

*République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*

*Université A. Mira de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique*

Mémoire
Pour l'Obtention du Diplôme de Magister
En biologie

Option
Biochimie Appliquée aux Substances Végétales Bioactives

Thème

**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante et
antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula
viscosa* L., *Salvia officinalis* L. et *Laurus nobilis* L.**

Présenté par :

M^{elle} : KHEYAR Nawel

Devant le jury :

M^{me} Benabdesselam F.

Maître de conférences (UAMB), Présidente.

M^r Belhamel K.

Maître de conférences (UAMB), Rapporteur.

M^{me} Bedjou F.

Maître de conférences (UAMB), Examinatrice.

M^{me} Zebboudj A.

Maître de conférences (UAMB), Examinatrice.

M^{elle} Ait Mohamed O.

Maître Assistante (UAMB), Membre invité.

Année 2008/2009

❧ Remerciements ❧

❧ Je tiens à exprimer ma gratitude envers tous ceux qui m'ont aidé et soutenu tout au long de la réalisation de ce travail

❧ Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur, Docteur Belhamel K, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et permis de réaliser ce mémoire. Son dynamisme pour la recherche des produits naturels a été pour moi une source de motivation. Je tiens également à le remercier pour m'avoir permis de présenter quelques uns de mes résultats lors de siminaire de la SAC.

❧ Je tiens aussi à remercier les membres du jury pour l'honneur qui'ils nous ont accordé en jugeant ce travail, notamment :

❧ Madame le Docteur Benabdesselam F, qui ma fait l'honneur par sa présence en qualité de présidente de jury.

❧ Madame le Docteur Bedjou F, Madame le Docteur Zaboudj A et M^{elle} Ait Mohamed O pour avoir accepté d'examiner ce travail et ceux malgré leur emploi du temps chargé.

❧ Mes remerciements vont aussi au Docteur Kheyar H et Docteur Laalaoui qui nous ont fourni les produits de microbiologie et les disques d'antibiotiques utilisés dans nos tests.

❧ Comme je suis très reconnaissante à tous les enseignants Mr Chibane, Mr Atmani, Mr Madani, Mr Hammoum, Mr Iguerouada et Mme Bedjou, de m'avoir permis de travailler dans les laboratoires sur les quels ils sont responsable. Sans oublier les technicien (ne) s des laboratoires : Mme Youkñane K, Melle Akli N, Mr Amrouche F, Mme Kharbachi S et Mr Makhlouf.

❧ Mes remerciements particuliers sont adressés à Mr Kraouche L, Mr Belik J, Mr Ouchmoukhi S, Melle Chaher N et Melle Touati N, pour avoir soigneusement revu une version préliminaire de ce manuel en fournissant d'excellents commentaires et suggestions pour son amélioration.

❧ Merci à Mr Abderrahim A pour son aide dans les analyses de la CPG.

❧ Toutes mes salutations à tous mes collègues de la post de graduation.

❧ Je n'oublierais pas non plus de remercier tous les membres de ma famille qui m'ont aidé chacun à sa manière.

❧ Dédicace ❧

Je dédie ce mémoire :

❧ *A mes très chers parents pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements. Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.*

❧ *A mon très cher fiancé Lyes qui s'est montré très compréhensif, et m'a beaucoup encouragé et soutenue durant toutes les épisodes difficiles que j'ai connus pendant la réalisation de ce travail. Ce travail n'aurait pas eu la même saveur sans lui.*

❧ *A mes très chers frères et soeurs : Toufik, Ziad, Sihem, Lamia, Nadjet.*

❧ *A mes amies et amis.*

❧ *Que ce travail soit une part de ma reconnaissance envers eux,*

Nawel 

Liste des abréviations

Abs: Absorbance.

ABTS: 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid).

ADH: Arginine dihydrolase.

AH: Antioxydant.

AND: Acide désoxyribonucléique.

ATP: Adénosine Triphosphate.

BHA: Butylhydroxyanisole.

BHT: Butylhydroxytolène.

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DO : Densité optique.

DPPH: Diphenylpicrylhydrazyl.

E. coli: *Esherichia coli*.

GC-MS: Gaz chromatography Mass Spectrophotométry.

HPLC: High Pression Liquid Chromatography.

I. viscosa: *Inula viscosa*.

K. pneumonia: *Klebsiella pneumoniae*.

KD: Kilo Dalton.

L. innocua: *Listeria innocua*.

L.nobilis: *Laurus nobilis*.

L: Linné.

LDC: Lysine décaroxylase.

ODC: Ornithine décarboxylase.

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*.

ROS: Reactive oxygen Species.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

S.officinalis : *Salvia officinalis*.

UFC : unité formant co

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Photo d' <i>Inula viscosa</i> L.	4
2	Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les feuilles d' <i>Inula viscosa</i> L.	6
3	Photo de <i>Salvia officinalis</i> L.	8
4	Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les feuilles de <i>Salvia officinalis</i> L.	10
5	Photo de <i>Laurus nobilis</i> L.	11
6	Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les feuilles de <i>Laurus nobilis</i> L.	13
7	Structures chimiques de quelques composés des huiles essentielles	16
8	Cibles d'action des antibiotiques	22
9	Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles	24
10	Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigue ou chronique des ERO/ERN	25
11	Origines et cibles des principaux dérivés réactifs de l'oxygène	27
12	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	30
13	Photographie des plantes étudiées, A : <i>Inula viscosa</i> , B : <i>Salvia officinalis</i> L.C : <i>Laurus nobilis</i> L.	33
14	Dispositif d'hydrodistillation	34
15	Teneur en humidité des trois plantes médicinales	43
16	Rendement en huiles essentielles de différentes plantes	44
17	Chromatogramme de l'huile essentielle de l'inule visqueuse (complet)	46
18	Chromatogramme de l'huile essentielle de l'inule visqueuse (partiel)	46
19	Mécanisme de réduction du radical DPPH par un antioxydant	47
20	Effet scavenger contre le radical DPPH des huiles essentielles à différentes concentrations	48
21	Effet scavenger contre le radical DPPH des standards à différentes concentrations	48
22	Formation et piégeage du radical ABTS ^{•+} par un antioxydant donneur de H.	51
23	L'effet scavenger contre le radical ABTS des huiles essentielles à 100 µl/ml en fonction du temps	52
24	Structure chimique des antioxydants de synthèse	53
25	L'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène des huiles essentielles à différentes concentrations	55

Suite :

26	L'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène des antioxydants de synthèse à différentes concentrations	55
27	Pouvoir réducteur des huiles essentielles	58
28	Pouvoir réducteur des antioxydants de synthèse à différentes concentrations	58
29	Corrélation entre les différents tests de l'activité antioxydante des huiles essentielles	62
30	Activité des huiles essentielles sur <i>E.coli</i> .	67
31	Activité des huiles essentielles sur <i>K .pneumoniae</i>	68
32	Activité des huiles essentielles sur <i>L.innocua</i>	69
33	Activité des huiles essentielles sur <i>S.aureus</i>	70
34	Activité des huiles essentielles sur <i>P.aeruginosa</i>	71

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
I	Quelques usages traditionnels d' <i>Inula viscosa</i> L.	5
II	Quelques usages traditionnels de <i>Salvia officinalis</i> L.	9
III	Quelques usages traditionnels de <i>Laurus nobilis</i> L.	12
IV	Caractéristiques générales des plantes utilisées.	33
V	Liste des Antibiotiques et des valeurs de références	40
VI	Caractères organoliptiques des huiles essentielles	43
VII	Composition chimique de l'huile essentielle de l' <i>Inula viscosa</i> L.	45
VIII	IC ₅₀ des huiles essentielles et des standards contre le DPPH	50
IX	Activité antiradicalaire des huiles essentielle à une concentration de 100µl/m	53
X	IC50 des huiles essentielles et des standards contre H ₂ O ₂	57
XI	IC50 des huiles essentielles et des standards pour le pouvoir réducteur	59
XII	Caractérisation biochimique des souches bactériennes	64
XIII	Résultats de l'antibiogramme (diamètre de la zone d'inhibition en mm).	65
XIV	Activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>I. viscosa</i> , <i>S.officinalis</i> et <i>L .nobilis</i>	66

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I-1- Les plantes médicinales	3
I-1-1- Phytothérapie	3
I-1-2- Inule visqueuse (<i>Inula viscosa</i> L)	3
I-1-2-1- Description botanique.....	3
I-1-2-1-1- Famille des Astéracées	3
I-1-2-1-2- Espèce <i>Inula viscosa</i> L.....	4
I-1-2-2- Usage traditionnel de l' <i>Inula viscosa</i> L.....	5
I-1-3- Sauge officinale (<i>Salvia officinalis</i> L)	7
I-1-3-1- Description botanique.....	7
I-1-3-1-1- Famille des Lamiacées.....	7
I-1-3-1-2- Espèce <i>Salvia officinalis</i> L	7
I-1-3-2- Usage traditionnel de <i>Salvia officinalis</i> L.....	8
I-1-4- Laurier (<i>Laurus nobilis</i> L)	11
I-1-4-1-Description Botanique	11
I-1-4-1-1-Famille des Lauracées	11
I-1-4-1-2 Espèce <i>Laurus nobilis</i> L	11
I-1-4-2- Usage traditionnel de <i>Laurus nobilis</i> L	12
I-2- Les huiles essentielles	14
I-2-1- Définition	14
I-2-2- Propriétés physiques des huiles essentielles	14
I-2-3- Composition chimique des huiles essentielles.....	15
I-2-3-1- Les composés terpéniques	15
I-2-3-2- Les dérivés du phénylpropane	15
I-2-4-Localisation et biosynthèse des huiles essentielles.....	17
I-2-5- Facteurs influençant la composition des huiles essentielles	17

I-2-6- Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	18
I-2-6-1- Entraînement à la vapeur	18
I-2-6-1-1- Hydrodistillation.....	18
I-2-6-1-2- Vapodistillation	18
I-2-6-1-3- Hydrodiffusion	19
I-2-6-2- Extraction par les solvants.....	19
I-2-6-3- Extraction par expression	19
I-2-6-3- Extraction par les fluides supercritiques.....	19
I-2-6-4- Extraction assistée par micro-ondes	19
I-2-7- Activités biologiques des huiles essentielles	20
I-2-6-Toxicité des huiles essentielles	20
I-3-Les agents antimicrobiens	21
I-3-1- Les antibiotiques	21
I-3-1-1- Mode d'action des antibiotiques.....	16
I-3-1-2- La résistance bactérienne aux antibiotiques	22
I-3-2- L'activité antibactérienne des huiles essentielles	22
I-3-2-1-Activité liée à la composition chimique	23
I-3-2-3- Mode d'action des huiles essentielles.....	23
I-3-2-4- Association des huiles essentielles	24
I-3-2-5- L'évaluation du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.....	24
I-4-Stress oxydatif et les antioxydants.....	25
I-4-1-Stress oxydatif.....	25
I-4-1-1- Définition.....	25
I-4-1-2-Origine du stress	25
I-4-1-3- Différentes formes de radicaux libres.....	26
I-4-1-4- Origine des radicaux libres	26
I-4-1-5- Stress oxydant et atteintes pathologiques	28
I-4-2- Antioxydants	29
I-4-2-1- Définition.....	29
I-4-2-2-Antioxydants endogènes.....	30
I-4-2-3-Antioxydants de synthèse	31
I-4-2-4-Antioxydants naturels	31

Chapitre II : Matériels et méthodes

II-1- Préparation du matériel végétal.....	33
II-1-1- Récolte du matériel végétal	33
II-1-2- Séchage et Broyage	33
II-2- Les huiles essentielles	34
II-2-1- Extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation	34
II-2-3- Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	35
II-4-Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire.....	36
II-4-1- Activité anti-radicalaire contre le radical DPPH	36
II-4-2- Détermination de la Capacité Antioxydante en Équivalent Trolox (TEAC).....	37
II-4-3- Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	37
II-4-4- Pouvoir réducteur	38
II-3- Détermination de l'activité antibactérienne.....	38
II-3-1- Les souches bactériennes utilisées.....	38
II-3-2-Tests de confirmation de l'identification de ces souches	39
II-3-3- Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques.....	39
II-3-4- Test du pouvoir antibactérien des huiles essentielles	40
II-5- Etude statistique	41

Chapitre III : Résultats et discussions

III-1- Extraction et analyse des huiles essentielles	42
III-1-1-Test d'humidité	43
III-1-2- Teneurs et caractérisations des huiles essentielles	43
III-1-3- Analyse chromatographique de l'huile essentielle d' <i>Inula viscosa</i> L. par la CPG.....	45

III- 2-L'activité antioxydante	47
III-2-1- L'activité antiradicalaire contre le radical DPPH	47
III-2-2- La Capacité Antioxydante en Équivalent Trolox	50
III- 2-3-Activité scavenger du H ₂ O ₂	54
III-2-4- Pouvoir réducteur	57
III- 2-5-Corrélation entre les tests utilisés.....	61
III-3- Activité antibactérienne	63
III-3-1- Confirmation des souches	63
III-3-2- Antibiogramme.....	64
III-3-4-Pouvoir antibactérien des huiles essentielles	65
III-3-4-1- Activité des huiles essentielles sur <i>Escherichia coli</i>	67
III-3-3-4- Activité des huiles essentielles sur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	68
III-3-3-4- Activité des huiles essentielles sur <i>Listeria innocua</i>	69
III-3-3-4- Activité des huiles essentielles sur <i>Staphylococcus aureus</i>	69
III-3-3-4- Activité des huiles essentielles sur <i>P.aeruginosa</i>	71
Conclusion	74
Références bibliographiques	76

Introduction

Introduction

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité des produits chimiques utilisés en médecine ou dans l'industrie alimentaire. En effet, la peroxydation des lipides produite au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments sous l'action des radicaux libres de l'oxygène (ROS) conduit à des modifications de goût, d'odeur et de la sécurité des aliments (Mau et *al.*, 2004). L'utilisation des molécules anti-oxydantes de synthèse étant actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels et sont suspectés d'avoir des effets négatifs sur la santé du consommateur (Avelssi et *al.*, 2004).

D'un autre côté, l'usage extensif des agents antibactériens chimiques dans la médication humaine conduit à la sélection des souches bactériennes résistantes (Yahya, 2003 ; Hamilton-Miller et *al.*, 2004).

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes d'oxydation et de la résistance bactérienne. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à caractère antioxydant et antibactérien, si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ces derniers, représentés actuellement par 100.000 substances identifiées, appartiennent à trois classes principales (Cowan, 1999) :

- Les terpènes.
- Les composés phénoliques.
- Les alcaloïdes.

Pour cet intérêt, des substances naturelles bioactives, les huiles essentielles conservent une place de choix dans la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques, et capturent d'intérêt de plusieurs recherches vu le nombre de leurs propriétés biologiques indénombrables. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme alternative dans le traitement des maladies infectieuses et dans diverses pathologies associées au stress oxydant telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires ou maladies inflammatoires.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des molécules d'origines végétales jouissantes d'activités biologiques notamment les activités antibactériennes et antioxydantes. Dans le but de poursuivre ces activités, une étude phytochimique est faite sur trois plantes médicinales de la région locale à savoir: *Inula viscosa* L., *Salvia officinalis* L. et *Laurus nobilis* L.

Notre objectif est l'établissement des bases scientifiques de cette médication pour justifier leur usage en médecine traditionnelle. Les principales parties de ce travail sont traitées selon le plan suivant :

➤ La première partie est consacrée à l'étude bibliographique, relative aux plantes étudiées, aux huiles essentielles et leurs propriétés biologiques.

➤ La deuxième partie concerne l'étude expérimentale, qui porte sur la préparation des échantillons de plantes, leur étude photochimique en terme des huiles essentielles, suivi par l'analyse chromatographique en phase gazeuse pour l'huile d'*Inula viscosa* L, d'évaluer leurs activités anti-oxydantes (activité anti-radicalaire contre le radical DPPH et ABTS^{•+}, pouvoir réducteur et l'inhibition du peroxyde d'hydrogène), et de tester l'activité antibactérienne vis-à-vis de quelques souches de références et multirésistantes.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I-1- Plantes médicinales

I-1-1- Phytothérapie

La phytothérapie est une discipline allopathique, destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes (feuilles, fleurs, racines, fruits et graines) ou de préparations à base de plantes (Wichtl et Anton, 2003). Le recours à cette médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité. Non seulement les populations des pays en développement y ont accès mais aussi ceux des pays où la bio-médecine occupe une grande place dans les systèmes de santé. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% de la population mondiale compte toujours sur l'utilisation des plantes médicinales comme un premier traitement (Khalil et *al.*, 2007). Cependant, il est nécessaire aujourd'hui, de valider l'usage traditionnel de ces plantes. En d'autres termes, il convient d'évaluer scientifiquement leurs activités pharmacologiques retenues.

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore Paléo Tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartiennent à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques (Gaussen et *al.*, 1982). Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Parmi celles-ci, *Inula viscosa* L., *Salvia officinalis* L. et *Laurus nobilis* L., sujet de ce présent travail, sont trois plantes médicinales utilisées par les populations locales comme remède traditionnel pour le traitement de certaines pathologies, et comme des épices en alimentation.

I-1-2- Inule visqueuse (*Inula viscosa* L.)

I-1-2-1- Description botanique

I-1-2-1-1- Famille des Astéracées

La famille des Astéracées ou Composées est une importante famille de plantes dicotylédones qui comprend près de 25 000 espèces réparties en 1 500 genres (Bohur et Stuessy, 2001). Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille. C'est une famille répandue dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées (Guignard, 2001). Les plantes de cette famille sont très riches en sesquiterpènes notamment les lactones sesquiterpéniques (Rozerblat et *al.*, 2008).

I-1-2-1-2- Espèce *Inula viscosa* L.

Inula viscosa L. (figure 01) Aiton (syn. : *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter), appartenant à la famille des Astéracées (Levizou et *al.*, 2000; Hemández et *al.*, 2007), est un sous arbrisseau vivace de 40 à 100 cm de haut à tiges dressées, frutescentes à la base, et très feuillées. Ses feuilles sont petites vertes lancéolées, simples et alternes, dentelées et visqueuses (Baba Aissa, 1991). Ses fleurs sont jaunes rayonnantes, en capitules assez gros en longues grappes pyramidales (Mànez et *al.*, 1999). La floraison a lieu entre la fin du mois d'août et le mois de novembre. Ses fruits sont des akènes velus ; rétrécis en col au sommet (Baba Aissa, 2000).

- Noms vernaculaires

Français : Inule visqueuse (Baba Aissa, 2000).

Anglais : Stichky fleabane (Wang et *al.*, 2004)

Berbère : Amagramane (Baba Aissa, 2000).

-Place dans la systématique

La classification botanique de l'espèce *Inula viscosa* L. selon Guignard. (2001) est :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphyte

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Astérides

Ordre : Astérales

Famille : Astéracées, composées

Genre : *Inula*

Espèce : *Inula viscosa* L.



Figure 01 : Photo d'*Inula viscosa* L.

-Distribution

L'inule visqueuse est originaire du bassin méditerranéen, elle est distribuée largement dans le sud d'Espagne, le nord de l'Afrique et le moyen orient (Maoz et *al.*, 2000 ; Wang et *al.*, 2004 ; Stavrianakou et *al.*, 2006). Cette espèce pousse sur les lieux incultes et rocaillieux dans des sols secs et calcaires (Hernandez et *al.*, 2001).

I-1-2-2- Usage traditionnel de l'*Inula viscosa* L.

Son histoire thérapeutique est très diversifié et connu depuis longtemps dans les médications traditionnelles. Elle est utilisée pour ses activités (tableau I): anti-inflammatoire, antipyrétique, antiseptique, antiphlogistique et dans le traitement du diabète (Ali-Shtayeh et *al.*, 1998 ; Maoz et *al.*, 1999 ; Rozenblat et *al.*, 2008). En Algérie, l'inule visqueuse jouit d'une grande popularité, où elle est utilisée sous forme du suc de feuilles fraîches pour arrêter les hémorragies, prévenir les inflammations et activer les cicatritions (Baba Aissa, 2000).

