibrer l'appareil (POLAX-2L) selon les recommandations du constructeur. Allumer la source lumineuse et attendre la pleine luminosité. Remplir le tube avec l'échantillon en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée. Placer le tube dans le polarimètre et lire la mesure de l'angle de rotation. Le pouvoir rotatoire est exprimé par la relation :

$$[\alpha]\omega = R \times 100 / C \times L$$

R= angle de rotation qui est le plan de polarisation mesuré en degrés au polarimètre

C= concentration de la substance en g /100ml solution

L = longueur du tube de polarimètre contenant la solution exprimée en centimètre.

- Indice de réfraction (NFT 75 112, 1977)

Les indices de réfraction sont mesurés à l'aide d'un réfractomètre à la température de chambre puis ramenés à 20°C par la formule : I_{20}= It+ 0,00045 (T - 20°C) où :

I_{20} : indice à 20°C

It : indice à la température de chambre ;

T : température de mesure.

L'étalon pour réflectométrie servant à ajuster le réfractomètre est l'eau distillée avec un indice de réfraction de (1,333) à 20°c.

Mode opératoire

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à 20°C. Ouvrir le prisme secondaire et déposer 2 ou 3 gouttes de l'échantillon liquide sur la partie centrale du prisme principal. Fermer ensuite doucement le prisme secondaire. L'échantillon s'étale entre le prisme principal et le prisme secondaire en un film mince. Attendre que la température soit stable et effectuer la mesure. La valeur de la mesure pour un échantillon liquide étant modifiée suivant le changement de température, lire

l'indication
de température pour connaître la température de mesure réelle et la joindre sans faute à la valeur mesurée.

L'indice de réfraction nt (IR) à la température de référence t, est donné par l'équation suivante :

n t (IR) = **n t'** + 0,0004 (t-t') où :

n t est la valeur de lecture obtenue à la température (t') à laquelle a été effectuée la détermination.

- Indice de saponification (IS):

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acide gras libre et pour saponifier les acides gras combinés (les esters) présents dans un gramme de corps gras. Cette valeur est d'autant plus élevée que les acides gras sont de plus faible poids moléculaire **(Afnor, 1978).**

***Mode opératoire**:*

- Peser 1g d'huile dans un ballon rodé ;
- Ajouter 25ml de KOH à 0,5N (mol /l)
- Adopter le mélange contenu dans le ballon à un réfrigérant
- Laisser à ébullition pendant une heure
- Refroidir le ballon sous l'eau du robinet
- Ajouter quelques gouttes de phénolphtaléine
- Titrer par une solution de HCL à 0,5N jusqu'à la disparition de la couleur rose et la réaparition de la couleur initiale du mélange, E
- Effectuer dans les mêmes conditions un essai à blanc.

L'indice de saponification est calculé selon la formule suivante**:**

IS = **(V0-V) / P×N×56,11 (Wolff., 1968)**

Où :

56.11 : est la masse molaire, exprimée en (g/mol) du KOH ;

V_0 est le volume en (ml), de HCL utilisé pour l'essai à blanc ;

V est le volume en (ml), de HCL utilisé pour l'échantillon à analyser ;

P est la masse en (g), de la prise d'essai ;

N est la normalité de la solution du KOH à 0,5N

- Indice de peroxyde (IP)

L'indice de peroxyde ou indice de Lea est une mesure permettant d'estimer la quantité de peroxyde présent dans une matière grasse. Les peroxydes, constituants caractéristiques de l'oxydation des acides gras insaturés sont déterminés en se basant sur leur propriété de libérer l'iode de l'iodure de potassium dans les milieux acides. L'iode libéré est mesuré par la réaction avec le thiosulfate, sachant que 1 ml de thiosulfate à 0,01N correspond à une quantité de 80 mg d'oxygène fixé sur les acides gras **(Lion., 1955).**

Mode opératoire

- Peser dans un erlenmeyer de 250 ml, 1 g d'huile
- Ajouter 10 ml chloroforme et dissoudre rapidement la prise d'essai en agitant
- Ajouter 15 ml d'acide acétique, puis 1 ml d'une solution d'iodure de potassium(KI)
- Boucher aussitôt l'erlenmeyer, l'agiter durant 1 min
- Laisser le exactement 5 mn à l'abri de la lumière et à une température comprise entre 15 et 25 °C
- Ajouter 75 ml d'eau distillée et bien agiter
- Titrer l'iode libéré par la solution de thiosulfate en agitant vigoureusemet, en présence de quelques gouttes d'empois d'amidon comme indicateur coloré;
- Effectuer de la même façon un essai à blanc

- L'indice de peroxyde est calculé selon les formules ci-dessous :

$$IP = V*T/m*1000$$

V: le volume en ml de la solution de thiosulfate de sodium utilusée pour l'essai corrigé compte tenu de l'essai à blanc

T:facteur de normalitée de la solution de thiosulfate de sodium utilusée

M: la masse en gramme de la prise d'essai

2.2.2. Étude des activiés biologiques des huiles essentielles et eaux aromatiques

2.2.2. 1. Étude de l'activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne des HE et hydrolats, nous avons adopté la méthode de diffusionsur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide

dans une boite de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition (Figure 2.3). La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Benjelali *et al.*, 1986).

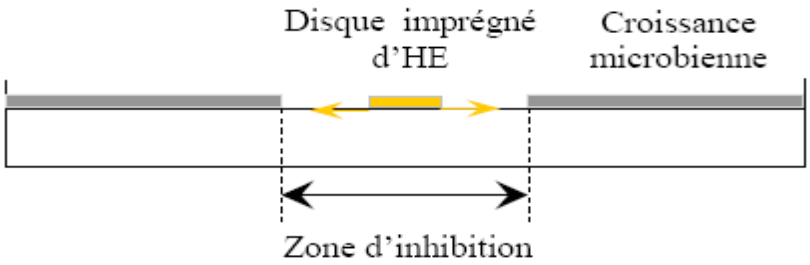


Figure 2.3 : Méthode de Diffusion sur milieu gélosé (Ponce *et al.*, 2003)

Préparation des précultures

Les souches bactériennes préalablement conservées à 4°C dans des tubes stériles contenant de la gélose nutritive inclinée ont été réactivées dans le bouillon nutritif puis incubées à 37°C. Après 24h, des gouttelettes de la suspension ont été ensemencée par stries sur gélose nutritive puis incubées pendant 18h-24h à 37°C.