Tableau I : Quelques usages traditionnels de l'*Inula viscosa* L.

Pays	Parties utilisées	Voie	Usage	Références
Palestine	Plante entière	Externe	Antispasmodique, sédative, antiseptique, Antirhumatismale, Blessures curatives, contre les maux de têtes, traitements des hémorroïdes.	Ali-Shtayeh et <i>al.</i> , 2000
		Interne	Antispasmodique, anti-diabétique, anti-helminthique, diurétique.	
Jordan	Feuilles	Orale	Abortive, anti-fertilité.	Al-Dissi et <i>al.</i> , 2001
	Parties aériennes	Injection	Anti-inflammatoire, antiulcérogénique	Alkofahi et Atta, 1999.
Israël	Partie aérienne		Anti-inflammatoire	Alkofahi et Atta, 1999
Espagne	Parties aériennes, Fleurs	Injection péritonéal	Anti-inflammatoire, Anti-septique	Hernandez et <i>al.</i> 2005 ; Hernández et <i>al.</i> , 2007.
	Feuilles	Infusion	Anti-inflammatoire, antilithique rénal, diurétique. Antihypertensif.	Fresquet et <i>al.</i> , 1993
		Cataplasme de feuilles fraîches.	Topique : Hémostatique. Antiseptique, analgésique, Antirhumatismal.	
Algérie	Feuilles	Cataplasme	Céphalées, les douleurs rhumatismales. Cicatrision, antihémorragiques	Baba Aissa, 2000
	Plante entière	Orale	Hypoglycémiant, affection des voies urinaires. Analgésique, antiseptique, diurétique, hémostatique, vermifuge	
France	Racines	Orale	Expectorant, tonique (estomac), vermifuge, tuberculose, antiseptique	Iserin, 2001
Maroc	Feuilles	Orale	Anti-diabétique, Hypoglycémiant, tuberculose, affections pulmonaires	Zeggwagh et <i>al.</i> , 2006 ;Sqalli et <i>al.</i> ,2007

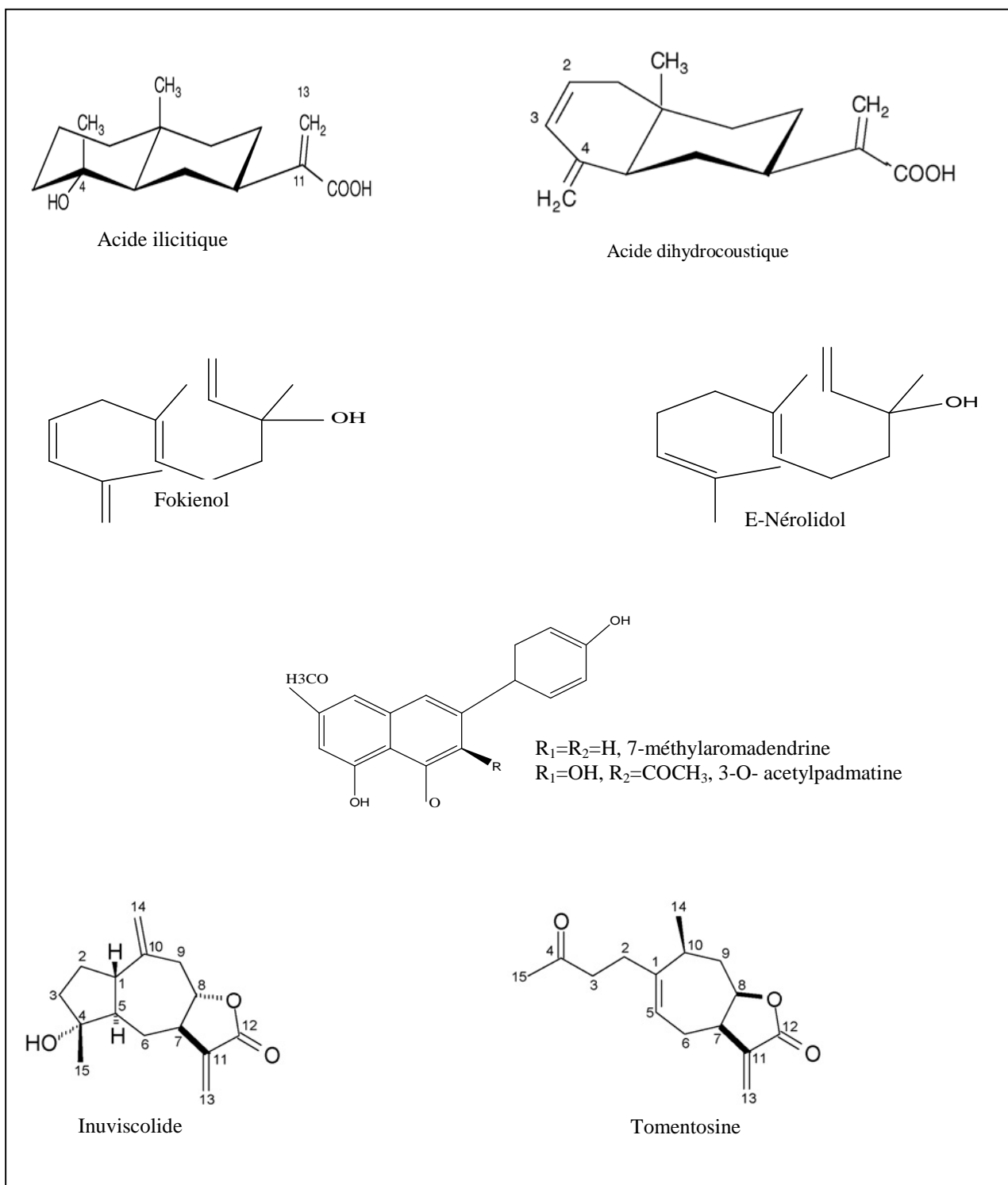


Figure 02 : Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les feuilles *d'Inula viscosa* L.
 (Robertet, 2000 ; Hernández et al., 2007 ; Máñez et al., 2007; Rozenblat et al., 2008).

I-1-3- Sauge officinale (*Salvia officinalis* L.)

I-1-3-1-Description Botanique

I-1-3-1-1-Famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées (labiées) comprend près de 200 genres et 4000 espèces, dont la plupart ont une importance économique due à leur production d'huiles essentielles. Des études biologiques d'huiles essentielles des espèces *Salvia spp* ont montré des activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires, en plus de leurs utilisations en cosmétique et agroalimentaire. Un très grand nombre de genres de la famille des Lamiaceae sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes et iridoïdes glycosylés (Tepe et al., 2006).

Le genre *Salvia* (sauge) contient près de 900 espèces majoritairement riches en diterpénoïdes (Hohmann et al., 2003 ; Kamatou et al., 2005 ; Rabbani et al., 2005).

I-1-3-1-2 Espèce *Salvia officinalis*

Salvia officinalis L. (figure 03) est un sous arbrisseau buissonnant 30 à 70 cm de haut, vivace très ramifié devenant ligneux à la partie basale et herbacée à l'extrémité (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001) dont les tiges forment des rameaux quadrangulaires dressés et velus (Witchl et Anon, 1999). Elle est caractérisée par des feuilles de 3-8 cm de haut persistantes, pétiolées, grandes et lancéolées de couleur gris-vert, épaisses et finement crénelées, couvertes de poils blancs (Mullot, 1984). Ses fleurs sont de couleur bleu violacé nuancé de rose, groupées en épis qui s'épanouissent au début de l'été (Bezanger-Beauquesne et al., 1999 ; Palese et Aexhmann, 1990), comportant un calice campanulé et bilabié, à 17 nervures (Bartels, 1997). L'androcée est réduit à deux étamines, son fruit est en forme de tétrakène ovoïde. La sauge dégage une forte odeur aromatique, balsamique (Bezanger-Beauquesne et al., 1999).

-Noms vernaculaires

Français : Grande sauge, thé d'Europe, thé de Provence, sauge commune, herbe sacrée.

Anglais : Sage, great sage, garden sage, common sage

Arabe : Souak en nebi, Kheya ledjrouh, salma, naama (Baba-Aissa, 2000).

Berbère: Agourim imksaouen, tazourt (Beloued, 2001).

-Place dans la systématique

La classification botanique de l'espèce *Salvia officinalis* L. selon Gaussen et al. (1982) est :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphyte

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Astéridées

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées, Labiées

Genre : *Salvia*

Espèce : *Salvia officinalis* L.



Figure 03 : Photo de *Salvia officinalis* L.

- Distribution

La sauge officinale, d'origine méditerranéenne, est très abondante dans les montagnes dalmates et macédoniennes (Ciano, 1993). Elle pousse sur les terres chaudes des collines rocailleuses et calcaires, d'une façon spontanée sur des terres arides aux sols bien drainés des régions méridionales tempérées et ensoleillées, et elle résiste à la sécheresse (Haloran, 2001).

En Provence, il est possible de récolter la sauge toute l'année, elle est souvent cultivée dans les jardins comme une plante médicinale et condimentaire (Ciano, 1993 ; Baba-Aissa, 2000 ; Avato et al., 2005).

I-1-3-2- Usage traditionnelle de *Salvia officinalis* L.

Le nom scientifique de la sauge indique clairement l'importance de son rôle en phytothérapie : *Salvia* vient de *salvare* qui, en latin, signifie «guérir» (Iserin, 2001).

La médecine traditionnelle a attribué de nombreuses thérapeutiques à la sauge, en raison de son apport élevé en polyphénols qui contribuent à ses activités biologiques (Vukovic'- Gacic et al., 2006), mais aussi les terpénoides dont les huiles essentielles sont utilisés pour traiter plusieurs maladies (tableau II) (Pinto et al., 2007). Les feuilles de la sauge sont communément très connues, comme herbes condimentaires, mais aussi, elles possèdent de nombreuses propriétés très exploitées en médecine (Hohmann et al., 2003 ; Ninomiya et al., 2004 ; Eidi et al., 2005).

Tableau II: Quelques usages traditionnels du *salvia officinalis* L.

Pays	Parties utilisées	Modes	Usage	Références
Newcastle	Feuilles	Infusion	Traitement de la maladie d'Alzheimer	Kennedy <i>et al.</i> , 2006; Andrew <i>et al.</i> , 2008
Finlande	Parties aériennes	<i>In vitro</i>	Anti-tumorale, anti-coagulant.	Ollanketo <i>et al.</i> , 2002 ; Bailly <i>et al.</i> , 2005
Portugal	Parties aériennes	Infusion	Traitement des nécroses hépatiques	Lima <i>et al.</i> , 2005
	Feuilles		Anti-inflammatoire, anti-hyperlipidémique, hépatoprotective	Santos-Gomes <i>et al.</i> , 2003
Afrique du sud	Parties aériennes		Inflammation de la cavité tractus digestif et, intestinal, les gastrites	Capek <i>et al.</i> , 2004 ; Kamatou <i>et al.</i> , 2005
Tunisie	Parties aériennes	Décoction	antiseptique, antispasmodique, calmante, céphalique, digestive, fébrifuge	Fellah <i>et al.</i> , 2006
Iran	Feuilles	Orale	tonique, carminative, antispasmodique, antiseptique, hypoglycémique. Régularise le cycle menstruel, efficace contre les bouffées de chaleur	Iserin, 2001
Portugal	Feuilles	Infusion	Anti-inflammatoire, effets hépatoprotective	Lima <i>et al.</i> , 2005
U.A.E	Parties aériennes	Infusion	Hypoglycémiant, antiseptique,	Amin et Hamza, 2005
Allemagne	Feuilles	<i>In vitro</i>	Antivirale	Schnitzle <i>et al.</i> , 2008

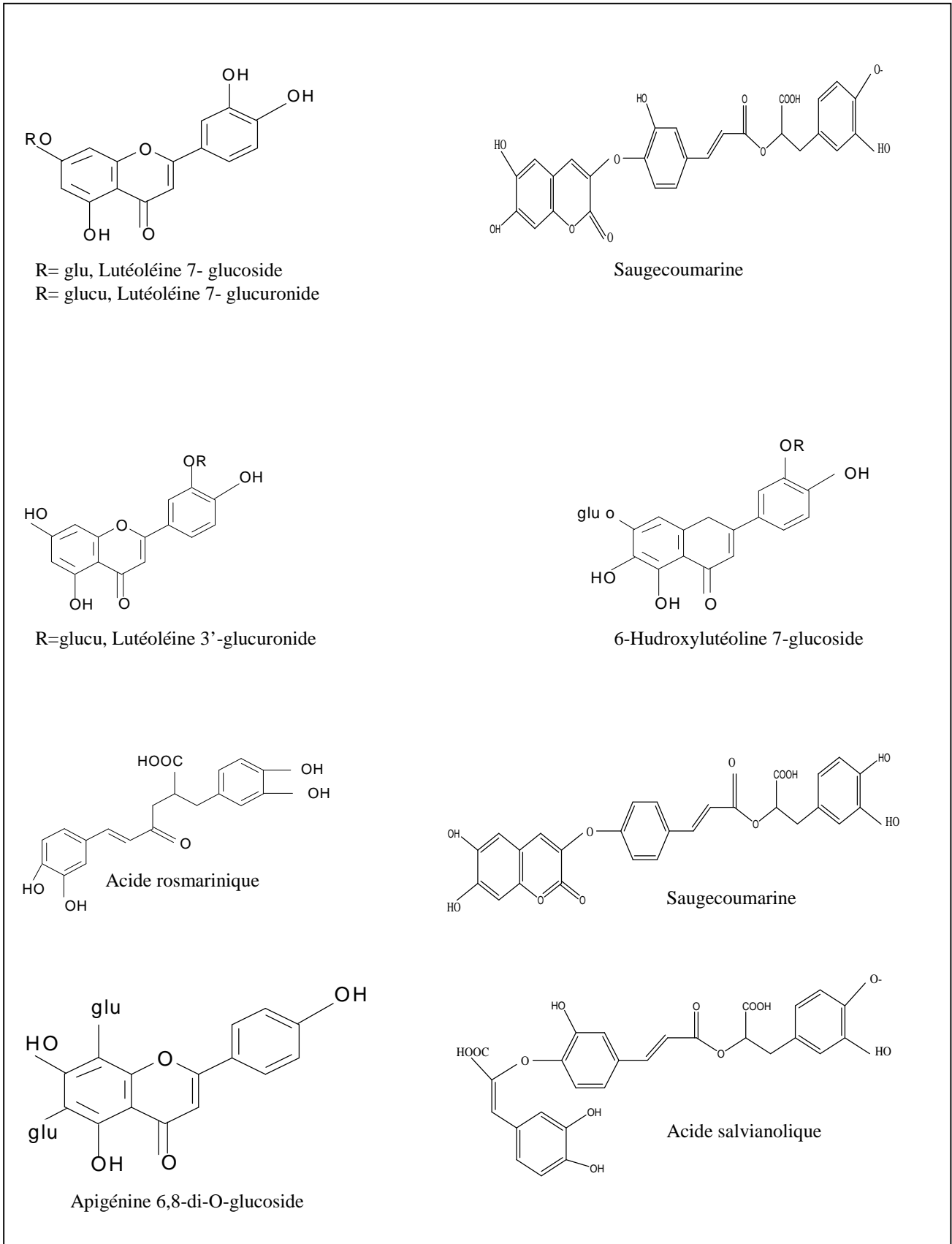


Figure 04 : Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les feuilles de *Salvia officinalis* L.

(Lu et Foo, 2002 ; Bors et al., 2003 ; Lin et al., 2006).

I-1-4- Laurier (*Laurus nobilis* L.)

I-1-4-1-Description Botanique

I-1-4-1-1-Famille des Lauracées

La famille des Lauracées comprend près de 3000 espèces regroupées en environ 52 genres. Cette famille est plus ou moins cosmopolite, avec une forte concentration dans les zones subtropicales et dans les régions tempérées (Takaku et *al.*, 2007)

I-1-4-1-2 Espèce *Laurus nobilis* L.

Laurus nobilis L. est un arbre pouvant atteindre 15m de hauteur mais généralement tallé en arbrisseau pour en faciliter la récolte, à écorce lisse et noire et au feuillage persistant (Baba Aissa, 1991). Les feuilles sont alternes, allongées, d'environ 10cm de long 3 à 5cm de large ; elles se terminent en pointe des deux côtés et sont courtement pétiolées ; leur limbe est coriace, glabre, souvent légèrement ondulé et épaissi sur les bords recourbés vers l'intérieur, d'un vert foncé et luisant à leur partie extérieure (Anton et Lobstein, 2005).

- Noms vernaculaires

Français : Laurier commun, laurier sauce, laurier d'apollon laurier franc, laurier noble (Barla et *al.*, 2007).

Anglais : Bay, lorbeebaum, Gewurzlorbee (Anton et Lobstein, 2005).

Arabe : Rand (Baba-Aissa, 1991).

-Place dans la systématique

La classification botanique de l'espèce *Laurus nobilis* L. selon Guignard. (2001) est :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Laurales

Famille : Lauracées

Genre : *Laurus*

Espèce : *Laurus nobilis* L.



Figure 05 : Photo de *Laurus nobilis* L.

- Distribution

Le laurier noble est originaire du sud de l'Europe et d'Afrique du nord (Sayyah et al., 2002 ; Barla et al., 2007), bien que l'espèce se rencontre, aujourd'hui dans l'ensemble des pays méditerranéens (Garg et al., 1992 ; Anton et lobstein, 2005 ; Fang et al., 2005). Il exige un sol profond, humide et riche en humus. Elle est cultivée dans les clairières forestières et les jardins (Sassi, 2005).

I-1-4-1-3- Usage traditionnel de *Laurus nobilis* L.

Laurus nobilis est largement utilisée en cuisine et en médecine traditionnelle. La saveur aromatique des feuilles est à l'origine de leurs propriétés apéritives et digestives, en cas de perte d'appétit et de troubles digestifs (Aqili et Mayan, 1992 ; Elmastase et al., 2006). Le tableau III présente les multiples usages traditionnels de *Laurus nobilis* L. de part le monde.

Tableau III : Quelques usages traditionnels du *Laurus nobilis* L.

Pays	Partie utilisée	Mode	Usage	Références
Espagne	Feuilles	Décoction	Antirhumatismale, apéritif, digestif, hypoglycémiant	Fresquet et al., 1993
Pakistan	Feuilles	Décoction	Diurétique, antiseptique, traitement des troubles digestifs	Chaudhry et Tariq, 2006
Palestine	Feuilles		Anticancéreuse, antispasmodique	Kaileh et al., 2007
U.S.A	Feuilles		Antirhumatismale, carminatif, hypoglycémiant, traitements des bronchites aiguës et la migraine	Fang et al., 2005
	Feuilles, fleurs, fruits	<i>In vitro</i>	Antimutagène, anticancéreuse	Barla et al., 2007
Serbie	Feuilles	Infusion	Carminatif, expectorant, diurétique, antirhumatismale, emménagogue, Anticonvulsif et antiépileptique	Simic et al., 2003
Turquie	Feuilles	Infusion	Antirhumatismale, anti- hémorroïdes, diurétiques, flatulence, épigastrique	Kıvcak et Mert, 2002

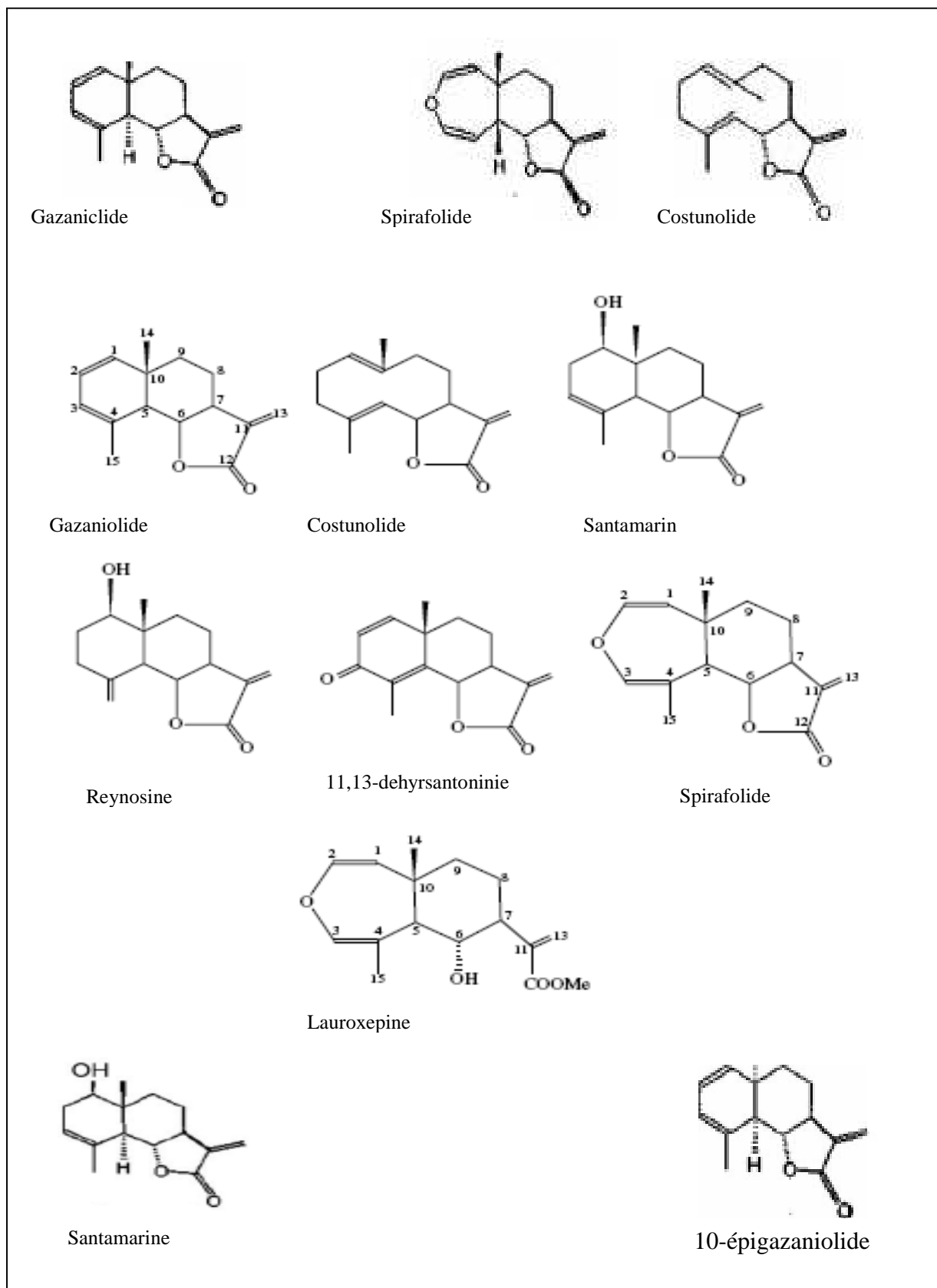


Figure 06 : Structures chimiques de quelques composés identifiés dans les feuilles de *Laurus nobilis* L. (Fang et al., 2005 ; Barla et al., 2007).

I -2- Huiles essentielles

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10 % seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique par l'intermédiaire de poils, poches ou canaux sécréteurs. Les genres capables d'élaborer les constituants des huiles essentielles sont répartis dans un nombre de familles limité ; Myrtacée, Lauracée, Rutacée, Lamiacée, Asteraceae, Cupressacée, Poacée, Zingiberacée et Piperacée (Bruneton, 1999).

I-2-1- Définition

Le terme huile souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances, tandis que le mot essentielle se comprend comme caractéristique principale de la plante (Bernard, 1988). Selon la définition de la norme française NF T 75-006 (AFNOR), l'huile essentielle est «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques» (Garnero, 1996).

I-2-2- Propriétés physiques des huiles essentielles

D'une façon générale, les caractéristiques physiques des huiles essentielles sont variables selon plusieurs facteurs (lieu de provenance, climat, le procédé d'extraction, etc...) (Valnet, 1984). Malgré leurs différentes compositions chimiques, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques (Paris et Hurabielle, 1981).

- Ce sont généralement des liquides à température ordinaire.
- Leurs volatilités les opposent aux « huiles fixes » ; à cette volatilité des huiles essentielles sont liés leurs caractères odorants et la possibilité de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau.
- Elles sont généralement incolores jaune pâle quand elles viennent d'être préparées.
- Leur densité, le plus souvent inférieur à celle de l'eau.
- Elles ont un indice de réfraction élevé et sont douées de pouvoir rotatoire.
- Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leur odeur ; elles sont solubles dans les alcools et les solvants organiques.
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation. Elles ont une tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux. Elles ont donc une conservation limitée (Paris et Hurabielle, 1981 ; Bruneton, 1987).

I-2-3- Composition chimique des huiles essentielles

Avec le développement des techniques analytiques comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), plusieurs études ont été investiguées pour déterminer la composition des huiles essentielles.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, peuvent comporter plus de soixante composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 85% de l'huile, tandis que d'autres composants sont présents seulement comme trace (Burt *et al.*, 2004 ; Bakkali *et al.*, 2008). Elles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants (figure 07) distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes, prépondérants dans la plupart des essences, et des dérivés du phénylpropane (Bruneton, 1987 ; Bakkali *et al.*, 2008).

I-2-3-1- Composés terpéniques

Les composés terpéniques (figure 07) sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités isopréniques C_5H_8 , il existe : les terpènes proprement dit ou monoterpènes en C_{10} , les sesquiterpènes en C_{15} , les diterpènes en C_{20} , les triterpènes en C_{30} , les tétraterpènes en C_{40} (Lamarti *et al.*, 1994, Johnston *et al.*, 2006).

I-2-3-2- Dérivés du phénylpropane

Les phénylpropanoïdes (figure 07) sont moins abondants que les terpénoïdes, ce sont des arènes issues d'une voie métabolique secondaire dite de l'acide shikimique lui-même intermédiaire de la synthèse de la lignine à partir du phénylpropane (Bruneton, 1999).

Les dérivés phénylpropanoïques et les terpénoïdes sont associés en nombre et en proportions très variables de telle sorte que le produit est hétérogène et complexe sur le plan chimique. Ils sont biosynthétisés au sein des mêmes organes sécréteurs où ils forment l'essence naturelle (Bruneton, 1999).

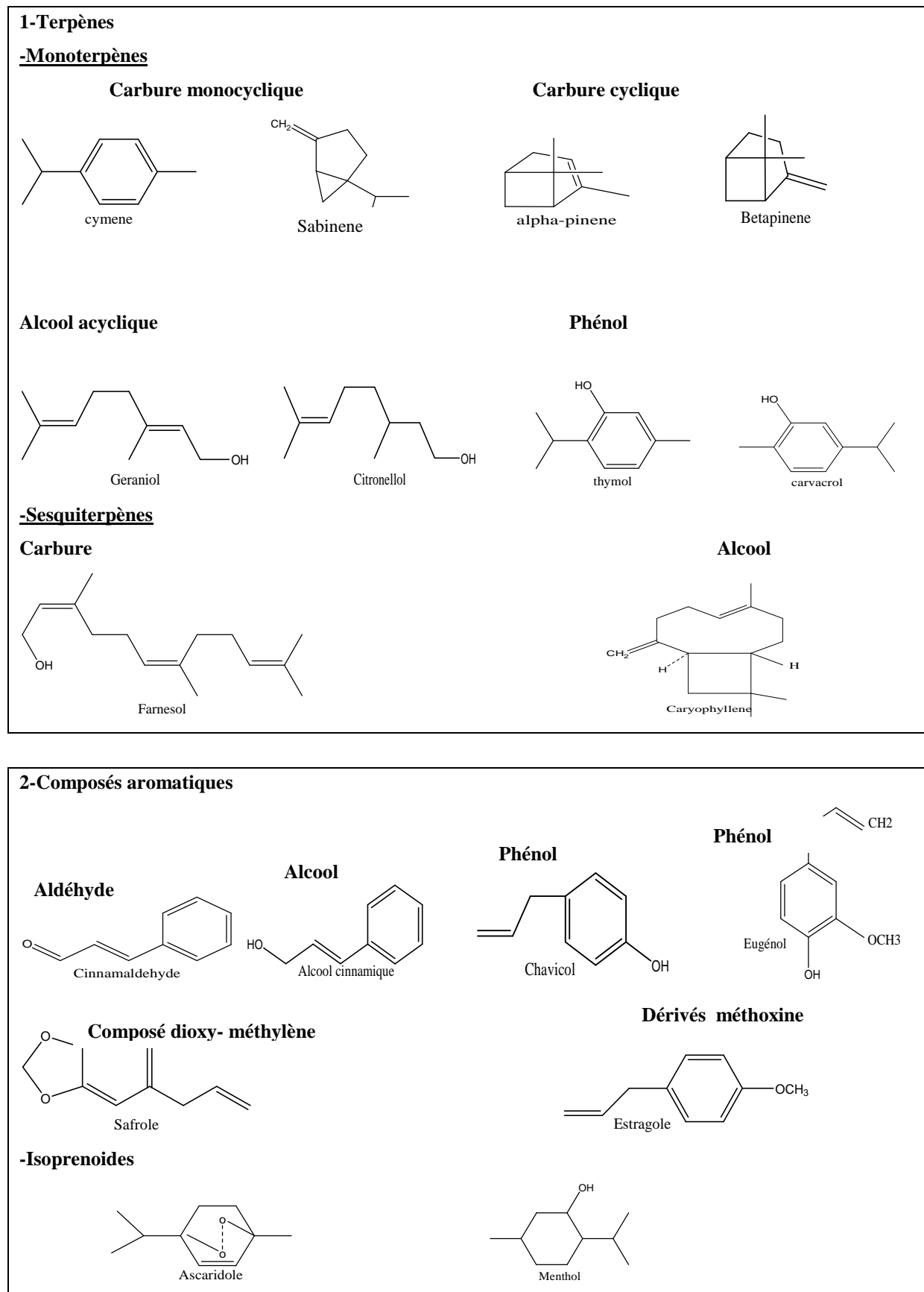


Figure 07 : Structures chimiques de quelques composés des huiles essentielles (Bakkali et al., 2008).

I-2-4-Localisation et biosynthèse des huiles essentielles

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux (feuilles, fleurs, écorces, racines, rhizomes, fruits et graines). La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence des structures histologiques spécialisées. Ces dernières sont souvent localisées sur ou approximativement à la surface de la plante : cellules à l'huile essentielles des Lauracées ou des Zingibéracées, poils sécréteurs des Lamiacées, des poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées, canaux sécréteurs des Apiacées ou des Astéracées (Bruneton, 1993 ; Teucher et *al.*, 2003).

I-2-5- Facteurs influençant la composition des huiles essentielles

La composition chimique et le rendement en huile essentielle varient suivant diverses conditions : l'environnement, l'origine géographique, la période de récolte et la méthode d'extraction (Bruneton, 1999 ; Duraffourd et Lapraz, 2002 ; Faleiro et *al.*, 2002 ; Teucher et *al.*, 2003, Belhamel et *al.*, 2008).

D'autres facteurs peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles comme :

- L'organe utilisé pendant l'hydrodistillation, nous savons que la teneur en huile essentielle de certaines espèces varie selon l'organe utilisé. Ce facteur dépend également de la nature des organes sécréteurs. Selon Ciccarelli et *al.* (2007), chez *Dittrichia viscosa* (*Inula viscosa* L.), les glandes sécrétrices sont très abondantes aux niveaux des feuilles que les fleurs, ce qui reflète un rendement optimum pour les feuilles par rapport à ces dernières.

- Au cours du cycle végétatif, un autre facteur intervient largement dans la variation de composition chimique de la même plante. Par exemple, chez la menthe, le néomenthol et la menthone sont prédominants au début de la période de floraison. Par la suite la concentration de ces deux substances diminue et le catabolisme de ces dérivés aboutit à l'accumulation de menthol et d'un composé non volatil, le glucose de néomenthyl (Bruneton, 1987).

- Pour une même espèce, de nombreux chimiotypes aux profils chimiques différents, peuvent exister (Teucher et *al.*, 2003). Chez le thym (*Thymus vulgaris* L.), il existe sept chimiotypes différents : six dans les zones arides ou garrigues du sud de la France (avec le thymol, carvacrol, géraniol, linalool, α -terpinol ou le trans-4-thujanol et le cis-8-myrcenol) un en Espagne (avec le cineol) (Bruneton, 1999).

I-2-6- Techniques d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont composées par des molécules aromatiques présentant une très grande diversité de structure. Cependant, ces huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses. Ainsi, les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisant une forte demande toujours plus exigeante (Lucchesi, 2006).

I-2-6-1- Entraînement à la vapeur

La distillation à la vapeur d'eau est une méthode ancienne et très répandue pour l'extraction des huiles essentielles à partir des plantes aromatiques. Elle est simple par son principe, et utilise un équipement peu coûteux. Mais cette méthode a plusieurs modes de réalisation ; parmi ces méthodes, la distillation à l'eau (hydrodistillation), la distillation à la vapeur directe (vapodistillation) et la distillation à l'eau et à la vapeur (vapo-hydrodistillation) (Benjillali, 2005).

I-2-6-1-1- Hydrodistillation

L'hydrodistillation proprement dite est la méthode standard pour l'extraction d'une huile essentielle. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Les principes volatils sont entraînés par les vapeurs d'eau et, après condensation du distillat, séparés par décantation (Bruneton, 1987 ; Lucchesi, 2006).

I-2-6-1-2- Vapodistillation

A la différence de l'hydrodistillation, la distillation à la vapeur saturée ou vapodistillation ne mettent pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. La vapeur d'eau traverse la matière végétale disposée dans des plaques perforées. 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 » (Koumaglo, 2005).

I-2-6-1-3- Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur. Dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. La composition des produits obtenus est qualitativement sensiblement différente de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. Le procédé permet un gain de temps et d'énergie (Bruneton, 1999).

I-2-6-2- Extraction par les solvants

Le matériel est chargé dans un extracteur spécialement construit contenant un solvant hautement purifié. Le solvant peut circuler à travers le matériel végétal pour extraire les constituants d'arôme ainsi que d'autres substances liposolubles. Le solvant est éliminé par évaporation et une huile concrète est obtenue (Belaiche, 1979 ; Bruneton, 1999).

I-2-6-3- Extraction par expression

C'est une méthode très simple, mais elle est employée que pour les *Citrus* (agrumes). Cette méthode consiste à pulvériser la matière végétale sous une forte pression pour pouvoir aisément extraire les jus des fruits d'une part, et d'essence d'autre part (Belaiche, 1979).

I-2-6-4- Extraction par les fluides supercritiques

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé, il s'agit de CO₂ supercritique. A l'état supercritique (à T= 31°C et P = 73bars), le CO₂ possède un bon pouvoir d'extraction. C'est pourquoi cette technique est recommandée pour l'extraction des essences naturelles, car elle permet de travailler à des températures basses afin de ne pas altérer l'huile essentielle. Les fluides supercritiques sont de bons solvants à l'état supercritique et de mauvais solvants à l'état gazeux (Fellah et *al.*, 2006 ; de Souza et *al.*, 2008).

I-2-6-5- Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une technique récente développée, dans le but de réduire le temps d'extraction, de diminuer la consommation de solvants, d'augmenter le rendement en extraction et d'améliorer la qualité des extraits. Le rayonnement micro-onde permet de chauffer l'eau présente naturellement dans le matériel végétal. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes sécrétrices, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile (Chemat et *al.*, 2006 ; Sahraoui et *al.*, 2008).

I-2-7- Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes grâce à leurs nombreuses applications thérapeutiques rapportées dans plusieurs travaux de recherches scientifiques (Valnet, 1984 ; Tisserand, 1988 ; Franchomme et Pénoel, 1990 ; Bruneton, 1999 ; Baudoux, 2000, Bakkali et *al.*, 2008). Ces essences sont utilisées comme les molécules premières dans beaucoup de domaines : la cosmétologie, la nutrition et l'aromathérapie (Lubinic, 2003), pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques ainsi que la protection contre les pathologies tumorales et cardiovasculaires (Liu, 1995 ; Ouraini et *al.*, 2005 ; Neffati et *al.*, 2009 ; Soultos et *al.*, 2009). Citant un exemple, les terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires. En 1977, il a été signalé que 60% des dérivées des huiles essentielles examinés jusqu'au 1999 sont inhibiteurs de mycètes, tandis que 30% inhibent les bactéries. Le triterpène, l'acide betulinique est l'un de plusieurs terpènes qu'a montré une action inhibitrice envers HIV. Le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais il pourrait être du à la rupture de la membrane par les composés lipophiles (Cowan, 1999).

De plus, le caractère antioxydant des huiles essentielles est actuellement l'objet de nombreuses études, car il permet de neutraliser les formes toxiques de l'oxygène et les radicaux libres implicatifs dans le vieillissement cellulaire (Cavar et *al.*, 2008 ; Tepe et *al.*, 2006). Les huiles essentielles de la sauge sont de puissants inhibiteurs de la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase qui sont à l'origine de pathologies d'origine inflammatoire (Kamatou et *al.*, 2008).

I-2-8-Toxicité des huiles essentielles

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement de pratiques telle que l'aromathérapie (traitement des maladies par les essences de plantes) attachée à ces essences et le fait que beaucoup sont délivrées au public en dehors du secteur pharmaceutique (donc sans aucun contrôle sérieux) conduisent à une utilisation parfois abusive et à une automédication dangereuse. Un cas de décès aux USA a été enregistré après l'ingestion de 60 ml de Gaulthérie (Bruneton, 1999).

I-3- Agents antimicrobiens

L'utilisation des agents antimicrobiens a grandement contribué aux progrès réalisés dans le domaine de la santé. Ces «agents antimicrobiens» ont été introduits il y a plusieurs décennies pour traiter les maladies transmissibles et éviter les infections. Un agent antimicrobien est une substance d'origine synthétique ou naturelle produite par des bactéries, des champignons ou des plantes, utilisée pour la destruction ou l'inhibition de la croissance de micro-organismes, notamment des bactéries (Allen, 2006).

I-3-1-Antibiotiques

A l'origine, le mot « antibiotique » désigne tout produit microbien qui, même à de très faibles concentrations, inhibe ou tue certains micro-organismes. Il est actuellement employé dans un sens plus large qui inclut, en outre, toute substance synthétique dotée de ces propriétés (Singleton, 2005). Les antibiotiques peuvent avoir un effet bactéricide, c'est-à-dire détruisent les bactéries, ou simplement un effet bactériostatique en inhibant la croissance bactérienne. La spécificité d'action des antibiotiques repose sur les différences métaboliques et structurales qui existent entre les cellules procaryotes et eucaryotes. Les antibiotiques efficaces contre de nombreuses espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif sont dits à « large spectre » ; ceux qui sont actifs uniquement sur un petit nombre d'espèces sont dits à « spectre étroit » (Allen, 2006).

I-3-1-1- Mode d'action des antibiotiques

Actuellement, il y a environ 250 antibiotiques disponibles (Larivière, 2002). Le mode d'action des antibiotiques est connu car ils sont développés en fonction de leur « cible » (Figure 08), c'est à dire de l'effet destructeur désiré (Yahya, 2003).

Ils sont classés d'ailleurs selon leur mécanisme de destruction de la cellule bactérienne (Duval et Soussy, 1999):

- ❖ Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.
- ❖ Antibiotiques inhibant la synthèse de la membrane cytoplasmique.
- ❖ Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique.
- ❖ Antibiotiques inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques et de la synthèse de l'ADN.
- ❖ Antibiotiques agissant par inhibition compétitive.