Préparation de la suspension bactérienne

Après incubation, des colonies similaires bien isolées sont mises en suspension dans l'eau physiologique stérile à 0.9% NaCl. Apres homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la standardisation de la densité optique à 0.5Mc Farland est réalisée par spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625nm. La densité optique obtenue doit être comprise entre 0.08 et 0.1, ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml selon Mac Farland (Athamena et al., 2010). L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

Préparation des dilutions des huiles essentielles et hydrolats testées

Pour pouvoir obtenir différentes concentrations de l'huile essentielle et hydrolats, nous avons dilué ces huiles essentielles et hydrôlats dans le DMSO. Ce choix a été fait, parceque, le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant (Gachkar et al., 2006).

Ensemencement

Dans des boites de Pétri, le milieu de culture gélosé Mueller-Hinton en surfusion est coulé aseptiquement à raison de 15 ml par boite. Après solidification sur la paillasse, un écouvillon stérile imbibé avec la suspension bactérienne de concentration d'environ 10^8 UFC/ml fraichement préparée est étalé à la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boite à environ 60° après chaque application sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Application des disques

Des disques blancs stériles de 6mm de diamètres sont imprégnés avec l'huile essentielle et hydrolats de l'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* puis déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile. Le disque d'antibiotique (Gentamycine) et le disque blanc imprégné du DMSO sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince bactériologique stérile. L'antibiotique est utilisé comme contrôle positif.. Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif.

Incubation

Toutes les boites de Pétri sont scellées avec du parafilm stérile pour éviter l'évaporation éventuelle des huiles essentielles et hydrolats. Elles sont maintenues à 4°C pendant 2h, puis incubées à 37°C pendant 24h. Chaque essai a été réalisé en triplicata pour chaque espèce bactérienne.

Lecture

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

- Non sensible (-) ou résistante: diamètre < 8mm.
- Sensible (+): diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++): diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++): diamètre > 20 mm.

2.2.2.2. Essai d'activité antifongique

La méthode de contacte direct est utilisée. Elle consiste a incorporer dans le milieu de culture PDA des concentrations différentes en huile essentielle et eaux aromatiques avec le tween 20. Le mélange (PDA+HE+ Tween20) est coulé à raison de 5ml dans des boites de Pétri. Des disques mycéliens issus de la marge d'une culture âgée de 7jours sont prélevés et ensuite inoculés au centre de chaque boite (1 disque/boite).Chaque concentration est répété trois fois. Les boites sont incubées à température de 20 ± 2C°. Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions sans huile essentielle et les mesures sont prélavées après 72 h d'incubation (Terzi et al., 2014).

Evaluation de la croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée toutes les 24 heures en mesurant la moyenne de trois diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque concentration. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins qu'ils ont démarrés le même jour et dans les mêmes conditions.

Détermination de l'indice antifongique

A prés l'incubation en tenant compte de la croissance de témoin, on calcule l'indice antifongique qui est déterminé par la formule (Chang et al ., 1999).

IA = (1-Da/Db) ×100

Da: diamètre de la zone de croissance de l'essai.

Db: diamètre de la zone de croissance du témoin.

Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VCM)

Selon (Cahagnier et Molard, 1998), La vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule:

VCM = [D1/Te1] + [(D2-D1)/Te2] + [(D3-D2)/Te3] +… + [(Dn-Dn-1)/Ten]

D: diamètre de la zone de croissance du chaque jour

Te: temps d'incubation

2.2.2.3. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles et hydrolats

l'activité antioxydante des huiles essentielles et hydrolats d'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* est évaluée quantitativement par le piégeage du radical libre DPPH.

Principe

Cette activité est basée sur la réduction d'un radical libre: le 2, 2′-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Figure 2.4) en présence d'un antioxydant donneur. Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine. La réduction du DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrophotométrie, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par la présence d'un antioxydant (Burits et Bucar, 2000). Le DPPH est d'une couleur violette, il se décolore lorsque l'électron célibataire s'apparie (Figure 5). Cette décoloration est représentative de la capacité des composés phénoliques à piéger ces radicaux libres indépendamment de toute activité enzymatique (Molyneux, 2004).

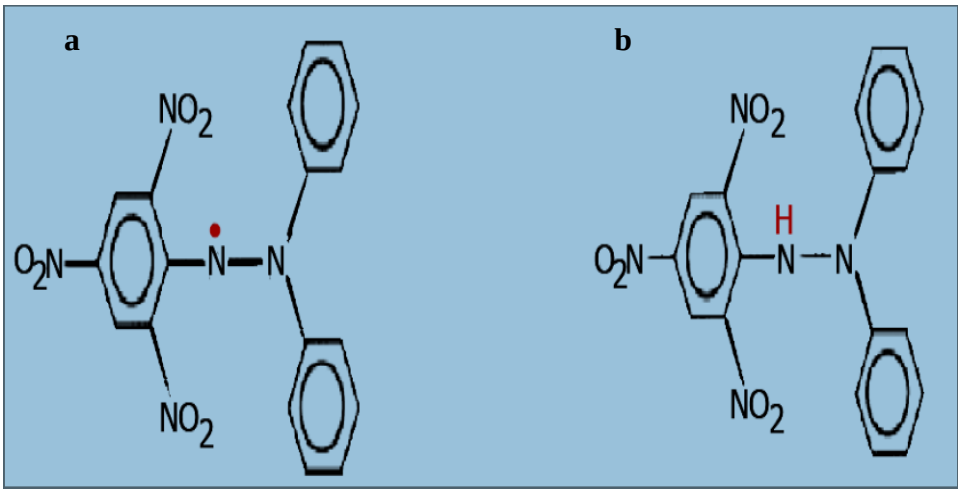


Figure 2.4 : Forme libre et réduite du 2, 2- diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH)

(Molyneux 2004).

Mode opératoire

La capacité des huiles essentielles et eaux arômatiques des deux espéces étudiées à piéger le radical libre DPPH est évaluée par la methode décrite par Brand Williams (1995) suivie du calcul de l'IC50.

La solution du DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml de méthanol absolu, 200 microlitres de l'huile essentielle et hydrolat à différentes concentrations sont ajoutés à 1.8ml de la solution méthanolique de DPPH. Des solutions d'acide ascorbique sont également préparées dans les mêmes conditions pour servir de

témoin positif. Le témoin négatif est constitué uniquement de DPPH et du méthanol. Le mélange obtenu est laissé à l'obscurité pendant 30mn jusqu'à décoloration. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517nm.

La capacité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical par la formule suivante:

$$\mathbf{I\ (\%) = ((A_c - A_t)\ /A_c)*100}$$

D'où

I (%): capacité antioxydante

A_c: absorbance du contrôle

A_t: absorbance du test effectué.

Calcul de l'IC50

L'IC_{50} (concentration inhibitrice médiane) est la concentration d'extrait ou d'huile essentielle nécessaire pour réduire 50% de l'activité de DPPH. Elle est calculée graphiquement par régression linéaire de graphe tracé: pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations des échantillons testés (Molyneux, 2004). Une faible valeur d'IC_{50} indique une forte capacité de piéger le radical libre DPPH.

Chapitre 3

Résultats et discussion

3.1. Extraction et rendement en huile essentielle

Les rendements moyens en huiles essentielles de l'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* issues de l'hydrodistillation des feuilles sèches ont été estimés respectivement à 2.13% et 0.49%.

Une augmentation remarquable du rendement obtenu pour l'*Eucalyptus blakelyi* comparativement à celui rapporté par Foudil-Cherif et al., (2000) qui est de 1.42%. Par contre le rendement est similaire pour l'*E cladocalyx* à celui obtenu par Foudil Cherif et al., (2000) à partir du même site de récolte. L'huile essentielle de l'*Eucalyptus cladocalyx* extraite par Farah et al., (2002) a révélé une teneur de 0.30% ce qui est inférieur par rapport à nos résultats. Cela veut dire que la quantité de l'huile essentielle pour les deux espèces n'est pas stable ni dans le temps ni dans l'espace. En comparaison avec d'autres espèces, *E.radiata* dans le site de Tizi Ouzou présente un taux de 1.19% (Taleb-Toudert, 2015). Durant différentes extractions au fil de l'année, des rendements entre 6.7 à 8.4% ont été cités chez *Eucalyptus radiata* par singh, (1994), Farah et al., (2002), a obtenu des rendements variables pour différentes espèces de la même région au Maroc, des rendement de 0.42%, 1.65% et 3.38 % chez *E grandis, E globulus* ssp. Maideni et *E diversicolor* respectivement.

L'étude de Ben Marzoug et al. (2011) a permis de révéler une teneur en huile essentielle évaluée à 0.45% chez *E oleosa* cultivé au sud de la Tunisie. Ces différences enregistrées dans la littérature pour rendements de l'huile essentielle peuvent éventuellement être attribuées aux potentialités génétiques entre espèces ou même entre races au sein de la même espèce, les conditions climatiques et/ou édaphiques notamment la pluviométrie, la variation de la température, le régime des vents, la richesse du sol en éléments minéraux, d'autre facteurs comme le stade de croissance de la plante en question, le moment de la récolte et la méthode d'extraction contribuant ainsi à l'augmentation de la quantité d'huile essentielle (Karousou et al., 2005). De même qu'une photopériode longue est favorable à la réalisation d'un bon rendement en métabolites secondaires tels que les huiles essentielles (Boukhebti et al., 2011). La lumière stimule également la production des huiles essentielles. Des études sur *Mentha peperita* L. ont montré que l'obscurité a baissé le rendement en huiles volatiles

de 1.43% à 1.09%. L'irrigation a un effet positif sur la croissance végétative. Il est démontré que l'insuffisance ou l'excès d'eau influe négativement sur le rendement en huile essentielle (Elzakhem, 2003).

3.2. Etude analytique de l'huile essentielle

3.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Selon AFNOR (1986), les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, elles sont plus au moins colorées et leur densité est inférieure à celle de l'eau. Les huiles essentielles obtenues des deux espèces *E blakelyi* et *E cladocalyx* sont de couleur jaune claire, elles sont mobiles et présentent une odeur très forte et prononcée caractéristique de l'eucalyptol. Les paramètres organoleptiques de nos huiles essentielles sont en accord avec ceux énumérés dans les normes AFNOR 1986 (Tableau 3.1). Des résultats similaires ont été rapportés par Meheni (2015) et Taleb-Toudert (2015) sur des espèces voisines *Eucalyptus camaldulensis* et *E globulus* respectivement. Par ailleurs, l'huile essentielle de l'*E radiata* étudiée par Taleb Toudert (2015) est un liquide, jaune très pâle à odeur douce citronnée, ce qui diffère de nos résultats. Les différences enregistrées peuvent être attribuées à l'origine géographique ou même au stade du cycle végétatif au moment de la récolte (De Figueiredo et al., 2008).