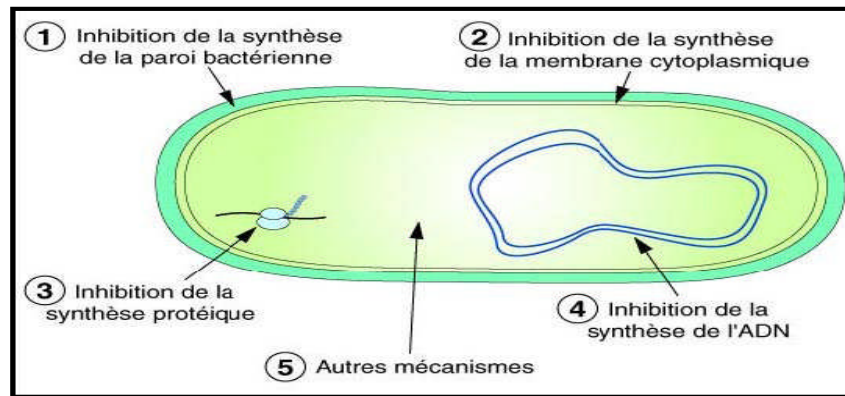


Figure 08 : Cibles d'action des antibiotiques (Pibiri, 2005).

I-3-1-2- Résistance bactérienne aux antibiotiques

Durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué. Les bactéries en sont devenues de plus en plus résistantes (Iserin, 2001 ; Matyar, 2008).

L'usage généralisé des antibiotiques et la prescription à grande échelle parfois inappropriée de ces agents ont entraîné la forte adaptabilité des souches bactériennes et la sélection des souches multi-résistantes (Hamilton-Miller, 2004). En effet, les processus de résistance bactérienne aux antibiotiques peuvent être groupés en trois grands mécanismes : modification de l'antibiotique, modification de la cible et de la concentration intracellulaire de l'antibiotique (défaut d'accumulation) (Pages, 2003).

Face aux limites thérapeutiques, des antibiotiques classiques ont poussé les scientifiques à orienter les recherches vers des nouvelles voies et surtout l'utilisation des principes actifs des plantes (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles...) comme agents antibactériens.

I-3-2- Activité antibactérienne des huiles essentielles

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent, l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides (Carson et Riley, 1995; Lambert et al., 2001 ; Kunle et al., 2003 ; Walsh et al., 2003), comme pour l'espèce Tea- tree (*Melaleuca alternifolia*) ; de nombreuses études ont montré l'activité bactéricide de son huile essentielle (Carson et Riley, 1995 ; Cox et al., 2000; Hammer et al., 2003 ; Hayouni et al., 2008a).

I-3-2-1-Activité liée à la composition chimique

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) ou ceux susceptibles d'être actifs. Mais, il est probable que cette activité dépende aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique (Burt *et al.*, 2004; Lahlou, 2004).

Les molécules réputées d'être actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité. Les composés chimiques de plus grande efficacité et à plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), des alcools, des aldéhydes et des cétones (Dorman et Deans, 2000 ; Holley et Patel, 2005).

I-3-2-3- Mode d'action des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches de bactéries (figure 09), leur action antibactérienne est due principalement à leur grande affinité aux lipides membranaires grâce à leur nature hydrophobe (Dormans et Deans, 2000), mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi cellulaire par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité de la membrane suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique, (apparition de fuite d'ions de potassium K^+ de cellules microbiennes), puis la perte des constituants cellulaires
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (Ultee *et al.*, 2002 ; Holley et Patel, 2005 ; Bakkali *et al.*, 2008).

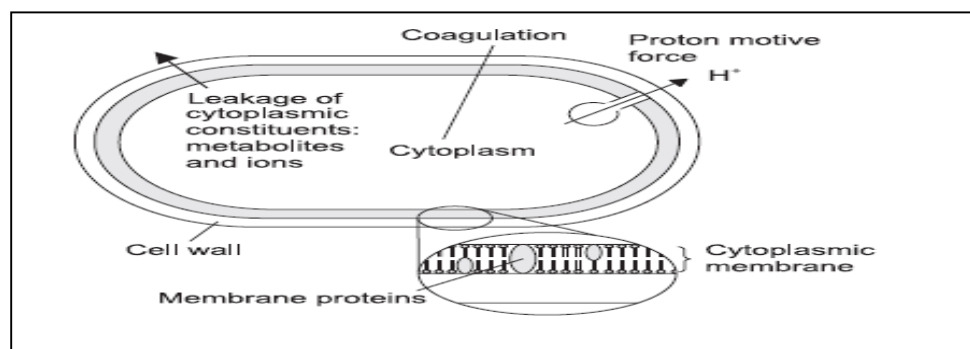


Figure 09 : Sites d'action antibactérienne des huiles essentielles (Burt, 2004).

I-3-2-4- Association d'huiles essentielles

Les effets antimicrobiens des associations d'huiles essentielles, comme pour les associations d'antibiotiques, sont définies selon quatre interactions possibles :

- ❖ Indifférence : l'activité d'une huile essentielle n'est pas affectée par l'autre.
- ❖ Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration que dans l'association.
- ❖ Synergie : l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque huile essentielle étudiée isolément, à la même concentration.
- ❖ Antagonisme : l'association diminue l'activité de l'une ou l'autre des huiles essentielles. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque huile essentielle prise séparément (Burt, 2004 ; Pibiri, 2005).

I-3-2-5- Evaluation du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

La technique utilisée est celle de l'aromatogramme, identique à celle de l'antibiogramme utilisé pour tester les antibiotiques. C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide ou gazeux, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible (Belaiche, 1979 ; Pibiri, 2005). A cause de la faible solubilité des huiles essentielles, des émulsifiants comme le tween 20, tween 80 et le triton ou des solvants sont utilisés pour augmenter la solubilité des composés hydrophobes dans les milieux solides et liquides. Cependant, les émulsifiants et les solvants ont attiré quelques critiques concernant leur effet direct sur les microorganismes et leur possible effet sur l'activité antibactérienne des huiles (Suppakul et al., 2003 ; Burt, 2004).

I-4- Stress oxydatif et les antioxydants

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « Stress oxydant » (Favier, 2003).

En effet, on met actuellement en évidence le rôle néfaste de processus oxydatifs incontrôlés et de réactions de type radicalaire dans la genèse, l'entretien ou les séquelles d'un nombre croissant de maladies, généralement liées au vieillissement, que leur mécanisme soit bien connu (athérosclérose) ou encore à l'étude (maladies neurodégénératives) (Hennebelle, 2006).

I-4-1-Stress oxydatif

I-4-1-1- Définition

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les systèmes producteurs d'espèces radicalaires oxydantes et les systèmes de défense anti-oxydants au profit des premiers, il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (Bonfont-Rousselot et *al.*, 2002 ; De Moffarts et *al.*, 2005).

I-4-1-2-Origine du stress

Dans les circonstances quotidiennes normales, les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques, car ils sont utiles pour l'organisme à des doses raisonnables. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par le système de défense, la balance antioxydant/pro-oxydante est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant ou par suite d'une production énorme de radicaux (Favier, 2003), ce qui induit une situation d'un stress oxydatif profond (figure 10).

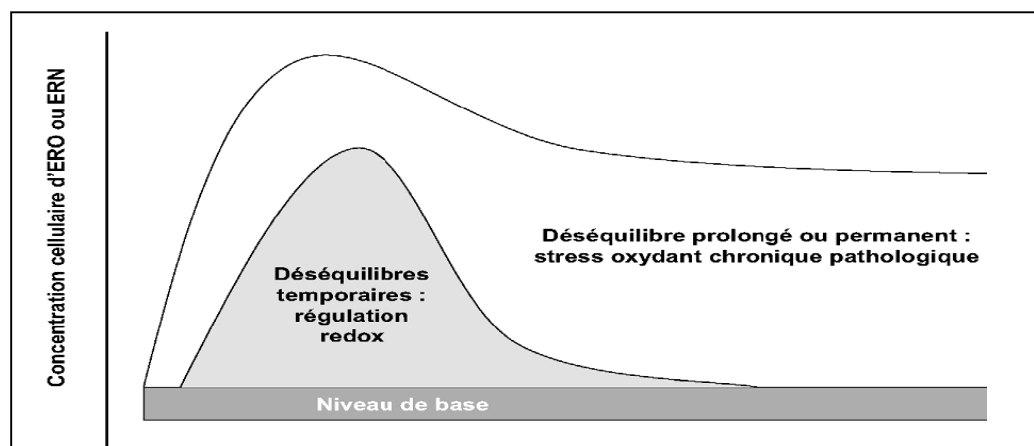


Figure 10 : Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigue ou chronique des ERO/ERN (Beaudeux et *al.*, 2006).

I-4-1-3- Différentes formes de radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron (André, 1998). Il peut arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux, ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule (Cheeseman et Slater, 1993, Koechlin-Ramonatxo, 2006).

L'oxygène (O₂) est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitaux externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde (O₂^{•-}), puis en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Il est ainsi à l'origine de la formation d'espèces réactives oxygénées (ROS) (Sies, 1993 ; De Leiris, 2003 ; Edreva, 2005).

L'appellation « dérivés réactifs de l'oxygène » n'est pas restrictive, elle inclue les espèces réactives de l'oxygènes (ERO), proprement dit, mais aussi certains dérivés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le (H₂O₂), et les espèces réactives de l'azote (ERN) à savoir le peroxynitrite (ONOO⁻) (Fontaine et *al.*, 2002 ; Pasquier, 2005).

I-4-1-4- Origine des radicaux libres

Les radicaux libres sont produits en permanence dans l'organisme (figure 11) dans des conditions physiologiques afin de protéger l'organisme contre les agressions causées par les microorganismes et les cellules tumorales (Pincemail et *al.*, 2002 ; Valko et *al.*, 2007), ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose (Favier, 2003 ; Desmettre et *al.*, 2005 ; Flourie et *al.*, 2006).

La chaîne respiratoire est une source permanente de production des ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ions superoxyde, d'eau oxygénée et éventuellement de radicaux hydroxyles (Pincemail et *al.*, 2002 ; Favier, 2003 ; De Moffarts et *al.*, 2005).

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement via les cellules phagocytaires. L'activation de ces cellules immunitaires par des stimuli exogène ou endogène s'accompagne d'une accélération de leur consommation d'oxygène avec activation d'une enzyme membranaire, la NADPH oxydase qui catalyse la réduction de cet oxygène en anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$). Ce dernier donne le H_2O_2 par dismutation. Le $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 participent à la libération d'hypochlorite sous l'influence d'une enzyme leucocytaire, la myéloperoxydase (Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2002 ; De Moffarts et *al.*, 2005).

A côté de ces sources majeures des ROS, il existe des sources cytosoliques, essentiellement le peroxysome qui constitue une source importante de la production cellulaire de H_2O_2 (Valko et *al.*, 2007), la xanthine oxydase qui produit de l' $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 (Groussard, 2006), les enzymes de réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques), les NO synthases (Massion et *al.*, 2002) et les enzymes de la voie de l'acide arachidonique (Ré et *al.*, 2005).

Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres et les poussières d'amiante et de silice sont aussi des sources des ROS (Favier, 2003 ; Wang et *al.*, 2004). Les fumées de combustion (de cigarettes, de bois, etc.), les produits chimiques tels que les antiseptiques, les pesticides, les métaux de transition contribuent d'une façon ou d'une autre à la production des radicaux libres. La consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter (Pincemail et *al.*, 2001 ; Lee et *al.*, 2004 ; Pincemail et Defraigne, 2004).

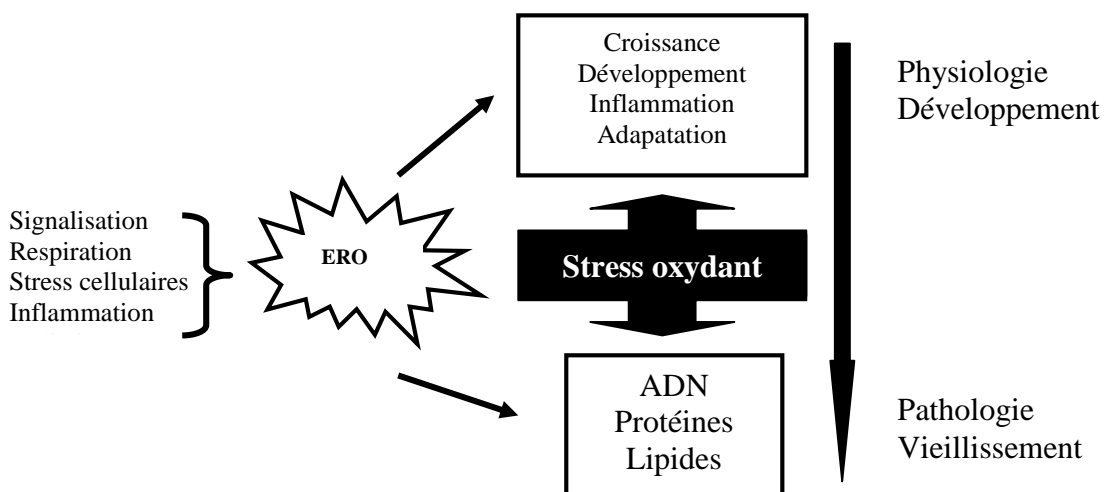


Figure 11 : Origines et cibles des principaux dérivés réactifs de l'oxygène (Barouki,

I-4-1-5- Stress oxydant et atteintes pathologiques

La notion de « stress oxydant » et de « radicaux libres » est de plus en plus utilisée pour expliquer différentes atteintes pathologiques, soit comme un des facteurs déclenchant, soit comme des causes de complication dans leur évolution (Huang et *al.*, 2004).

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical OH, réaction appelée la peroxydation lipidique (Lee et *al.*, 2004 ; Ré et *al.*, 2005). Les conséquences seront différentes : l'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de LDL oxydées qui, captés par des macrophages, forment le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires; l'attaque des phospholipides membranaires modifient la fluidité et la perméabilité de la membrane, aboutissant à la désorganisation complète de la membrane, et altérant de ce fait le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les ROS peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes. Certains affectent les bases, d'autres induisant des cassures dans les brins (Ré et *al.*, 2005). Ils modifient la sécrétion d'insuline et changent les structures primaires, secondaires et tertiaires des protéines (Pincemail et *al.*, 1999).

Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H₂O₂ et OH, qui entraînent la coupure de protéines et leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydaton est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

Le stress oxydant serait également impliqué dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer où la mort neuronale pourrait être liée à un phénomène d'apoptose impliquant les radicaux libres. Enfin, les radicaux libres semblent également jouer un rôle non négligeable dans la cancérogenèse, puisque ces espèces peuvent être responsables de mutations dans l'ADN, ce qui constitue un facteur de risque dans l'initiation et le développement du cancer (Desport et Couratier, 2002 ; Roussel et Ferry, 2002).

Pour faire face à ces produits oxydants délétères, le corps humain possède tout un arsenal de défense que l'on qualifie d'antioxydants. De plus, de nombreuses molécules d'origine naturelle (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles,...) ou issues de synthèses organiques (Trolox, BHA, BHT,...) sont étudiées pour leurs propriétés antioxydantes et leur contribution dans la lutte contre les espèces oxydantes de l'organisme.

I-4-2- Antioxydants


I-4-2-1- Définition

Un antioxydant est toute substance capable d'inhiber ou de retarder l'oxydation d'un substrat tout en étant présente à une faible concentration par rapport à la concentration du substrat oxydable. Ces antioxydants peuvent avoir plusieurs origines, ils peuvent être produits dans l'organisme ou apportés par l'alimentation ou bien sont issus d'une synthèse chimique (Al-Mamary *et al.*, 2002 ; Karou *et al.*, 2005 ; Berger, 2006).

Les agents anti-oxydants peuvent retarder l'oxydation par deux moyens ; soit en piégeant directement les radicaux libres, et dans ce premier cas le composé est appelé anti-oxydant primaire ou par d'autres mécanismes indirectes, incluant la fixation des ions métalliques, la conversion des hydroperoxydes en espèces non radicalaires. Dans ce deuxième cas, le composé est appelé anti-oxydant secondaire (Pokorny *et al.*, 2001).

I-4-2-2-Antioxydants endogènes

L'organisme possède deux grands systèmes de défense : les systèmes enzymatiques et non enzymatiques qui fonctionnent de façon complémentaires et synergique selon un compartiment bien précis pour protéger les cellules contre les métabolites cytotoxiques de l'oxygène (figure 12).

 **Systèmes enzymatiques** : Les principales enzymes d'antioxydants sont :

- La superoxyde dismutase (SOD) : diminue la durée de vie de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$.
- La catalase (CAT) : transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau.
- La glutathion peroxydase (GPx) : détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques (Milane, 2004 ; Garait, 2006 ; Rahman *et al.*, 2006).

- ✚ **Systèmes non enzymatiques** : De nombreuses métalloprotéines telles que la transferrine et l'albumine permettent de chélater les métaux (Fe, Cu, etc) impliqués dans la formation des radicaux hydroxyles lors des réactions concomitantes de Fenton et d'Haber-Weiss (De Moffarts et *al.*, 2005).

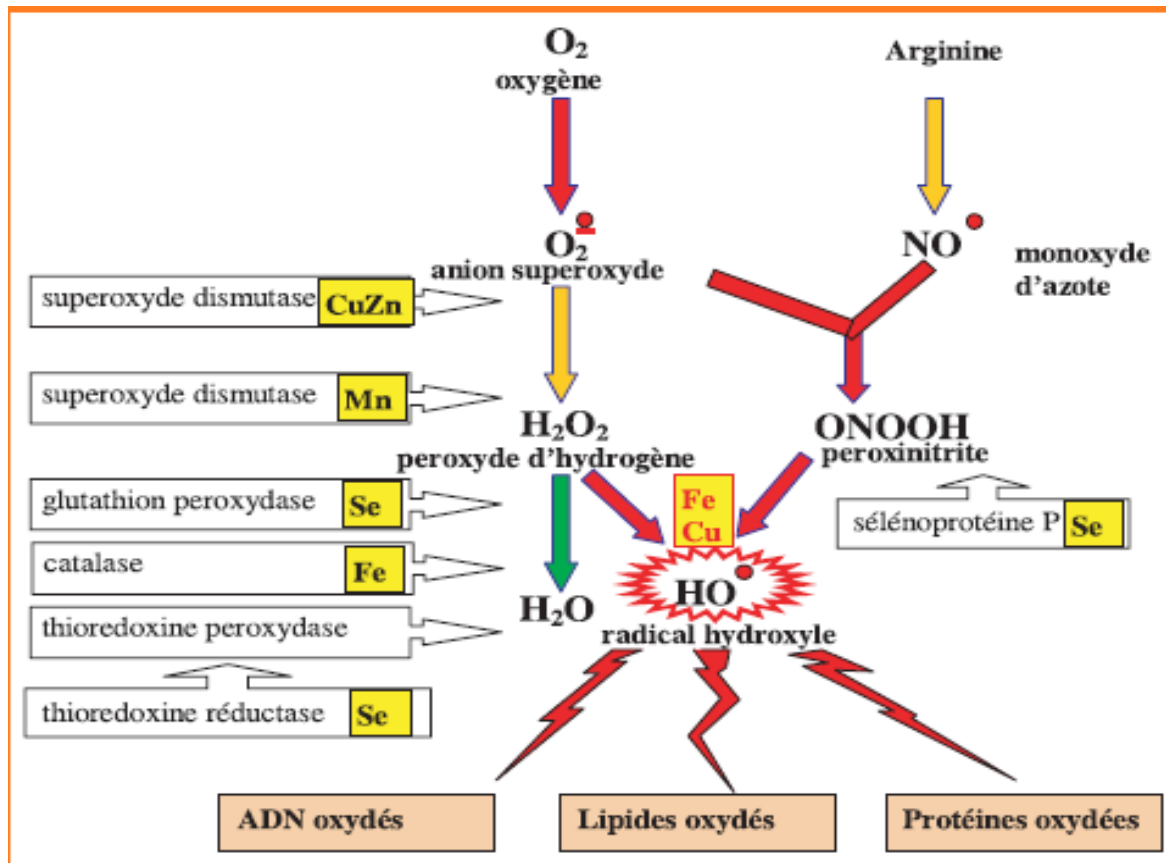


Figure 12 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

En plus des substances propres à l'organisme, la définition d'antioxydant englobe ainsi toutes les substances chimiques qui, plus spécifiquement, prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations provoquées par l'oxydation telles que le rancissement des matières grasses et le brunissement enzymatiques (Andrian et *al.*, 2003).