Tableau 3.1 : Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle de l'*E blakelyi* et *E cladocalyx*

Huiles essentielles	**Aspect**	**Couleur**	**Odeur**	**Saveur**
E blakelyi	Liquide mobile	Jaune pâle	Forte et aromatique	Rafraichissante
E cladocalyx	Liquide mobile	Jaune pâle	Forte et aromatique	Rafraichissante
AFNOR1986	Liquide mobile	Incolore à Jaune pâle	Forte odeur prononcée de camphre	Rafraichissante

3.2.2. Les indices physicochimiques des huiles essentielles étudiées

Les propriétés physicochimiques ont été déterminées selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'association française de normalisation (AFNOR 1986). Les résultats de ces mesures sont portés dans le tableau 3.2

Tableau 3.2 : Les propriétés physicochimiques de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus cladocalyx* et *E blakelyi*

Propriétés physicochimiques	**Huiles essentielles**		**Normes AFNOR**
	E blakelyi	***E cladocalyx***	
La densité	0.90	0.94	0.90-0.925
Indice de peroxyde	0.49	1.59	/
Indice d'acidité	2.49	5.41	0.84-3.74
Indice d'ester	68.56	25.89	185-196
Indice de saponification	71.05	31.10	/
Indice de réfraction	1.46	1.48	1.46-1.47
Miscibilité à l'éthanol 70°	3	3	2-5

L'indice d'acide est un paramètre chimique qui donne une idée sur le taux d'acides libres (Kanko et al., 2004). Un indice d'acide faible indique une bonne conservation de l'huile essentielle car l'huile en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acidité (Taleb-Toudert, 2015). Dans la présente étude, un indice d'acidité faible a été enregistré pour l'huile essentielle de l'*E.blakelyi*. Cependant l'huile essentielle de l'*E.cladocalyx* a montré un indice d'acide légèrement élevé. Ce qui nous laisse penser que les huiles essentielles utilisées contiennent des quantités d'acides libres faibles voire négligeables, chose qui n'affecte pas leurs qualités. Ces résultats sont en concordance avec les normes AFNOR, 1986 et d'autres recherches citées par Foudil Cherif et al., (2000) ; Taleb-Toudert, (2015) ; Singh, (1994) et Meheni (2015).

L'indice de réfraction dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaines d'acides, de leurs degrés d'instauration et de la température. Il varie essentiellement avec la teneur en mono terpènes et en dérivés oxygénés (Koba et al., 2004)

une forte teneur en mono terpènes donnera un indice élevé. Pour certains auteurs (Kanko et al., 2004), le faible indice de réfraction de l'huile essentielle indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques .

L'indice de réfraction dans notre étude, est conforme d'après les normes, ceci corrobore le résultat cité par Foudil Cherif et al., (2000) et Singh (1994), une valeur supérieure a été rapportée par Meheni (2015) sur une espèce voisine, *E.camaldulensis*. L'indice d'ester calculé montre une valeur au dessous de la norme, une autre recherche a montré une valeur qui dépasse la norme (Taleb-Toudert, 2015). Ce qui suggère que cet indice est instable et probablement influencé par les conditions que s'oppose la plante.

3.3. Etude biologique des huiles essentielles

3.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

L'acticité antioxydante des huiles essentielles d'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* est évaluée par le test de piégeage du radical libre DPPH.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes du pourcentage d'inhibition pour chaque plante.

D'après les résultats représentés dans les figures, on peut constater que l'activité antioxydante est dose dépendante car elle est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

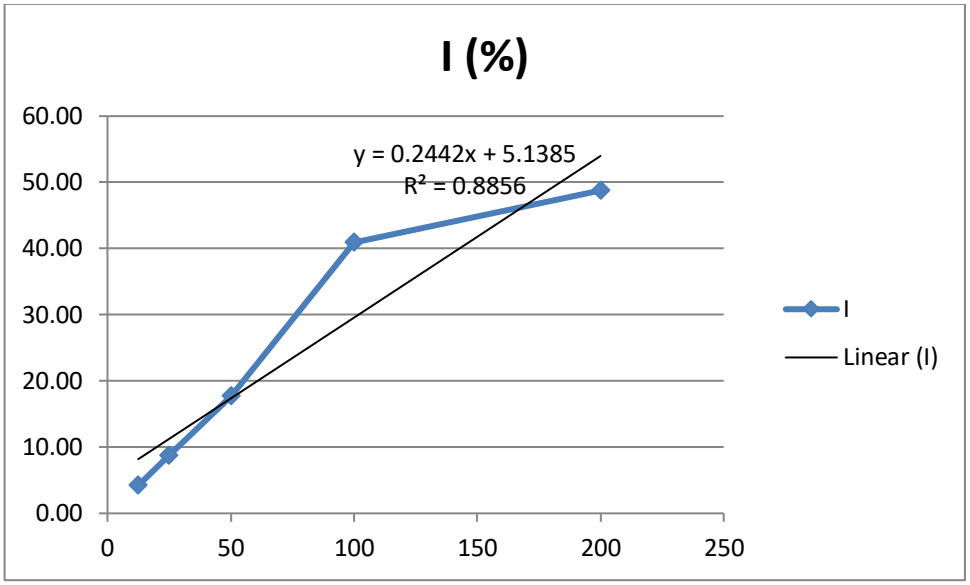


Figure 3.1 : Pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydant d'*Eucalyptus blakelyi*

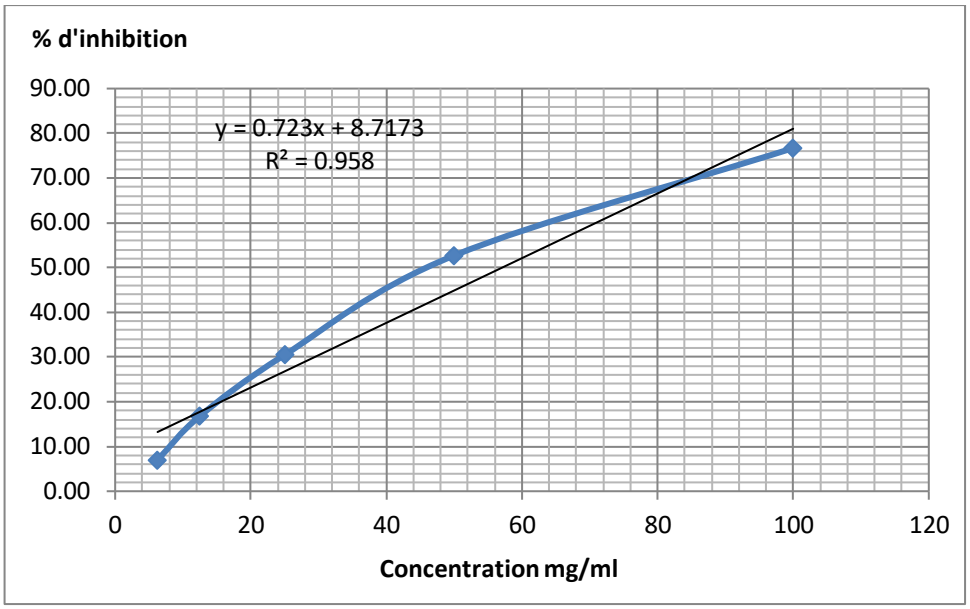


Figure 3.2 : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus cladocalyx*

A des doses inferieures à 100mg (0.5, 10 et 20 mg/ml), les deux huiles testées des deux espèces n'ont pas présenté des résultats satisfaisants. Il a fallut augmenter la dose jusqu'à 100mg/ml pour avoir des meilleurs résultats. A cette dose, l'huile essentielle d'*E cladocalyx* a présenté une grande activité de piégeage du radical DPPH de l'ordre de 77.14% (IC50 = 58.89 mg/ml), alors qu'une valeur moindre (48.77%) a été enregistrée pour *E blakelyi* (IC50 = 254mg/ml).

Une étude menée par Ben Marzoug et al. (2011) a démontré le fort pouvoir antioxydant des huiles essentielles des fruits, des fleurs immatures et des feuilles adultes avec des IC50 de l'ordre de 0,44 mg/ml, 1,27mg/ml et 1,53mg/ml respectivement.

Dans une étude antérieure, les huiles essentielles avec une prédominance monoterpénique ont montré une activité assez modeste (Gachkar et al., 2007). La faible activité antioxydante des huiles essentielles testées à des doses inferieures (0.5, 10 et 20 mg/ml), peut être expliquée par leur richesse en composés monoterpéniques. La présence des monoterpènes oxygénés dont le 1,8 cinéole et le p-Cymène, qui d'après beaucoup d'auteurs, ont été considérés comme des faibles antioxydants (Ruberto et Barata, 2000).

Conclusion

La flore Algérienne jouit d'une biodiversité considérable, elle possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales riches en métabolites secondaires avec des caractéristiques pharmacologiques et thérapeutiques.

Dans le cadre d'une valorisation de ces ressources naturelles, deux plantes aromatiques (*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx*) ont fait l'objet d'une caractérisation physicochimique de leurs huiles essentielles et d'une évaluation de leur potentiel antimicrobien et antioxydant.

L'extraction des huiles essentielles des feuilles d'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* par hydrodistillation, a fourni des rendements de 2.13 et 0.49% respectivement.

D'après cette étude, les huiles essentielles de ces deux espèces sont de couleur jaune pale avec une odeur agréable caractéristique de 1.8 cinéole.

Le contrôle des huiles essentielles par une caractérisation physicochimique permet de mettre en évidence la qualité de ces huiles qui se distinguent par des indices chimiques et physiques comparables à ceux obtenus par AFNOR. Ces résultats nous ont permis de s'assurer de la pureté de ces huiles. La bonne miscibilité de ces huiles essentielles dans le l'éthanol révèle la possibilité de les utiliser dans les préparations pharmaceutiques.

L'étude de l'activité antioxydante in vitro a été réalisée par le test du piégeage du radical libre DPPH, ce test a monté que le pouvoir antioxydant est dose dépendante.

Selon les résultats obtenus de l'effet de ce test, les huiles essentielles testées jouissent d'un potentiel antiradicalaire appréciable surtout pour l'huile essentielle de l'*Eucalyptus cladocalyx* avec une IC50 de l'ordre de 58mg/ml.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement actives.

Des essais complémentaires sont nécessaires tels que:

- Caractérisation chimique des huiles essentielles et eaux aromatiques par CPGMS
- Un fractionnement des huiles essentielles et l'étude de l'effet des composés majoritaires
- Détermination des activités biologiques de ces plantes, à savoir l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire et antivirale.
- Evaluation de la toxicité de ces huiles essentielles

- Application des huiles essentielles ou leurs vapeurs directement sur les denrées alimentaires durant le stockage.

Nous invitons enfin les populations à une utilisation rationnelle des plantes médicinales, car un usage abusif de ces plantes conduira sans doute une raréfaction, voire leur totale disparition.

Références bibliographiques

AFNOR. (1986). Huiles essentielles : recueil des normes françaises, Association Française de Normalisation 2è Ed. Paris, 57p.

AFNOR. (1978). Recueil des Normes françaises des corps gras. Graines oléagineuses : produits dérivés. Ed. Paris.

AFNOR. (1988). Corps gras, graines, oléagineuses, produits dérivés. 4eme édition. ISDN.

AFNOR. (2000). Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) – Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1 et 2). 6ème édition, Paris. 471p.

Almaraz-Abarca N., Campos M.D.G., Reyes J.A., Jimenez N.N, Corral J.H, GonzalezValdez L.S. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybeecollected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, *Leguminosae*). Journal of Food Composition and Analysis. 20:119-124.

Alexendriend. (1992). Essences forestières, Guide technique du forestier méditerranéen français. Edition techniques et documentation lavoisier, paris. 80p.

Arar Z., Houari S., (2008) Etude de comportements de quelques peuplements de boisement dans la régionde Ouargla. Université KasdiMerbeh- Ouargla. Mémoire d'Ecologie végétale et environnement. Option : écosystème steppique et sahariens. 43pp.

Arnal-Schnebelen B., Hadji-Minaglou F., Peroteau J.F., Ribeyre F., De Billerbeck V.G. (2004). Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. International Journal of Aromatherapy.14(4):192–197.

Astani A., Reichling J. & Schnitzler P., (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. Evid. Based Complement. Altern. Med. Article ID 253643, 8 pages. doi:10.1093/ecam/nep187.

Baudoux D., Zhiri A., Les cahiers pratiques d'aromathérapie selon l'école française, Amyris Éd, 2003, 292 p.

Baser K., H., C., Gerhard B., (2010). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Edition: Taylor & Francis Group, 975p .