I-4-2-3-Antioxydants de synthèse

Les antioxydants synthétiques peuvent être soit des produits imitant les enzymes telles que les « SOD like » basées sur des complexes de cuivre, de fer ou de manganèse ; soit des dérivés de sélénium comme l'Ebselen. Les antioxydants peuvent aussi être des molécules

maintenant le fer dans un état inactif (Desferal, hydroxypyridines) ou des molécules inhibitrices d'enzymes responsables de la formation des ROS (Allopurinol).

Ces composés présentent des propriétés peroxydasiques et peuvent appartenir à de nombreuses familles : les dérivés phénoliques (butylhydroxytolène et le butyldroxyanisole, esters d'acide gallique et le trolox), les dérivés stéroïdiens (lazaroides), les dérivés soufrés (N-acétylcystéine), les dérivés de la méthyle xanthine (caféine, allopurinol) (Pincemail et *al.*, 1998 ; Helm et *al.*, 1999 ; Odabasoghlu et *al.*, 2004).

I-4-2-4-Antioxydants naturels

En plus de la prévention par les enzymes ou les protéines chélatrices de métaux, l'organisme peut quant- à- lui tirer profit de nombreux antioxydants présents dans son alimentation.

➤ **Vitamine E** : La vitamine E ou l' α -tocophérol proprement dite, la plus importante de la famille des tocophérols (α , β , γ , δ), est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble reconnue, grâce à sa capacité d'inhiber les peroxydations lipidiques au niveau des membranes cellulaires (Pincemail et *al.*, 1998 ; Cuvelier et *al.*, 2003). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein de la membrane biologique qui est riche en acides gras polyinsaturés, ce qui constitue la première défense contre l'athérosclérose et en fait un protecteur cardiovasculaire majeur (Cuvelier et *al.*, 2003 ; Milane et *al.*, 2004). De plus, l'effet bénéfique de la vitamine E se retrouve renforcée par une consommation optimale de la vitamine C (Pincemail et *al.*, 2002 ; Lee et *al.*, 2004).

➤ **Vitamine C** : La vitamine C ou l'acide ascorbique, connue comme étant le principal antioxydant hydrosoluble, est un piègeur efficace des ROS tels que les radicaux peroxydes, hydroxydes, superoxydes et le peroxinrite. Elle peut protéger divers substrats biologiques de l'oxydation (protéines, acides gras et ADN) (Servais, 2004 ; Kaliora et *al.*, 2006). La vitamine C, à une concentration élevée, a une activité pro-oxydante en favorisant la formation de radicaux hydroxydes en présence de fer et de cuivre (Servais, 2004).

➤ **Caroténoïdes** : Les caroténoïdes sont des pigments végétaux liposolubles ; de couleur rouge (lycopène de la tomate), orange (β -carotène des carottes) ou jaune (lutéine et zéaxanthine du maïs), sont particulièrement efficaces dans la neutralisation de l'oxygène

singulet et dans protection contre les radiations solaires et protège ainsi le peau des dommages oxydatifs (Josse, 2003 ; Stahl et Sie, 2004 ; Dutta et *al.*, 2005).

➤ **Composés phénoliques :** Plusieurs études se sont intéressées aux propriétés antioxydantes des polyphénols. Ces molécules biologiques ont la capacité de piéger les radicaux libres et empêcher la génération de radicaux hydroxyles hautement réactifs (Macheix et *al.*, 2005 ; Wong et *al.*, 2006). En outre, ils ont l'aptitude de chélater les métaux tels que le fer et le cuivre qui peuvent être aussi une source du radical OH lors de la réaction de Fenton par réduction de H₂O₂ (Pietta, 2000 ; Heim et *al.*, 2002). D'autre part, leur capacité à se fixer aux protéines, propriété particulière des tannins, peut conduire à l'inhibition d'activités enzymatiques telles que la peroxydase et la xanthine oxydase qui sont à l'origine de pathologies d'origines inflammatoires (Macheix et *al.*, 2005 ; Porat, 2006).

➤ **Huiles essentielles :** La reconnaissance des huiles essentielles comme antioxydants naturels est maintenant bien acquise et elle est pour une part à l'origine du regain d'intérêt pour est porté à ces molécules dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie (Avless et *al.*, 2004 ; Helme et *al.*, 2004 ; Gardeli et *al.*, 2007 ; Girotti, 2006 ; Erkan et *al.*, 2008). Grâce à leur diversité structurale, les huiles essentielles sont impliquées dans cette activité via plusieurs mécanismes agissant à différents niveaux des réactions radicalaires par la chélation des métaux, l'effet scavenger, l'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres et l'induction de la synthèse des enzymes antioxydants (Ipek et *al.*, 2005 ; Gomes-Carneiro et *al.*, 2005 ; Vukovic-Gacic et *al.*, 2006).

Chapitre II

Matériels et méthodes

II-Matériels et méthodes

II-1- Préparation du matériel végétal

II-1-1- Récolte du matériel végétal

Les feuilles de trois plantes ont été récoltées dans trois régions rurales de la wilaya de Béjaia, le choix de ces plantes est basé sur leur usage culinaire et comme remède traditionnel par la population Algérienne. L'échantillonnage a été fait dans une région propre, loin de tout impact de pollution et après la disparition de la rosée du matin, aux dates, altitudes et localités indiquées dans le tableau IV.

Après la récolte, les plantes ont été identifiées au laboratoire de physiologie végétale et d'écologie de l'université de Bejaia en utilisant la flore d'Algérie de Quezel et Santa (1963).

Tableau IV : Caractéristiques des conditions de récoltes

Nom scientifique	Région de récoltes	Altitude (m)	Dates de récolte
<i>Inula viscosa</i> L.	Tichy	1	Août
<i>Salvia officinalis</i> L.	Feraoun	685	juillet
<i>Laurus nobilis</i> L.	Djebira	90	Début de septembre



(A)



(B)



(C)

Figure 13 : Photographie des plantes étudiées, A: *Inula viscosa* L, B : *Salvia officinalis* L.
C : *Laurus nobilis* L.

II-1-2- Séchage et Broyage

Après la récolte, les plantes ont été lavées à l'eau pour les débarrassées de la poussière et d'autres particules. Les feuilles de chaque plante ont été séchées au niveau du laboratoire à température ambiante, en prenant soin de les aérer régulièrement jusqu'à la stabilisation de la masse. Une fois sèches, les feuilles sont broyées puis réduites en poudre à l'aide d'un broyeur électrique, puis conservées dans des sacs propres, fermés et stockés à l'abri de la lumière. Notant qu'avant le lavage, une certaine quantité de plantes est récupérée pour la mesure du taux d'humidité.

Test d'humidité

La teneur en humidité des plantes est déterminée selon la méthode de séchage à l'étuve. Ainsi, le pourcentage d'humidité est calculé selon la formule de Hillel (1989).

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = [(Pf - Ps) / Pf] \times 100$$

Où :

Pf : poids frais de l'échantillon (g).

Ps : poids sec de l'échantillon (g).

II-2- Huiles essentielles

II-2-1- Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

- Principe de la méthode

L'extraction des huiles essentielles est effectuée par hydrodistillation par un appareil de type Clevenger, suivant la méthode de Belhame et al. (2008). Son principe repose sur le fait que les huiles essentielles sont suffisamment volatiles pour qu'elles puissent être entraînées à la vapeur d'eau et cela malgré leurs points d'ébullition qui est nettement supérieur à celui de l'eau.

- Mode opératoire

Une quantité de 150 g de matière végétale est transvasée dans un ballon de deux litres auquel un volume de 1500 ml d'eau distillée est ajouté et l'hydrodistillation se fait pendant trois heures. L'eau est portée à ébullition, la vapeur d'eau entraîne les molécules volatiles qui se condensent dans un réfrigérant et le mélange eau-huile est recueilli dans un ballon de 250 ml (figure 14).



Figure 14: Dispositif d'hydrodistillation

La décantation se fait dans une ampoule à décanter d'un litre dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles par la différence de leur densité. Une phase aqueuse (inférieure) et une phase huileuse (supérieure).

Les huiles essentielles ainsi récupérées sont traitées avec quelques cristaux de sulfates de magnésium anhydre afin d'éliminer l'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique. Elles sont conservées au réfrigérateur à 4°C dans des flacons sombres à l'abri de la lumière et de la chaleur. Trois distillations sont réalisées pour chaque échantillon. Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal. Le rendement, exprimé en pourcentage, est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \left[\frac{P1}{P2} \right] \times 100$$

Où :

P1 : Poids de l'huile (g).

P2 : Poids de la plante (g).

II-2-3- Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

-Principe de la méthode

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode de séparation dont les principes généraux sont les mêmes que ceux de la chromatographie en général, c'est-à-dire basés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser à travers d'un substrat choisi. La particularité du procédé est d'opérer en totalité sur des produits volatilisés, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable, mais sans qu'il y ait volatilisation du substrat, et de travailler en circuit étanche aux gaz (Tranchant, 1996).

-Mode opératoire

L'analyse est faite sur un appareil *Shimadzu* GC-14B qui a comme caractéristique une colonne capillaire apolaire SE-54 de 50 m de longueur et d'un diamètre intérieur de 0,32mm. Cette phase stationnaire possède une épaisseur de 0,25 µm et sa température maximale est de 300°C.

La colonne est chauffée de 60°C (maintenue pendant 2 minutes) à 230 °C (maintenue pendant 10 minutes) avec une vitesse de 2°C/ min.

L'injecteur et le détecteur sont respectivement programmés à 250 et 280°C. Les échantillons de 1 µl sont injectés en mode Split avec une fraction de 1/40.

Une série d'alcane C₅-C₁₃ reconstituée à partir de composés purs, est injectée dans les mêmes conditions que les échantillons étudiés pour rapporter les temps de rétentions en indices de rétentions.

L'identification des pics expérimentaux s'est faite par comparaison entre les indices de rétentions calculés; et ceux de la littérature obtenus en utilisant une phase stationnaire identique à celle de cette étude (Bernhard et *al.*, 1988 ; Adams, 2001).

II-3-Evaluation de l'activité antioxydante et antiradicalaire

II-3-1- Activité anti-radicalaire à l'égard du DPPH

-Principe de la méthode

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'effet scavenger des huiles essentielles de plantes contre le radical DPPH est celle de Balasundram et *al.* (2007). Cette méthode tire de la décoloration de la solution méthanolique du radical DPPH lors de sa réduction par les antioxydants. La différence de l'absorbance, entre la solution du radical DPPH en absence et en présence de l'huile reflète le potentiel des composés responsables de cette activité à réduire le radical DPPH, et le taux réduit du DPPH par ces molécules est exprimé en pourcentage suivant la forme suivante :

$$\% \text{ scavenger de radical DPPH} = (A_T - A_E / A_T) \times 100$$

Où:

A_T : absorbance du témoin.

A_E : absorbance de l'échantillon.

-Mode opératoire

100 µl d'extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 2 ml de la solution DPPH préparée à 0,2 mM dans du méthanol. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance a se fait à 517 nm.

A titre d'indication, trois standards : l'acide ascorbique, le BHA et l'α-tocophérol connus pour leur effet anti-radicalaire ont été testés en parallèle. Quant aux concentrations inhibitrices (IC₅₀), elles ont été calculées à partir des courbes à regression linéaire.

II-3-2- Détermination de la Capacité Antioxydante en Équivalent Trolox (TEAC)

-Principe de la méthode

La méthode mesurant la Capacité Antioxydante en Équivalent Trolox (TEAC) a été utilisée pour déterminer le potentiel antioxydant des huiles essentielles. Cette méthode pratique est utilisable dans divers solvants pour un grand nombre de composés d'efficacités différentes

La diminution de l'absorbance de la solution du radical cationique d' ABTS^{•+} traduit l'effet de l'échantillon antioxydant, par comparaison avec une courbe d'étalonnage réalisée à partir du Trolox , dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (Re et al., 1999). Le pourcentage de réduction du radical ABTS^{•+} est donné par l'équation suivante :

$$\% \text{ scavenger de radical ABTS}^{\bullet+} = (A_T - A_E / A_T) \times 100$$

Où :

A_T : absorbance du témoin

A_E : absorbance de l'échantillon.

- Mode opératoire

Le pouvoir anti-radicalaire contre le radical cationique ABTS^{•+} est mesuré selon la méthode Re et al. (1999). La solution du radical ABTS^{•+} (2,45 mM) est obtenue par un mélange de la poudre ABTS avec une solution de persulfate de potassium (7 mM). Ce mélange est ensuite incubé à l'obscurité pendant 16 h (température ambiante). La solution d'ABTS^{•+} est ensuite diluée avec l'éthanol afin d'obtenir une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Un volume de 20 µl d'extrait à différentes concentrations est additionné de 2 ml de la solution d'ABTS^{•+}. La quantité d'antioxydant ayant un pouvoir anti-radicalaire est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec le Trolox (annexe 1).

II-3-3- Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

-Principe

La capacité des huiles essentielles à piéger le peroxyde d'hydrogène est déterminée suivant la méthode rapportée par Atmani et al. (2009). Le principe de la réaction est de neutraliser le peroxyde d'hydrogène par un antioxydant qui va faciliter sa décomposition en molécule d'eau. Le pourcentage d'inhibition du H₂O₂ est calculé comme suit :

$$\% \text{ scavenger du H}_2\text{O}_2 = (A_T - A_E / A_T) \times 100$$

Où:

A_T : absorbance du témoin.

A_E : absorbance de l'échantillon.

-Mode opératoire

Un volume de 2 ml d'extrait est mélangé avec 1,2 ml de la solution de H_2O_2 (40mM) qui est préparé dans un tampon phosphate (pH= 7,4). L'absorbance de H_2O_2 est mesurée à 230 nm après 10 min de réaction.

II-3-4- Pouvoir réducteur

-Principe

Le pouvoir réducteur repose sur la réduction du chlorure ferrique (FeCl_3) en chlorure ferreux (FeCl_2) en présence d'un agent chromogène, le ferricyanure de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] et en milieu acidifié par l'acide trichloracétique. L'absorbance, lue à 700 nm, est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'échantillon testé (Gulçin et *al.*, 2005).

-Mode opératoire

Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par Hang et al. (2006). Un volume de 1,25 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) est ajouté à 1,25 ml d'extrait de plante, suivi de 1,25 ml de ferricyanure de potassium (1%) et après agitation, le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Un volume de 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% est additionné au mélange avant d'être centrifugé à 3000 tours/min. A partir de ces tubes, 2,5 ml sont prélevés, auxquels sont ajoutés 2,5 ml d'eau distillée et de 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm.

II-4- Détermination de l'activité antibactérienne

II-4-1- Les souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes sur lesquelles nous avons testé l'activité des huiles essentielles, ont été sélectionnées en fonction de leur pouvoir pathogène et leur résistance naturelle aux antibiotiques.

Il s'agit d'une souche de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (NAR), *Klebsiella pneumoniae* (E47) et *Listeria innocua* (CLIP 74915).

Ces souches proviennent du laboratoire de Microbiologie Appliquée (L.M.A) de l'université de Bejaia. Elles ont été conservées à 4°C dans des tubes à essai inclinés de gélose nutritive.

II-4-2-Tests de confirmation de l'identification des ces souches

Des tests biochimiques caractéristiques ont été utilisés pour vérifier l'appartenance de ces souches; la coloration de Gram, la recherche de la catalase, la recherche de la fermentation des sucres, la production de gaz et d'H₂S sur milieu Hajna-Kligler, la recherche de la nitrate réductase sur bouillon nitraté, test de dégradation du mannitol et de la mobilité, utilisation des citrates sur milieu citrate de Simmons, tests VP et RM sur milieu Clark et Lubs, utilisation des acides aminés telles que LDC, ODC et ADH.

La recherche de la coagulase et de la désoxyribonucléase (DNase) sur gélose à l'ADN pour *Staphylococcus aureus*, la recherche de la pyocyanine sur milieu King A et la pyoverdine sur King B pour *Pseudomonas aeruginosa*. (La composition des différents milieux de cultures utilisés et les testes effectués sont illustrés sur l'annexe 2).

II-4-3- Sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques

- Principe de la méthode

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (Delignette-Muller, 1992).

- Antibiotiques testés

- Fluoroquinolones : Ofloxacin « OFX » 5 µg.
- Macrolides : Erythromycine « E » 10 UI.

- β -lactamines : Pénicillines G « PG » 6 μg ; Ampicilline « Amp » 10 μg .
- Phénicoles: Chloramphénicol « C » 30 μg .
- Aminosides : Gentamicine « G » 10 μg .

- Mode opératoire

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisés en bactériologie médicale, appelée encore méthode des disques. Cette technique consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des antibiotiques à tester, déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencés avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les antibiotiques diffusent de manière uniforme si bien que leurs concentrations sont inversement proportionnelles à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires qui correspondent à une absence de culture (Delignette-Muller, 1992). Les diamètres des zones d'inhibition sont comparés avec celles de références (Tableau V).

Tableau V : Liste des antibiotiques et des valeurs de références (CASFM, 2009).

Antibiotiques	Abréviations	Classes	Diamètres en mm	
			Sensible	Résistante
Ofloxacine	OFX	Fluoroquinolones	≥ 25	< 22
Pénicilline G	PG	Pénicillines	≥ 29	< 18
Ampécilline	Amp	Pénicillines	≥ 29	< 16
Chloramphénicol	C	Phénicoles	≥ 23	< 19
Gentamicine G	G	Aminosides	≥ 16	< 14
Erythromycine	E	Macrolides	≥ 22	< 17

II-4-4- Test du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

-Principe de la méthode

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des huiles essentielles par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné d'huile essentielle. Cette méthode a l'avantage d'une grande souplesse dans le choix des huiles essentielles testées, et de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes (Belaiche, 1979).

La méthode utilisée dans cette étude pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles, est celle faite par plusieurs auteurs (De Billerbek, 2007 ; Nedorostova et *al.*, 2008; Matyar et *al.*, 2008 ; Thi Dung et *al.*, 2008)

- Mode opératoire

Une suspension bactérienne de 18 à 24 heures est préparée dans l'eau physiologique stérile et ajustée jusqu'à l'obtention d'un inoculum de 10^7 UFC/ml.

Une série de dilutions (1/1,1/2,1/4 et 1/8) de l'huile dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) est réalisée.

1 ml de l'inoculum préparé à partir de chaque souche est uniformément bien étalé à la surface de la gélose de Mueller-Hinton (MH). Des disques de papier Waltman n°1 stériles de 6 mm de diamètre sont déposés sur la gélose et chaque disque est imprégné d'une quantité de 5 µl de l'huile essentielle à différentes concentrations.

Les disques imprégnés de 5 µl de DMSO sont utilisés comme témoins. Chaque test est répété trois fois et une boîte témoin est ensemencée dans les mêmes conditions de l'expérience mais sans disques, qui renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien. La lecture se fait après 18 à 24 h d'incubation à 37°C.

II-5- Etude statistique

Toutes les données représentent la moyenne de trois essais. L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application « ANOVA » à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5.5 et le seuil de significativité est fixé à $P < 0,05$.

Chapitre III

Résultats et discussions

III-Résultats et discussions

Le présent travail s'articule sur trois parties, on retrouvera ainsi les résultats concernant l'extraction des huiles essentielles suivi de ceux relatifs à l'activité antioxydante et à l'activité antibactérienne.