Basu S. (2010). Fatty acid oxidation and isoprostanes: Oxidative strain and oxidative stress. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 82:219-225.

Benayad N., (2013). Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. Thèse de doctorat. Faculté des sciences, Université Mohammed V. AGDAL. Rabat Maroc

Benjilali B., (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales, cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.pp: 17-59.

Ben Marzoug H N, Romdhane M, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, Abderraba M, Khouja M L and Bouajila J. (2011). *Eucalyptus oleosa* essential oils: Chemical composition and antimicrobial and antioxidant Activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). Molecules. V. 16 (2). 1695-1709.

Bennett P.N., Brown M.J. (2005). Clinical pharmacology. Churchill Livingstone: New Delhi.

Bey Ould Si Said, Z. (2014). Activités biologiques des huiles essentielles des feuilles et du fruit d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Mémoire de magister, département des sciences alimentaires, Université Abderrahmane Mira Bejaïa : 109 p.

Bigendako M J., (2004). Identification et Zonage des Eucalyptus Globulus au Rwanda, Chemonics International Inc., projet ADAR, aoûtt, page 01

Biffin E., Lucas E.J., Craven L.A., Da Costa I.R., Harrington M.G., Crisp M.D., (2010). Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy- fruited Myrtaceae. Annals of Botany 106, 79–93

Blakelyi Maiden, (1917). Peuplement naturel mélangée TasmanieL.D.pryor. les Eucalyptus dans reboisements. Blakelyi n°186-code SNEEFA-FAO p94.p pp431

Boukhalfoun L, Kirouani A, Behidj N and Gana S. (2020). Assessment of some biological activities of *Eucalyptus blakelyi* Maiden Using the essential oil, methanolic and aqueous extracts. Journal of essential oil-bearing plant. V23 (2): 266-275.

Boukhebti H, chaker A N, Belhadj H, Sahli F, Rhamdani M, Laouar H and Harzallah H. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. *Mentha spicata* L. essential oils. Der Pharmacia Lettre. V. 3 (4) : 267-275.

Bounechada M. and Arab R. (2011). Effet insecticide des plantes *Melia azedarach* L. et *Peganum harmala* L. sur *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera:Tenebrionidae). Agronomie numéro 1: 1-6.

Bouziaine, E.L. et djebour, Z. (2016). L'activité antioxydante et antibactérienne d'huile essentielle d*'Origanum vulgare L* cultivé. Mémoire de master, département sciences agronomiques, Université Djilali Bounaama, Khemis Meliana : 61 p

Burt S., (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223–253.

Brooker M.I.H., (2000). A new classification of the genus Eucalyptus L'Her. (Myrtaceae). Australian Systematic Botany 13 (1), 79- 148.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie- Phytochimie- Plantes médicinales. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120 p.

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales, (2ème édition). Technique documentation, Paris. p 406, 410,915.

Capuzzo A, Maffei M E and Occhipinti A. (2013). Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. Molecules. V.18:7194-7238.

Chiasson H. and Beloin N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre » Bulletin de la Société d'entomologie du Québec Antennae. (14) : 1

Chemloul, F. (2014). Etude De L'activité Antibactérienne De L'huile Essentielle De Lavandulaofficinalisde La Région De Tlemcen. Mémoire Pour L'obtention Du Diplôme De Master, Département D'agronomie, Université Abou Beker Belkaid, Tlemcen : 35 p

Chiasson H. and Beloin N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre » Bulletin de la Société d'entomologie du Québec Antennae. (14) : 1

Clevenger JF. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. J Am Pharm Assoc 17: 346–1.

C.S. Yang, J.Y. Chung, G.Y. Yang, S.K. Chhabra, M.J. Lee, (2000). Tea and Tea Polyphenol in Cancer Prevention, Symposium: Diet, Natural Products and Cancer Prevention: Progress and Promise. American Society for Nutritional Sciences.

Couderc V.L. (2001). Toxicité des huiles essentielles. Thèse de grade Docteur Vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse, 61 p.

Cowan M.M., (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*

Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.1262 p.

De Figueiredo A C, Barrosso J G, Pedro L G and Scheffer J C. (2008). Factory affecting secondary metabolites production in plants : volatile components and essential oils. Flavour Fragrance Journal. V.23: 213-226.

Dordevic S., Petrovic S., Dobric S., et al. (2007). Antimicrobial, anti-inflammatory, antiulcer and antioxidant activities of Carlina acanthifolia root essential oil. Journal of Ethnopharmacology.109:58-463.

Duschatzky C.B., Possetto M.L., alaricoet L.B.T., et al. (2005). Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils fromSouth American plants. Antiviral Chemistry and Chemotherapy.16(4):247-251.

Edris A.E., (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. Phytotherapy research, 21(4)

Elberling J et Skov PS. (2007). *Increased release of histamine in patients with respiratory symptoms related to perfume*. Clin Exp Allergy. Nov, 37 (11): 1676-80.

El Zakhem M. (2003). Effets antifongiques des huiles essentielles extraites de l'*Origanum syriacum* L. et de *Salvia libanotica* Boiss et Gaill contre les *Candida* : *albicans, holmii*, et *famata.* Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies (DEA) en Agroalimentaire et Assurance-Qualité. Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA-PG).

Eymard S. (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conversation et de la transformation de chinchard (*Trachurus trachurus),* choix des procedés. Thése de Doctorat en Génie des procedés (Ecole Doctorale en Génie desProcédés: Spécialité Biochimie. Nante. France.

Farah A, Fechtal M et Chaouch Abdelaziz. (2002). Effet de l'hybridation interspécifique sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus* cultivés au Maroc Biotechnol. Agron. Soc. Environ. V. 6 (3): 163–169.

Farhat A., (2010). Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, 136p.

Feng, R. and Isman M.B. (1995). Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid *Myzus persicae*. Experientia 51: 831-833

F.L. Chung, M. Wang, A. Rivenson, M.J. latropoulos, J.C. Reinhardt, B. Pittman, C.T.Ho, S.G. Amin, Inhibition of Lung Carcinogenesis by Black Tea in Fischer RatsTreated with a Tobacco-specific Carcinogen: Caffeine as an Important Constituent. Cancer Research 58, 4096-4101, 1998.

Foudil-Cherif Y, Meklati B Y, Verzera A, Mondello L and Dugo G. (2000). Chemical Examination of Essential Oils from the Leaves of Nine Eucalyptus Species Growing in Algeria. Journal of Essential Oil Research. V. 12 (2) : 186-191.

Franchomme P., Pénoël, 1990. "L´Aromathérapie Exactement" fondements démonstration illustration et applications d'une science médicale naturelle, edition Roger Jollois. ed. Limoges.

F. V.Mueller (1852). Eucalyptus dans le Gharb (Maroc ccidentale). In : international de botanique appliquer et d'agriculture tropicale.32 année . bulletin n°357-358.j juillet-aôut1952 pp318-320..

F. V.Mueller (1852) . Peuplement naturel mélangée TasmanieL.D.pryor.les Eucalyptus dans reboisements.b blakelyi n°121-code SIS :A -FTA p82.pp453-454

Gachkar L, Yadegari D, Bagher Rezaei M, Taghizadeh M, Alipoor Astaneh S and Rasooli I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry. V.102 : 898-904.

Ghedira, K., P. Goetz, et al. (2008). "Eucalyptus globulus Labill." Phytothérapie 6(3) 197-200

Goldestein. H.B, Epstein. B.J (2000) : La dentisterie non conventionnelle : Parais 4, les pratiques et les produits dentaires conventionnels. J Can. Dent. Assoc.; 66: 564- .

Guillen MD et Manzanos MJ. (1998). Composition of the extract in dichloromethane of the aerial parts of a Spanish wild groing plant *Thymus vulgaris* L. Flav Frag J 13(4): 259–

Guerin-Faublee V et Carret G. (1999). L'antibiogramme, principes, méthodologie, interêt et limites. Journées Nationales GTV- INRA, 5-12.

Haubruge E., Shiffers B., Gabriel E., Verbstraeten (1988). Etude de la relation dose-efficacité de six insecticides à l'égard de *Sitophilus granarius* L., *S. oryzae* L., et *S. zeamais* Mots. (Col., curculionidae). Medicine Faculty *Landbouww Ryksuniv* (Gent) .53/2b: 719-26. 62.

Hellal, Z. (2011). Contribution a l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. application sur la Sardine (*Sardina pilchardus*). Memoire de magister en biologie, Departement des sciences biologiques, Universite Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou : 120 p

H. Tapiero, K.D. Tew, B.G. Nguyen, G. Mathé, (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. Biomed Pharmacother 56, 200-207.

Hami H., Soulaymani A., Skalli S., Mokhtari A., Sefiani H. and Soulaymani R., (2011). Poisoning by Atractylis gummifera L. Morocco poison control center data. Bultin de la société de Pathologie Exotique. 104 (1) : 53-57.

Hellali N., Mahammed M.H., Ramdane F., Talli A. (2016). Antimicrobial and antioxidant activities of *Cybopogon schoenanthus* (L.) spreng essential oil, growing in Illizi – Algeria. Journal of medicinal plant research.10:188-194.

Herzi N., 2013. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de L'extraction au CO2-supercritique et destechniques conventionnelles. Universitéde Toulouse Spécialité : Génie des procèdes et de l'environnement .185pp

.Iserin P, Masson M, Restellini J.P, Ybert E et Moulard F. (1996). Encyclopédie des plantes médicinales ; Identifications, Préparations, Soins. Ed : Larousse-Bordas pour l'édition originale en langue française, France. 335 p. J. Bruneton, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3e édition revue, Paris, 1999.

Isman M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection. 19: 603- 608.

Joulain D. (1994). Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture : use and abuse. Perfumer & Flavorist. 19:5-17.

Kalemba D., Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr.Med. Chem. 10: 813-829.

Kanko C, El Hadj Swaliho B, Kone S, Koukoua G et N'Guessan Y T. (2004). Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus, Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. Comptes Rendus Chimie. V. 7: 1039–1042.

Karousou R, Koureas D N and Kokkini S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: Coridothymus capitatus and Satureja thymbra in NATURA 2000 sites of Crete. Phytochemistry. V.66: 2668-2673.

Keita R.M. (2002). Etude de l'activité antifongique et antibactérienne de 14 plantes utilisées dans le traitement des I.S.T. Thèse de pharmacie, Bamako.130. Kew Gardens check-list consultable en ligne. http://www.kew.org/science-researchdata/directory/teams/myrtaceae/

Kimball D.A., (1999). Citrus processing: A complete guide, 2nd edition, Aspen Publication INC., Maryland, 435P

Koba K, Sanda K, Raynaud C, Nenonene Y A, Millet J et Chaumont J P. (2004). Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois Cymbopogon sp. africains vis-àvis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. Annales de Médecine Vétérinaire. V.148: 202–206.

Koedam A. (1987). Some aspects of essential oils preparation in capillary gas chromatography in essential oils analysis. Ed. P. Sandra, C. Bicchi. Herdelberg. New York

Kumar S. and Pandey A.K. 2013. Chemistry and biological activities of Flavonoids: An overview. The Scientific World Journal.1-16

Laib, I. (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : Application aux moisissures des légumes secs. Nature & Technologie : 52 p..

LBravo, (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews 56 (11), 317-33.

Lichtenstein E.P. (1966). Insecticides occuring naturally in crops Advances. Chemistry Ser. 53: 34- 38.

Lucchesi E.M., (2005). Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes: Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat, Université de la Réunion. 143p.

Lewis K., Ausubel F.M. 2006. Prospects for plant derived antibacterials. National Biotechnology. 24:1504-1507.

Mariani, C.E., & LIPINSKY, S.B. (1981). Tropical eucalyptus, p. 373_386. in McClure, T.A. and LipinskyJ E.S. (ed.). CRC Handbook of biosolar resources, vol. II. Resource materials. CRC Press. Inc.. Boca Raton. FL

Marque, G. (2008). Isolement et caractérisation chez Eucalyptus de gènes codantles facteurs de transcription CBF impliqués dans la réponse au froid, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier.