III-1- Extraction et analyse des huiles essentielles

La méthode d'extraction est une opération importante qu'il faut mener avec soin. Par ailleurs, la collecte, le séchage, et le stockage -tributaires à l'extraction- influencent largement sur le rendement ainsi que la qualité organoleptique des huiles essentielles (Benjlali, 2005).

La saison de collecte du matériel végétal influence l'activité biologique des extraits de plantes, car la teneur en métabolites secondaires chez les végétaux n'est pas stable dans le temps. Au cours des mois, voire des journées, des poussées de biosynthèse engendrent une accumulation plus au moins importante de certains constituants des chaînes métaboliques, certaines études ont même montré que le profil chimique de ces composés peut être différent au cours de la même journée (Wchitl et Anton, 2003). La collecte des plantes s'est faite avant la formation des boutons floraux qui diminueraient leur teneur en principes actifs (Valnet, 1992 ; Wchitl et Anton, 2003).

La procédure de séchage est aussi un paramètre important pouvant influencer sur le rendement et la vitesse d'extraction des huiles essentielles. Le séchage du matériel végétal s'est fait à l'air libre et à l'abri de la lumière. Etant plus sec, le matériel végétal contiendra moins d'humidité et nécessitera donc moins d'énergie pour l'amener au voisinage de 100°C (Beloued, 2005 ; Benjlali, 2005). Le séchage des plantes a été aussi réalisé afin de garantir une bonne conservation des échantillons

Par la suite, la matière sèche retenue est réduite en poudre, cette opération faciliterait l'extraction des huiles essentielles par l'augmentation de la surface d'échange entre la matière végétale et le milieu liquide, ce qui améliore la vitesse d'extraction des huiles essentielles et par conséquent le rendement de l'opération de distillation (Benjlali, 2005).

III-1-1-Test d'humidité

Le test d'humidité est réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau des plantes étudiées, et de connaître la durée de séchage pour chaque plante qui diffère d'une espèce à une autre. Les analyses des échantillons ont révélé un taux d'humidité important compris entre 56 à 82%. Cela signifie que la majeure partie de la plante est constituée d'eau.

Selon la figure 15 on peut constater que la plante *I. viscosa* L. est très riche en eau avec un taux d'environ 82%, de même l'espèce *S. officinalis* L. montre une teneur importante, les 2/3 (64,49 %) de la plante sont formés d'eau. En revanche l'espèce *L. nobilis* L. comprend approximativement des proportions équivalentes en matière sèche et d'eau. Cependant, le taux d'humidité varie significativement ($P < 0.05$) entre les trois plantes étudiées.

Les résultats obtenus semblent être proche de ceux trouvés par Munné-Bosch et Alegre (2003) pour l'espèce *S. officinalis* avec un taux de 58,9%.

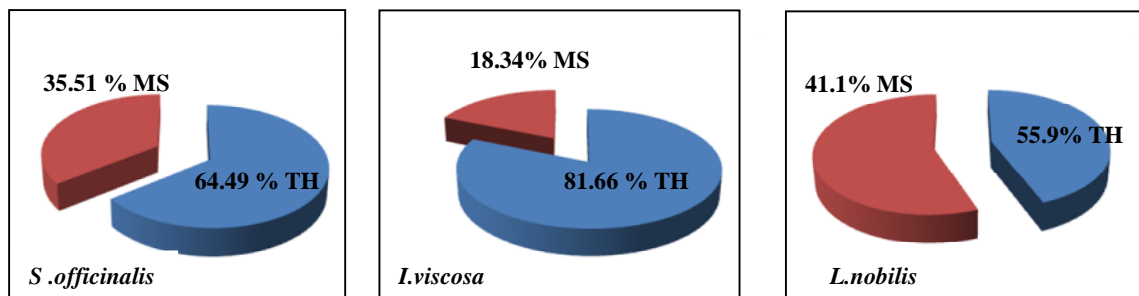


Figure 15: Teneur en humidité des trois plantes médicinales.

*TH : Taux d'humidité.

*MS : Matière sèche.

III-1-2- Rendement et caractéristiques des huiles essentielles

Afin de déterminer les propriétés organoleptiques des huiles, quelques caractères physiques sont étudiés (aspect, couleur et odeur), le tableau VI reprend ces différents caractères.

Tableau VI: caractères organoleptiques des huiles essentielles.

Caractères	Aspect	Couleur	Odeur
<i>I.viscosa</i>	Limpide très dense	Jaune vert clair	Fraîche aromatique
<i>S.officinalis</i>	limpide, fluide et mobile	Incolore à jaune pâle	Acidulée, très aromatique
<i>L.nobilis</i>	Liquide, limpide	très pâle à jaune	Aromatique, épicée

Selon la figure 16, le rendement en huile essentielle varie beaucoup ($P < 0.05$) avec la plante utilisée. Le rendement le plus élevé est obtenu chez *S. officinalis* (1,12%) suivi par *L.nobilis* (0,88%), un faible rendement a été obtenu pour l'*I. viscosa* (0,22%).

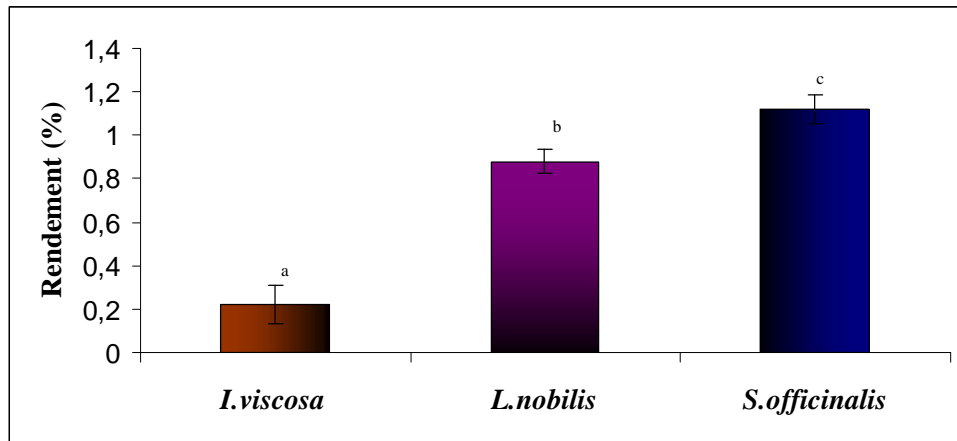


Figure 16 Rendement en huiles essentielles des différentes plantes.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype

*Les valeurs désignées par des lettres différentes indiquent que la différence est significative ($P < 0.05$). Les valeurs sont classées par ordre croissant $a < b < c$.

D'après Chalchat et al. (1998) le rendement d'extraction des huiles essentielles de *Salvia officinalis* est lié à l'origine de la plante : France (2,05%), Hongrie (2,50%), Portugal (2,90%), Roumanie (2,30%), quant à la sauge d'origine de Serbie le rendement est de (2,00%) (Miladinović et Miladinović, 2000). Les rendements obtenus dans le présent travail concernant *Salvia officinalis* restent inférieurs à ceux cités précédemment. Toutefois, *Salvia officinalis* cultivée en Tunisie renferme entre 0.78% à 1.63% d'huile essentielle (Fellah et al., 2006), ce qui est proche du rendement obtenu dans la présente étude.

Pour l'*Inula viscosa*, le rendement obtenu semble être proche de ceux obtenus dans d'autres études. En effet, Perez-Alonso et al. (1996) ont montré que l'*Inula viscosa* cultivée en Espagne, présente un rendement de 0,2%. Quant à Robertet (2000), ce dernier a eu un rendement de 0.3% pour l'*Inula viscosa* cultivée en France, sachant que l'huile essentielle de cette plante a été extraite à partir des parties aériennes par entraînement à la vapeur d'eau.

Concernant *Laurus nobilis* dont le rendement obtenu est de 0.88%, ce dernier reste inférieur à celui obtenu par Kovacevic et al. (2007) qui est de 1.5% pour la même espèce cultivée au Monténégro. Par ailleurs, une autre étude menée par l'équipe Flamini (2007) sur l'espèce de *Laurus nobilis* rapportent un rendement de 1,132 %. Cependant, l'extraction est réalisée par hydrodistillation assistée par micro-ondes qui semble être plus efficace.

Il est à retenir que la variation du rendement d'extraction pourrait être attribuée à l'origine géographique de la plante, à la technique d'extraction, aux facteurs climatiques, mais également à la période de cueillette de la matière végétale et la partie de la plante étudiée (Smith et al., 2005).

III-1-3- Analyse chromatographique de l'huile essentielle d'*Inula viscosa* L. par la CPG

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle de l'espèce *I.viscosa*, a permis d'identifier 25 composés (tableau VII) qui ont donné après identification des pics de chromatogramme qui correspondent à des indices de rétentions allant de 913 à 1299 (figures 17 et 18)

Tableau VII : Composition chimique de l'huile essentielle de l'*Inula viscosa* L.

Composés	Indice de rétention	Concentration (%)
1. 2 ,6- Diéthyl pyrazine	913	0,230
2. α -Thujene	933	0,41
3. 5-Méthyl furfural	963	0,45
4 .o-Cymene	1022	0,17
5. 2-Nonanone	1091	0,13
6.Maltol	1107	0,15
7.1-Octen-3-yl acetate	1111	0,43
8.cis-Verbenol	1141	0,13
9.Ipsdienol	1147	0,10
10.p-Mentha-1,5-dien-8-ol	1159	0,25
11.Borneol	1165	0,11
12.Umbellulone	1171	0,14
13.Terpinen-4-ol	1178	0,60
14.p-Cymen-8-ol	1182	0,46
15.a-Terpineol	1187	0,63
16.Dhydro carveol	1192	0,36
17. Iso-Dihydrocarveol	1211	<u>5,04</u>
18.trans-Carveol	1215	0,36
19.neo-iso-Dihydrocarveol	1224	0,79
20. z-Ocymenone	1231	0,74
21.Carvone	1241	0,08
22.Geraniol	1255	1,10
23.Chrysanthenyl aceta	1264	<u>2,17</u>
24.Thymol	1289	<u>6,93</u>
25.Carvacrol	1299	<u>2,29</u>

D'après les résultats obtenus, nous constatons que les monoterpènes oxygénés sont les constituants principaux de l'huile essentielle d'*I.viscosa*, et les composés majoritaires sont le thymol (6,93%) l'iso-Dihydrocarveol (5,04%) et carvacrol (2,27%). Les composés identifiés sont différents de ceux décrits par Abu Zarga et al. (2002) et Perez-Alonso et al. (1996).

Il est toutefois à signaler que la composition chimique des huiles essentielles d'une plante dépend de plusieurs facteurs tels que l'origine, le stade de croissance, les influences environnementales et le patrimoine génétique (Amarti et al., 2008).

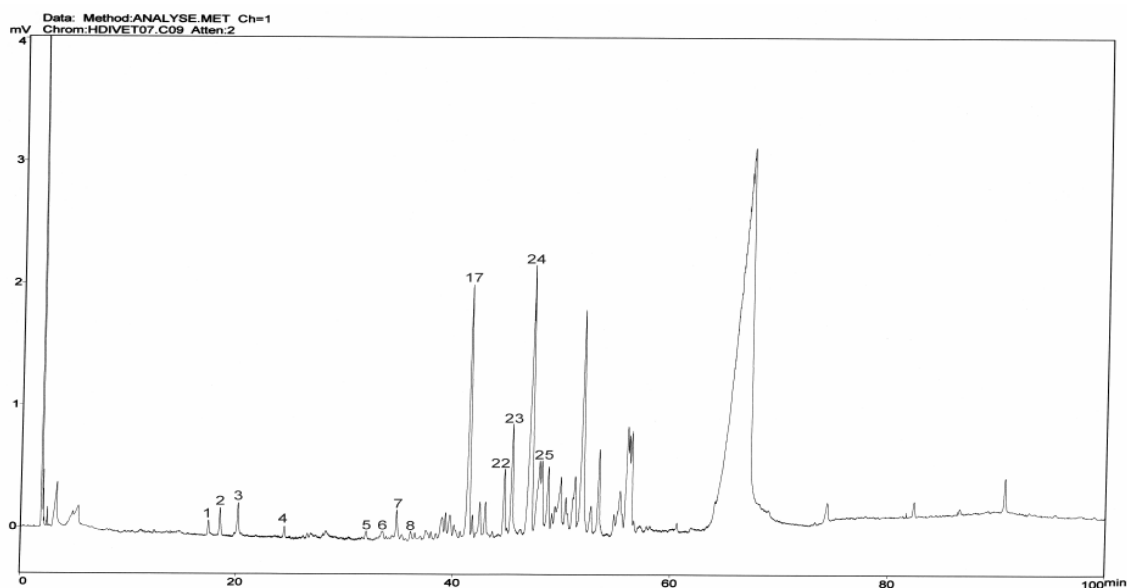


Figure 17 : Chromatogramme de l'huile essentielle de l'inule visqueuse (complet)

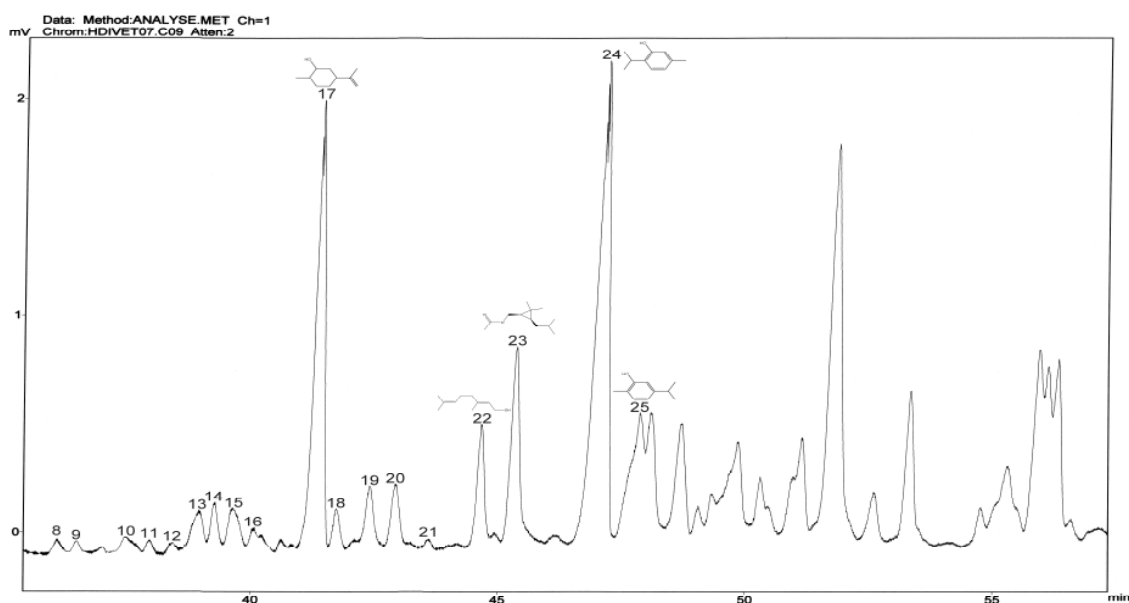


Figure 18 : Chromatogramme de l'huile essentielle de l'inule visqueuse (partiel)

III- 2- Activité antioxydante

De nombreuses méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro*. Ces méthodes se basent exclusivement sur la capacité réductrice ou de piégeage des radicaux comme étant un indicateur de son potentiel antioxydant (Javanmardi *et al.*, 2003 ; Marc *et al.*, 2004).

Les activités antioxydantes des huiles essentielles ont été menées par quatre méthodes complémentaires: piégeage du radical (DPPH[•]), Trolox Equivalent Antioxydant Capacity (TEAC) ou inhibition du radical (ABTS^{•+}), activité scavenger du H₂O₂ et l'estimation du pouvoir réducteur.

Comme il n'y a pas de consensus scientifique pour une méthode de référence pour évaluer l'activité antioxydante d'un échantillon, ainsi la combinaison de différents tests est un indicateur de la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Amic *et al.*, 2003).

III-2-1- Activité antiradicalaire contre le radical DPPH

Le radical DPPH[•] se réduit en présence d'antioxydant qui entraîne sa décoloration (Siddhuraju, 2006 ; Erkan *et al.*, 2008) par transfert de protons (figure 19). Ainsi la coloration violette typique du radical DPPH[•] se dissipe et l'intensité de la réaction dépendra du potentiel antioxydant des substances testées (Elmastas *et al.*, 2006 ; Szabo *et al.*, 2007). La figure suivante montre le mécanisme de réduction du radical DPPH.

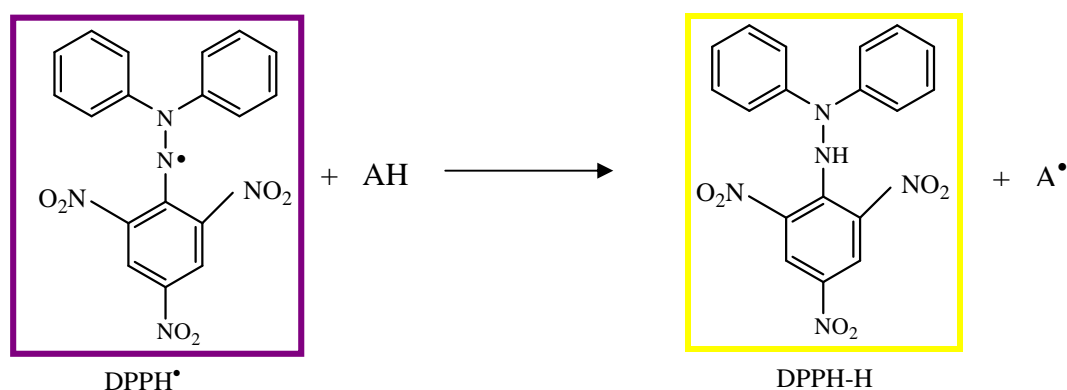


Figure 19 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant (Amic *et al.*, 2003).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire des huiles essentielles et des standards exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont illustrés dans les figures 20 et 21.

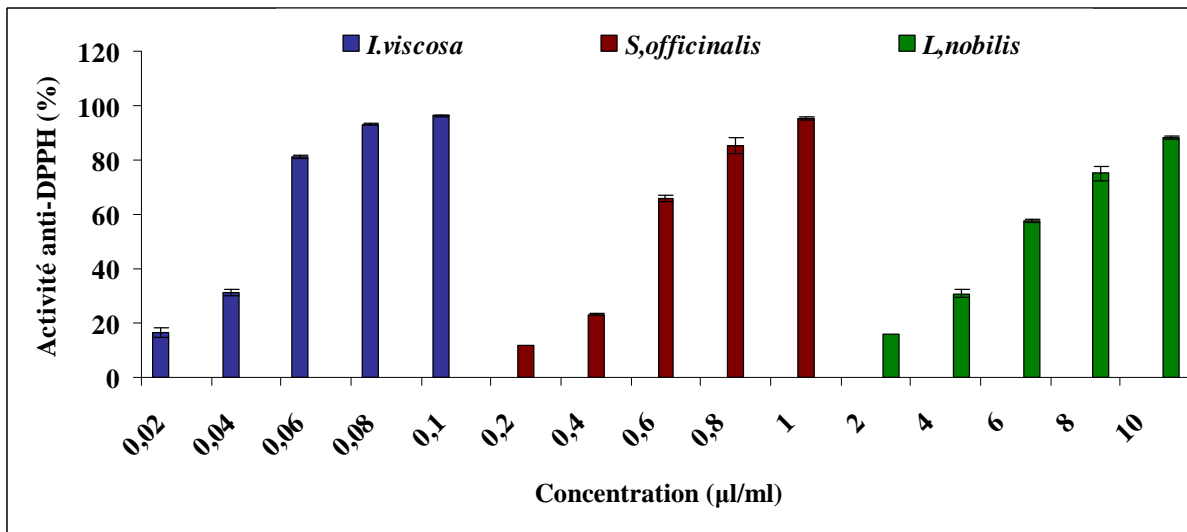


Figure 20: Effet scavenger contre le radical DPPH des huiles essentielles à différentes concentrations.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

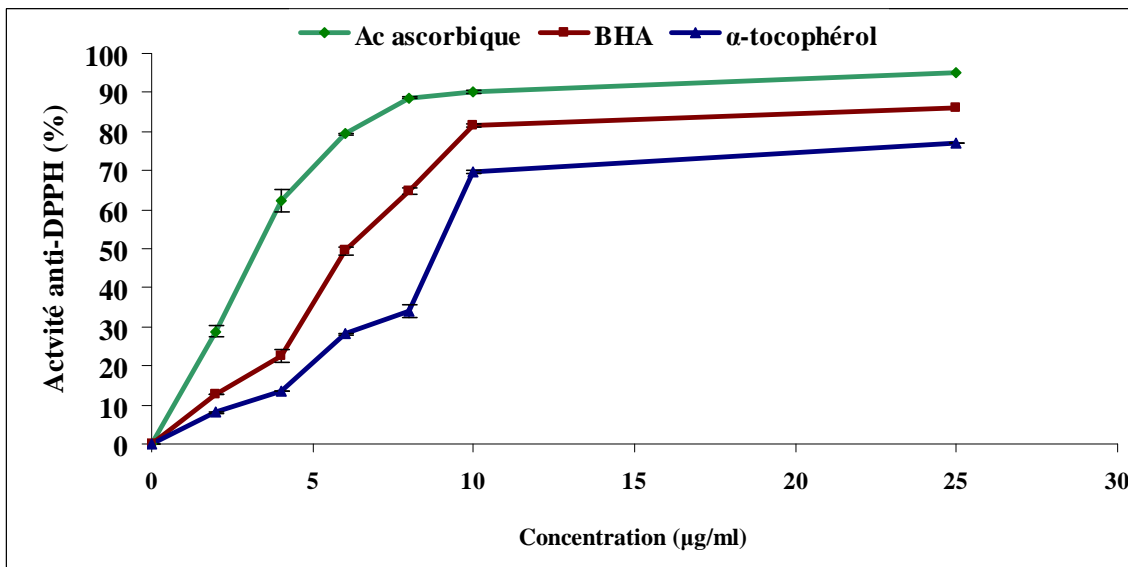


Figure 21: Effet scavenger contre le radical DPPH des standards à différentes concentrations.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

Selon les résultats obtenus, et en comparant l'activité antiradicalaire entre les standards utilisés et les huiles essentielles étudiées, l'effet scavenger augmente significativement ($P < 0.05$) en augmentant la concentration. Les standards sont testés aux mêmes concentrations (figure 21), pour l'acide ascorbique le pouvoir antiradicalaire varie de

28,85 à 90,25% quant au BHA ce pouvoir varie de 12,75 à 90,25%. En revanche, l' α -tocophérol a exprimé un faible pourcentage d'inhibition qui est de 8,04 à 77,23%.

Le pourcentage d'inhibition diffère significativement ($P < 0.05$) entre les trois huiles essentielles (figure 20). L'effet scavenger de l'espèce *I.viscosa* L varie de 16,50 à 96,36% pour des concentrations allant de 0,02 à 0,1 $\mu\text{l/ml}$, de même l'activité antiradicalaire de l'huile de *S.officinalis* L augmente significativement de 11,83 à 89,26% pour des concentrations allant de 0,2 à 1 $\mu\text{l/ml}$, qui sont 10 fois plus que celles utilisées pour *I.viscosa* L. quant à l'espèce *L.nobilis* L. l'effet scavenger varie de 15,77 à 88,33% mais avec des concentrations qui vont de 1 à 10 $\mu\text{l/ml}$ et qui sont 10 fois plus que celles utilisées pour *I.viscosa* L et 100 plus que celles utilisées pour *L.nobilis* L.

-Détermination des IC₅₀ des huiles essentielles et les standards

La valeur IC₅₀ (autrement appelée concentration inhibitrice à 50%) est déterminée pour les huiles essentielles et les standards utilisés. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH, ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution initiale du DPPH. Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Villano et al., 2007).

D'après le tableau VII, les valeurs d'IC₅₀ obtenues confirment les résultats qui ont été cités ci-dessus. L'acide ascorbique a montré la plus faible IC₅₀ ($P < 0.05$) par rapport aux autres substances testées (3,36 $\mu\text{g/ml}$), reflétant ainsi un potentiel anti-radicalaire important. En revanche, le BHA et l' α -tocophérol expriment des IC₅₀ proches de 18,83 $\mu\text{g/ml}$ à 23,19 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Les résultats obtenus avec l'acide ascorbique et l' α -tocophérol peuvent d'ailleurs être appuyés par ceux obtenus par Tepe et al. (2005) et Kelen et Tepe (2008).

L'huile d'*I.viscosa* montre la plus grande activité avec une IC₅₀ de 65,82 $\mu\text{g/ml}$ (correspondant à 0,48 $\mu\text{l/ml}$) mais qui reste inférieure aux standards utilisés. Quant aux huiles de *L.nobilis* et *S.officinalis*, ces dernières présentent des IC₅₀ dépassant 100 $\mu\text{g/ml}$. Kamatou et al. (2008) ont rapporté des IC₅₀ supérieures à 100 $\mu\text{g/ml}$ pour les huiles essentielles des espèces du genre *Salvia* d'origine d'Afrique. Kelen et Tepe (2008) rapportent quant à eux des IC₅₀ de 12,26 et 24,19 $\mu\text{g/ml}$ pour des huiles de *Salvia aramiensis*, *Salvia aucheri* respectivement d'origine d'Europe.

Tableau VIII : IC₅₀ des huiles essentielles et des standards contre DPPH.

Standards et les huiles	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>I. viscosa</i>	65,82±0.48 ^c
<i>S. officinalis</i>	360,45±0.57 ^d
<i>L. nobilis</i>	3932,03±0.36 ^e
A.ascorbique	3,36±0.28 ^a
α-tocophérol	23,19±58 ^b
BHA	18,83±1.02 ^b

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

*Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P< 0.05), les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e.

Aucune des huiles n'a montré une activité aussi forte que les antioxydants de synthèse. Il a été rapporté par plusieurs auteurs que les antioxydants de synthèse possèdent plus d'aptitude à piéger le radical DPPH que les huiles essentielles (Avlessi et *al.*, 2004; Tepe et *al.*, 2006 ; Kelen et *al.*, 2008).

L'activité antiradicalaire se classe donc dans l'ordre décroissant suivant : Acide ascorbique >BHA > α-tocophérol >*I.viscosa* > *S.officinalis*> *L.nobilis*.

III-2-1- La Capacité Antioxydante en Équivalent Trolox

L'essai à l'ABTS ou la méthode mesurant la Capacité Antioxydante en Équivalent Trolox (TEAC), est utilisée pour déterminer le potentiel antioxydant de plusieurs substances et extraits végétaux (Marc et *al.*, 2004).

L'activité antioxydante totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS incolore, en présence de proton issu d'un antioxydant (figure 22) (Millers et *al.*, 1993 ; Re et *al.*, 1999 ; Diamanti, 2008). L'obtention du radical cationique ABTS^{•+} résulte du contact de l'ABTS avec le persulfate du potassium (Re et *al.*, 1999 ; Marc et *al.*, 2004).

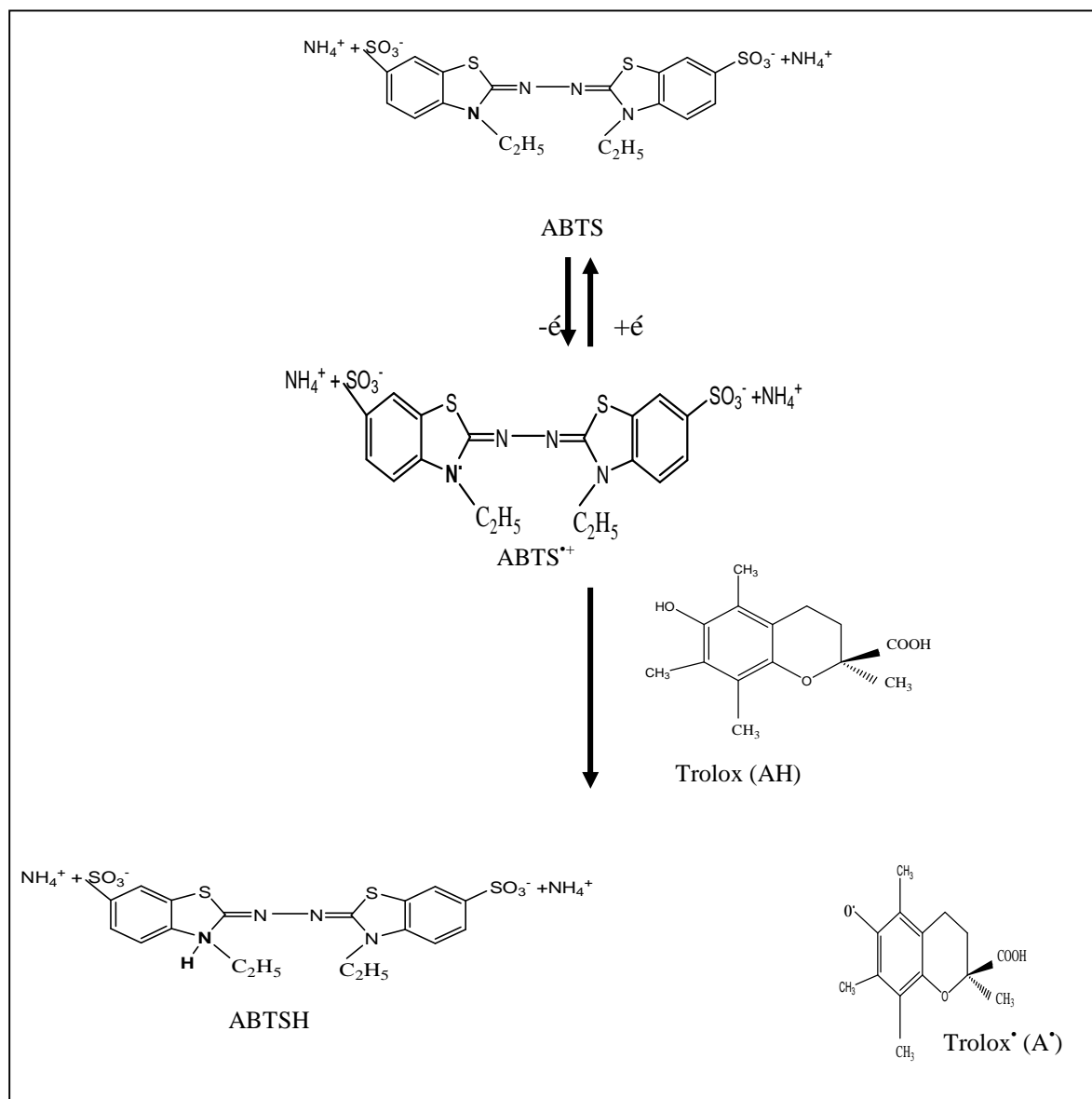


Figure 22: Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant (Marc et al., 2004).

Selon les résultats obtenus (figure 23), en comparant les absorbances mesurées en fonction du temps avec le témoin (ABTS seul) et celles obtenues en présence des huiles essentielles, une diminution importante de l'absorbance est causée par les huiles reflétant ainsi leurs capacités à piéger le radical ABTS. Une diminution des absorbances est constatée dès la première minute, ces absorbances vont de 0,7 à 0,291 et à 0,185 pour *L.nobilis* et *S.officinalis*, respectivement, et de 0,7 à 0,055 pour l'espèce *I.viscosa*, exprimant ainsi un effet scavenger plus important. D'autre part, toutes les huiles atteignent un état d'équilibre après la deuxième minute où les absorbances se stabilisent à 0,191, 0,297 et à 0,057 pour la, *S.officinalis*, *L.nobilis* et *I.viscosa* respectivement, ce qui indique que la réaction entre les

huiles étudiées et le radical ABTS se passe dans les premières minutes, expliquant ainsi la sensibilité de ce dernier vis-à-vis des substances utilisées.

Les mêmes constatations sont signalées par plusieurs auteurs concernant l'aspect cinétique de la réaction de piégeage du radical cationique $ABTS^{\cdot+}$, qui est un marqueur de l'efficacité des antioxydants (Re et al., 1999 ; Akerstrom et al., 2007 ; Erken et al., 2008).

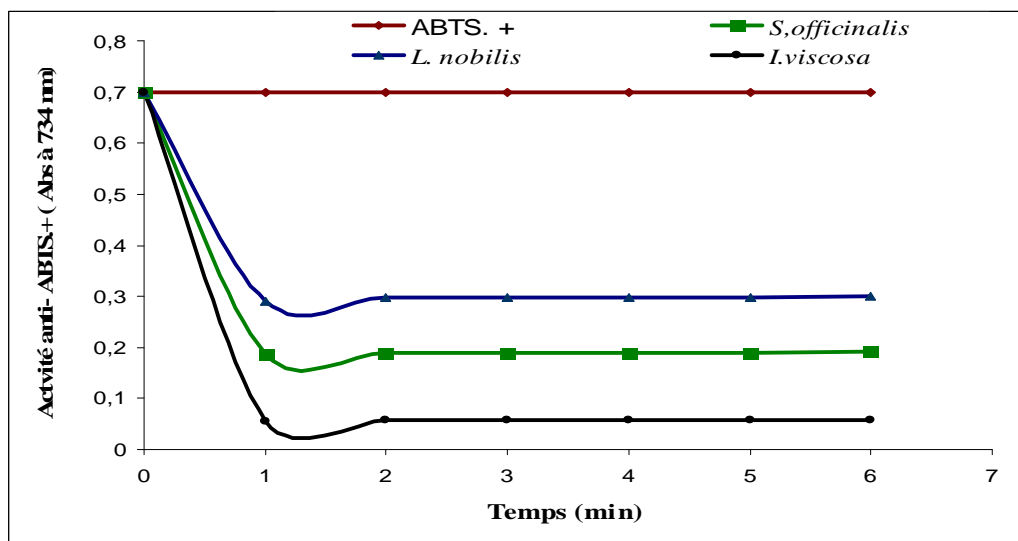


Figure 23: L'effet scavenger contre le radical ABTS des huiles essentielles à 100 µl/ml en fonction du temps.

Les résultats de l'activité scavenger contre le radical ABTS, exprimés en pourcentage d'inhibition à 100µl/ml de l'huile, ainsi que l'effet scavenger exprimé en TEAC sont résumés dans le tableau IX.

Les valeurs du pourcentage d'inhibition vont de 58,74 à 86,86% pour les trois huiles étudiées avec des différences significatives ($P < 0,05$). La plus forte activité est observée avec l'huile d'*I. viscosa* suivie de celle de *S. officinalis*, par contre, une faible activité est observée avec l'huile de *L. nobilis*. Ainsi, l'huile essentielle d'*I. viscosa* présente la valeur la plus élevée en équivalent Trolox (19,94 mM Trolox/ml) suivi de celles des huiles de *L. nobilis* et *S. officinalis* avec des valeurs de 13,48 et de 16,8 mM Trolox/ml, respectivement.

Tableau IX : Activité scavenger des huiles essentielles à une concentration de 100 µl/m

Standards et les huiles	(%) scavenger	TEAC (mM Trolox/ml)
<i>I.viscosa</i>	86.86±0.18 ^c	19,94±0.38 ^c
<i>L.nobilis</i>	58.74±0.32 ^a	13,48±0.46 ^a
<i>S.officinalis</i>	73 .24±0.42 ^b	16, 81±1.02 ^b

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

*Les valeurs obtenues pour chaque paramètre sont classées par ordre croissant a<b<c<, désignées la différence significative (P< 0.05).

L'analyse des résultats des tests DPPH et ABTS montre que l'aptitude des huiles essentielles à piéger ces radicaux est similaire. Les mêmes résultats ont été rapportés par Erken et ses collaborateurs (2008).

La divergence des résultats entre les antioxydants utilisés pourrait être attribué à plusieurs facteurs. En effet, l'acide ascorbique qui est connu comme étant un antioxydant pauvre en noyau phénolique mais avec quatre groupements hydroxyles (Erkan et *al.*, 2008), a montré une très forte activité antiradicalaire par rapport au BHA et à l' α -tocophérol avec un et deux groupements hydroxyles liés à un noyau aromatique respectivement (figure 24). En outre, Brand-Williams et al. (1995) ont montré que l'acide caféique portant deux groupements hydroxyles a eu une très forte activité scavenger contre le radical DPPH que l'acide rosmarinique, portant quatre groupements hydroxyles. Ainsi, le nombre de groupements hydroxyles présents dans la structure chimique d'une molécule antioxydante n'est pas toujours le seul facteur déterminant son activité antioxydante (Choi et *al.*, 2002 ; Jun et *al.*, 2005). La position des groupements hydroxyles, la présence d'autres groupes fonctionnelles dans la molécule telles que les doubles liaisons conjuguées avec les groupements OH également ainsi le caractère hautement nucléophilique du noyau aromatique jouent des rôles importants dans les activités antioxydantes (Erkan et *al.*, 2008). Tous ces paramètres permettent une délocalisation des électrons offrant une résonance et une structure stable à cette molécule antioxydante.

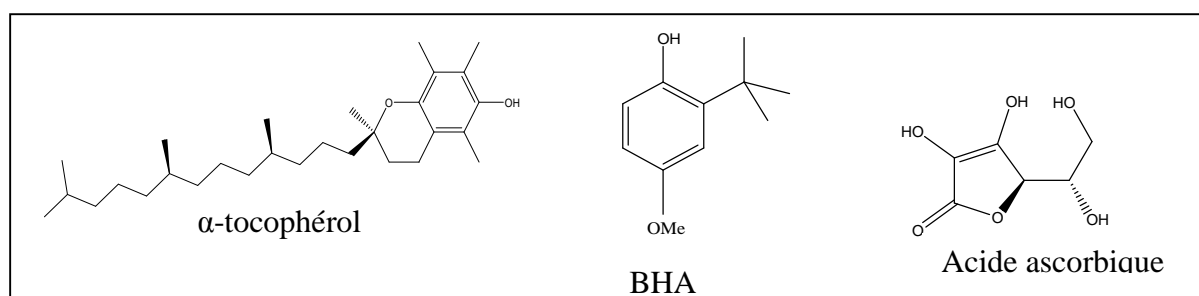
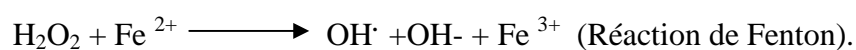


Figure 24: Structure chimique des antioxydants de synthèse (Marc, 2004).

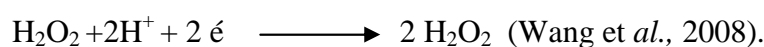
III-2-4- Activité scavenger du H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive non radicalaire ayant tous ses électrons périphériques appariés, plus stable que le radical superoxyde, mais c'est un redoutable précurseur de radicaux libres (Halliwell, 2000). L'absence de charge à sa surface rend cette espèce réactive très lipophile et peu réactive en milieux aqueux et la majeure part de sa toxicité provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle (HO[•]).

En effet, le peroxyde d'hydrogène en présence des ions ferriques (Fe²⁺) donne le radical hydroxyle par la réaction de Fenton ou bien par la réaction de Haber-Weiss (De Leiris, 2003 ; Vamecq *et al.*, 2004 ; Edreva *et al.*, 2005).



Le test H₂O₂ choisi pour cette étude, est basé sur le piégeage du radical libre stable H₂O₂ par une molécule antiradicalaire, ce qui entraîne sa décomposition en molécule d'eau (Rajeshwar *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2008) selon la réaction suivante :



Selon les figures 25 et 26, l'activité scavenger du H₂O₂ augmente significativement (P<0.05) avec l'élévation de la concentration des huiles essentielles et des antioxydants de synthèse (Acide ascorbique, BHA, α-tocophérol).