Marrouf, G. Tremblin, Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences 2009.

Moderres, F.et aichouni, C. (2018). etude de la composition chimique des huiles essentielles de Mentha rotundifolia L. récoltée dans deux régions mekhatria et bathia. Memoire de mater, département des sciences agronomiques, Djilali Bounama, Khmis Miliana : 29 p.

Mayer, F. (2012). Utilisations therapeutiques des huiles essentielles : etude de cas en maison de retraite. These de docteur en pharmacie, departement de pharmacie, Universite de Lorraine : 92 p

Meheni M. (2015). Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camaldulensis dans la région de Ouargla. Thése de doctorat. Université Kasdi Merbah Ourgla. 175p.

Meyer-Warnod B., (1984). Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. Perfumer and Flavorist, vol.9, p.93-103.

Möller K., 2008. La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Ed. UNICO, Paris. a review. Int. J. Food Microbiol. 94: 223–253.

Multon J.L. (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés: Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique & Documentation, Paris Apria. Volume 1, 576p.

Newman D. J. and Cragg G. M., (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, Journal of Natural Products, 70 (3): 461-77.

Ndlovu G., Fouche G., Tselanyane M., Cordier W. and Steenkamp V., (2013). *In vitro* determination of the anti-aging potential of four southern African medicinal plants. BMC Complementary and Alternative Medicine.13(304):1-7.

Normes ISO 3657. (1977). Huiles essentielles-Nomenclature.

Ong, K.C., Khoo, H.E. (1997), Biological Effects of Myricetin. General Pharmacol. 29, p. 121-126

Pibiri M-C. (2006). assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au myen d'huiles essentielles, *Thèse de Doctorat de l'institut des infrastructures, des ressources et de l'environnement.* Ecole polytechnique fédérale de lausanne.

Pichersky E., Gershenzon J., (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. Current Opinion in Plant Biology 5,

237–243.

Pingot A. (1998). Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 230- 236.

Peralta M.A., Silva Da., Ortega M.G., Cabrera J.L., Paraje M.G. 2015.Antifungal activity of a prenylated flavonoid from Dalea elegans against *Candida albicans* biofilms. Phytomedicine. 22(11):975-980.

Poupon, H. (1972). Description des appareils aérien et souterrain;Eucalyptus camal organisation des nations unies pour ;alimentation et;agriculture ?1982. Les eucalyptus dans les reboisements. FAO, Italie

Pryor L D. (1982). les Eucalyptus dans les reboisements, collection FAO : Forets N11Rome. 691p.

Properzi A., Angelini P., Bertuzzi G., Venanzoni R., (2013). Some biological activities of essential oils.Medicinal and Aromatic Plants, 2: 136.

Raynaud, J. Prescription et conseil en aromathérapie Editions Lavoisier 2006.

Robert A et Lobstein A. (2005). Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.

Robert. A, Max. W :(2003) Plantes thérapeutiques (2ème édition). Lavoisier

Robert-Demuet S. (1995). Méthodes de dilutions. In Antibiotiques et antibiogrammes, 131-137. Montréal-Canada.

Rozzi N L, Phippen W, Simon J E and Singh R K. (2002). Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemon-scented botanicals. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie. V.35:319-324.

Ruberto G and Baratta M T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry.V. 69(2): 167–174.

Rudramurthy G.R., Swamy M.K., Sinniah U.R., Ghasemzadeh A. (2016). Nanoparticles: alternatives against drug-resistant pathogenic microbes. Molecules.21:7-8.

Schuhmacher A et Reichling P. (2003). Virucidal effect of Peppermint oil on the enveloped *viruses Herpes Simplex* Virus type 1 and type 2 *in vitro. Phytomedicine*, 10(6-7), 504-510.

Shellie R, Marriott P, Chaintreau A. (2004). Quantification of suspected allergens in ragrances : evaluation of comprehensive two- dimensional GC for quality control. Flavour and Fragrance Journal-Wiley online Library. V19 : 91-8.

Sherwin E.R. (1976). Antioxidants for vegetable oils. Journal of American Oil Chemical Society. 53:430-436.

Singh A K. (1994). Chemical composition of the leaf oil of *Eucalyptus radiata* Sieb, ex DC subsp. *robertsonii* (*Blakely*) L. Johnson et *D. Blaxell* : A Rich Source Eucalyptus Oil of Pharmacopoeia Grade. Journal of Essential Oil Research. V.6 (6): 657-659.

Spinola M. (2016). Prise en charge de l'arthrose par les thérapeutiques alternatives et/ou complémentaires à l'allopathie (homéopathie – phytothérapie – aromathérapie – compléments alimentaires).Thèse Présentée à la Faculté de Pharmacie de Dijon pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Université de Bourgogne UFR des Sciences de Santé Circonscription Pharmacie.

Svoboda. K, P and Hampson. J, B (1999): Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants. Antibacterial. Antioxidant. Anti inflammatory and other related pharmacological activities.

Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O., (2010). Antimicrobial herb and spice compound in food. Food Control 21, 1199–1218.

Taleb-Toudert K. (2015). Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets

sur la bruche du niébé Callosobruchus maculatus (Coleoptera : Bruchidae). Thése de Doctorat. Université de Tizi-Ouzou. 160p.

Tripathi A.K., Prajapati V., Aggarwal K.K. and Kumar S. (2001) Toxicity, feeding deterrence, an ffect of activity of 1,8,-Cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology 94:979-983.

Vermeriss W., Nicholson R. (2006). Phenolic Compound Biochemistry. Springer, New York, NY, p

Unsicker S.B., Kunert G., Gershenzon J., (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. Current opinion in Plant Biology 12, 479–485.

Willem J-P. (2006). *Les Huiles Essentielles : Médecine d'Avenir*. Editions du Dauphin.

Yoon H.S., Moon S.C., Kim N.D., Park B.S., Jeong M.H., and Yoo Y.H. 2000. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. Biochemical and Biophysical Research Communications. 276(1):151-156.