Les résultats obtenus pour les standards (figure 26) montrent que les pouvoirs antiradicalaires les plus élevés sont obtenus avec le BHA et l'α-tocophérol qui ne présentent pas de différence significative (P<0,05) ceci se traduit par des pourcentages d'inhibition qui varient de 31,86 à 98,96 % à des concentrations allant de 0,02 à 0,08 mg/ml. Tandis que l'acide ascorbique présente presque les mêmes pourcentages d'inhibition, mais à des concentrations allant de 0,2 à 0,8 mg/ml, qui sont dix fois supérieures à celles utilisées pour les premiers standards et qui représente ainsi un faible effet scavenger.

Les huiles essentielles sont utilisées à des concentrations identiques pour ce test (figure 25). A des concentrations allant de 0,02 à 0,15 µl/ml, les pourcentages d'inhibition varient de 10,23 à 96,02% et de 7 à 82,56% pour les deux espèces *I.viscosa* et *S.officinlais*, respectivement. Les plus faibles pourcentages sont présentés par *L.nobilis* qui sont de 4,25 à 55,99%.

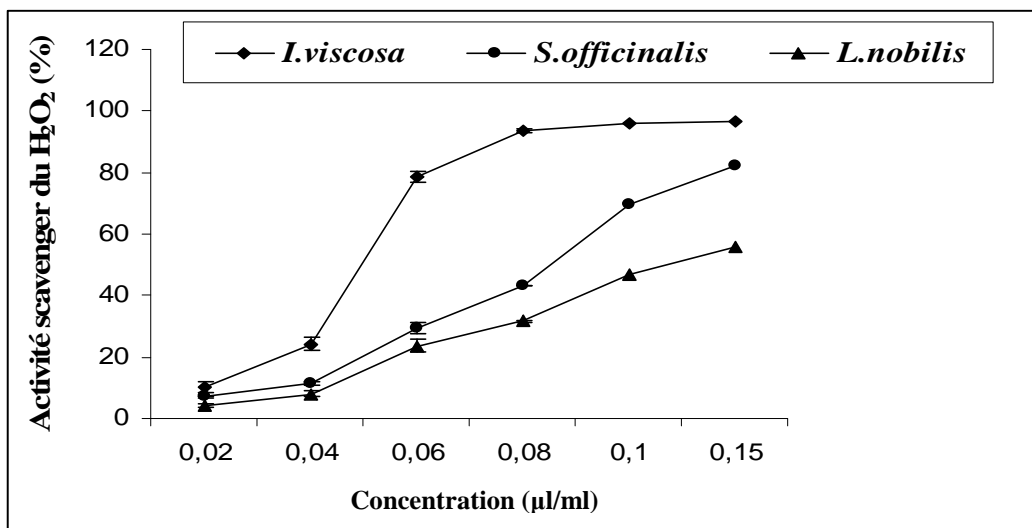


Figure 25: L'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène des huiles essentielles à différentes concentrations

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

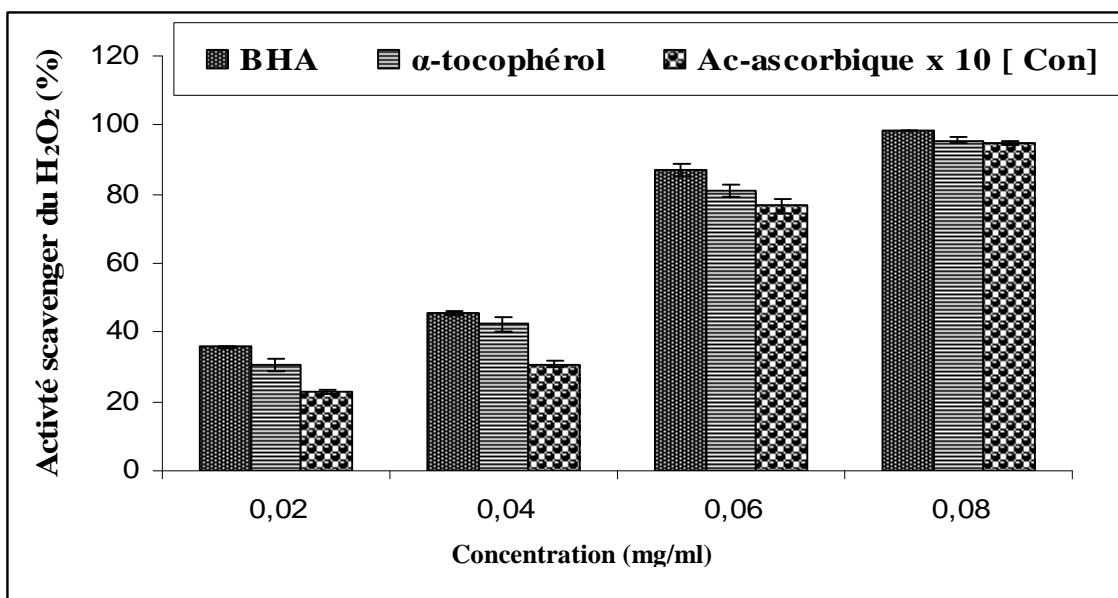


Figure 26: L'activité scavenger du peroxyde d'hydrogène des antioxydants de synthèse à différentes concentrations

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

-Détermination des IC₅₀ des huiles essentielles et des standards

D'après le tableau X, l'huile d'*I.viscosa* ayant exprimé un effet scavenger important contre le radical H₂O₂, avec une IC₅₀ inférieure à 43 µg/ml, qui ne présente aucune différence significative (P<0,05) par rapport au BHA et au α-tocophérol. Des valeurs importantes sont aussi enregistrées avec les deux autres huiles avec une IC₅₀ de 71,92 et de 107,38 µg/ml pour *S.officinalis* et *L.nobilis*, respectivement, mais qui représentent un potentiel scavenger significativement (P<0,05) inférieur par rapport à l'huile d'*I.viscosa*. L'acide ascorbique a montré l'effet antiradicalaire le plus faible contre le radical H₂O₂ avec une IC₅₀ dépassant 400 µg/ml, et qui est loin d'être comparé aux IC₅₀ des huiles ou d'autres standards (P<0,05).

De ce fait, l'activité antiradicalaire contre ce radical se classe donc dans l'ordre décroissant suivant : BHA ; α-tocophérol ; *I.viscosa* > *S.officinalis* > *L.nobilis* > Acide ascorbique. Par ailleurs, beaucoup d'études ont démontré que les extraits de plantes ont une meilleure activité antioxydante comparés à la vitamine C (Rice-Evans et al., 1996 ; Espigares et al., 2004, Oboh, 2005).

Comparativement aux standards, d'après les résultats des différentes activités antiradicalaires des huiles essentielles vis-à-vis des radicaux utilisés dans cette étude, les IC₅₀ qui expriment le potentiel antiradicalaire le plus important sont obtenues contre le radical H₂O₂. Ce qui pourrait être expliqué par la nature du milieu réactionnel. La polarité et l'hydrophobicité des antioxydants qui s'ajoutent aux facteurs mentionnés ci-dessus, présentant ainsi des rôles importants dans l'activité antioxydante (Wu et al., 2007). Frankel et Meyer (2000) ont montré que les antioxydants polaires sont plus actifs dans des milieux aqueux tandis que les antioxydants non polaires sont plus actifs dans des milieux hydrophobes que dans des milieux aqueux.

Tableau X : IC₅₀ des huiles essentielles et des standards contre H₂O₂.

Standards et les huiles	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>I. viscosa</i>	41,56±0.89 _a
<i>S. officinalis</i>	71,92 ±0.67 _b
<i>L. nobilis</i>	107,38 ±0.56 _c
A.ascorbique	432,12 ±1.28 _d
α-tocophérol	40,19±0,58 ^a
BHA	38,34±0.92 ^a

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

*Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P< 0.05), les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e.

III-2-4- Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est souvent employé comme indicateur de la capacité d'un composé à céder un électron, de nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme un indicateur significatif de son potentiel antioxydant (Balasundram et al., 2005 ; Wang et al., 2008 ; Yi et al., 2008).

Ce test met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron, permettant ainsi de bien apprécier l'activité antioxydante de l'échantillon testé, elle est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en ion ferreux (Fe^{2+}) (Chu et al., 2000).

La révélation du pouvoir réducteur d'un échantillon est basée sur le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers une couleur bleue verdâtre dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur de chaque échantillon. Le pouvoir réducteur dépend essentiellement de la quantité de réducteurs présents dans le milieu testé, ceci se traduit par l'augmentation de l'absorbance au fur et à mesure que cette quantité s'élève, qu'est estimée par spectrophotométrie à 700nm (Chu et al., 2000 ; Blàzovics et al., 2003).

Comme pour l'activité antiradicalaire, la concentration de l'échantillon (des huiles essentielles ou des standards) a un effet hautement significative ($P < 0.05$) sur le pouvoir réducteur. D'après les figures 27 et 28, le pouvoir réducteur est proportionnel à la concentration en antioxydant. Des observations similaires ont été rapportées par Huang et al. (2004) ; Karamac et al. (2002) et Kůćůk et al. (2005).

Dans ce test, les courbes obtenues montrent que le pouvoir réducteur diffère significativement entre les huiles essentielles ($P < 0.05$). A des concentrations de 2,5 à 20 $\mu\text{l/ml}$, des absorbances sont comprises entre 0,296 à 1,667 pour *L.nobilis*. Quant à l'espèce *I.viscosa* elles varient de 0,199 à 0,818 suivi par l'espèce *S.offcnalis* qui présente des faibles absorbances allant de 0,08 à 0,524.

L'activité réductrice des antioxydants de synthèse (figure 28) a révélé qu'à une concentration de 0.1 mg/ml, l'activité la plus forte est attribuée à l'acide ascorbique (Abs 2,04) suivi par le BHA (1,65) puis par le α -tocophérol (0.342).

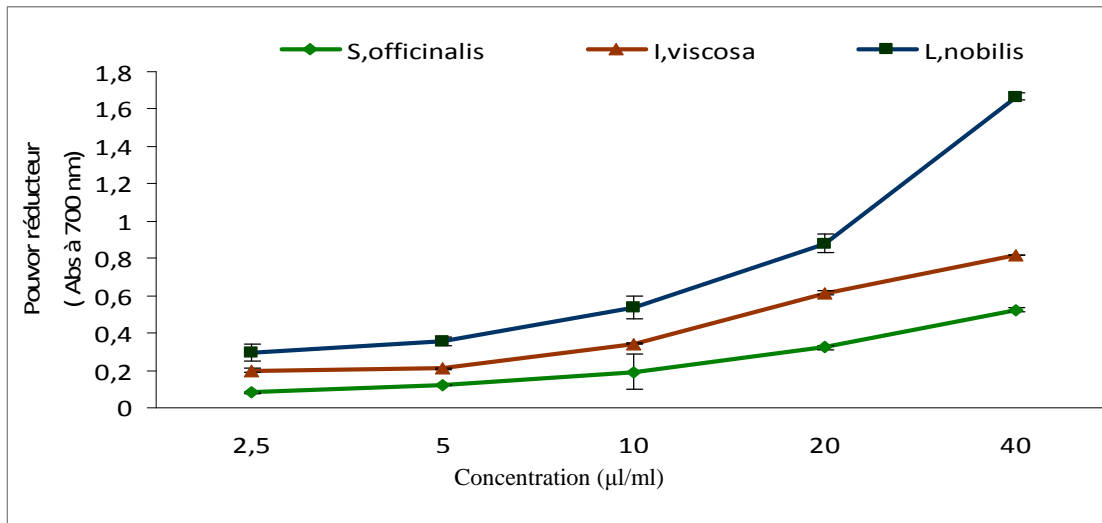


Figure 27 : Pouvoir réducteur des huiles essentielles à différentes concentrations.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

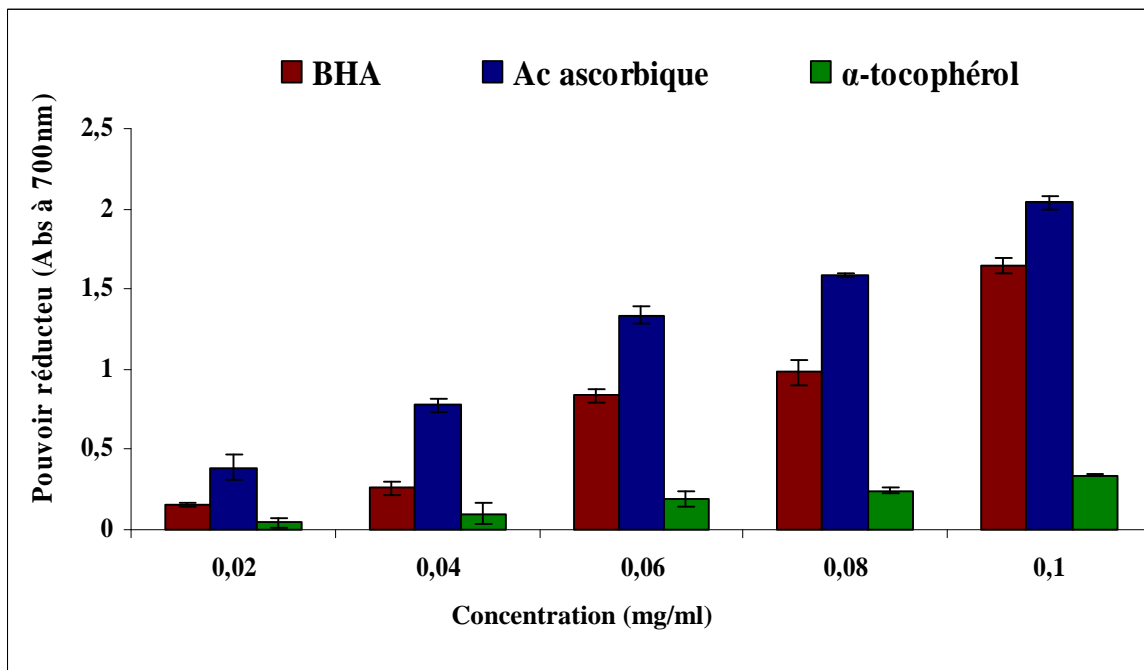


Figure 28 : Pouvoir réducteur des antioxydants de synthèse à différentes concentrations.

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec \pm l'écartype.

En comparant les activités réductrices des huiles essentielles à celles des antioxydants de synthèse (tableau XI), les antioxydants de synthèse ont une plus grande activité réductrice (IC₅₀ varie de 26,66 à 232,5 µg/ml) à celles des huiles essentielles (IC₅₀>1000µg/ml). Ceci pourrait s'expliquer par la pureté des antioxydants de synthèse. Les mêmes constatations ont été révélées par Dorman et al. (2003) et Kanatt et al. (2007).

L'analyse des résultats dévoile que le potentiel réducteur suit l'ordre décroissant suivant : Acide ascorbique >BHA >α-tocophérol > *L. nobilis* > *I. viscosa* > *S. officinalis*.

Tableau XI : IC50 des huiles essentielles et des standards pour le pouvoir réducteur

Standards et les huiles	IC ₅₀ (µg/ml)
<i>I.viscosa</i>	6281,40±0,38 ^e
<i>S.officinalis</i>	11750,5±1,07 ^f
<i>L.nobilis</i>	2635,13±0,36 ^d
A.ascorbique	26,66±0,02 ^a
α-tocophérol	232,5±0,12 ^c
BHA	76,92±1.02 ^b

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

*Les valeurs désignées avec les mêmes lettres indiquent que la différence n'est pas significative (P< 0.05), les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d<e<f.

Contrairement à l'activité antiradicalaire, l'espèce *L.nobilis* présente l'activité réductrice la plus importante. Les mêmes constatations ont été rapportées par Alonso et al. (2000) concernant la fluctuation des résultats entre les différents tests antioxydants. L'acide gallique était en première place pour le test DPPH et la rutine a donné les valeurs les plus faibles, alors que pour le pouvoir réducteur c'est la catéchine qui a affiché des valeurs significativement plus élevées. Ces variations pourraient être attribuées aux facteurs structuraux des différents antioxydants (Alonso et al., 2000).

L'analyse des résultats de l'activité antioxydante des huiles testées montre une différence significative entre elles d'une part et entre l'effet scavenger et le pouvoir réducteur d' autre part.

L'activité antiradicalaire contre les trois radicaux DPPH, ABTS et H₂O₂, montre que la plus grande activité est obtenue avec l'huile d'*I.viscosa*, suivi respectivement par celles des espèces *S.officinalis* et *L.nobilis*.

Ces variations peuvent être attribuées à la composition chimique des huiles testées. La présence des deux phénols (thymol et carvacrol) et qui sont parmi les composés majeurs de l'essence d'*I.viscosa*, peut expliquer l'origine de l'activité antiradicalaire de cette plante.

Plusieurs études ont montré que les monoterpènes oxygénés (deux composés phénoliques bien connus, thymol et le carvacrol) sont principalement responsables du potentiel antiradicalaire des huiles essentielles (Aeschbach et *al.*, 1994; Laguori et *al.*, 1993; Baratta et *al.*, 1998). En effet, Ruberto et Baratta (2000) confirment que les phénols possèdent l'activité antiradicalaire la plus élevée. En outre, Yanishlieva et ses collaborateurs (1999) ont pris également en considération les monoterpènes hydrocarbures pour l'activité antioxydante des huiles essentielles, mais d'après ces mêmes auteurs, le thymol et le carvacrol présentent toujours l'activité la plus forte par rapport aux autres composés.

Selon Gulcin et ses collaborateurs (2004), l'activité scavenger d'un extrait peut être attribuée à la structure de ses composés actifs qui déterminent leur capacité à céder un proton. Par contre, le pouvoir réducteur d'un extrait peut être lié à la capacité des substances à transférer des électrons dans le milieu réactionnel (Hinneburg et *al.*, 2006), ce qui pourrait être à l'origine des résultats observés. Cependant, les phénols ne sont pas les seuls responsables de l'intégrité de l'activité antioxydante, la totalité de la composition chimique doit être prise en considération.

En effet, certaines études ont montré que l'activité antioxydante des huiles essentielles peut être supérieure à celle des composés majoritaires testés séparément (Janssen et *al.*, 1988 ; Tepe et *al.*, 2005. Bakkali et *al.*, 2008). Cette dominance d'activité des essences sur celle d'un composant majoritaire confirme bien l'effet de synergie qui pourrait apporter les composants minoritaires à l'activité des huiles essentielles (Tepe et *al.*, 2005 ; Wang et *al.*, 2008).

Avec les résultats actuels, il est difficile d'attribuer l'effet antioxydant des huiles essentielles à un ou certains composés car du point de vue chimique, une huile essentielle est un mélange de plusieurs dizaines de composés, cette complexité rend souvent difficile l'explication du mode d'activité des huiles essentielles.

III- 2-5-Corrélation entre les tests utilisés

Les antioxydants peuvent exercer des activités antiradicalaires ou réductrices grâce à leurs propriétés redox qui leur permet d'agir comme étant des agents réducteurs et /ou donneurs d'électrons (Naik et *al.*, 2003 ; Gulcin et *al.*, 2005).

Dans ce travail, l'existence d'une très bonne corrélation entre les différents tests de l'activité antiradicalaire dont les coefficients de corrélation varient de 0,985 à 0,997 est prouvé d'une part, et entre l'activité antiradicalaires et le pouvoir réducteur, dont les coefficients de corrélations allant de 0,852 à 0,925 d'autre part (figure 29). Néanmoins il y a une excellente corrélation entre l'activité antiradicalaire avec les deux radicaux DPPH et ABTS ($r=0,997$). Des résultats similaires sont trouvés par Leong et Shui, (2002) qui ont obtenu un coefficient de corrélation de 0,99 pour ces deux méthodes.

L'ensemble des résultats obtenus indique une très bonne corrélation qui peut être expliquée par la teneur de ces huiles étudiées en substances ayant à la fois une activité réductrice et antiradicalaire.

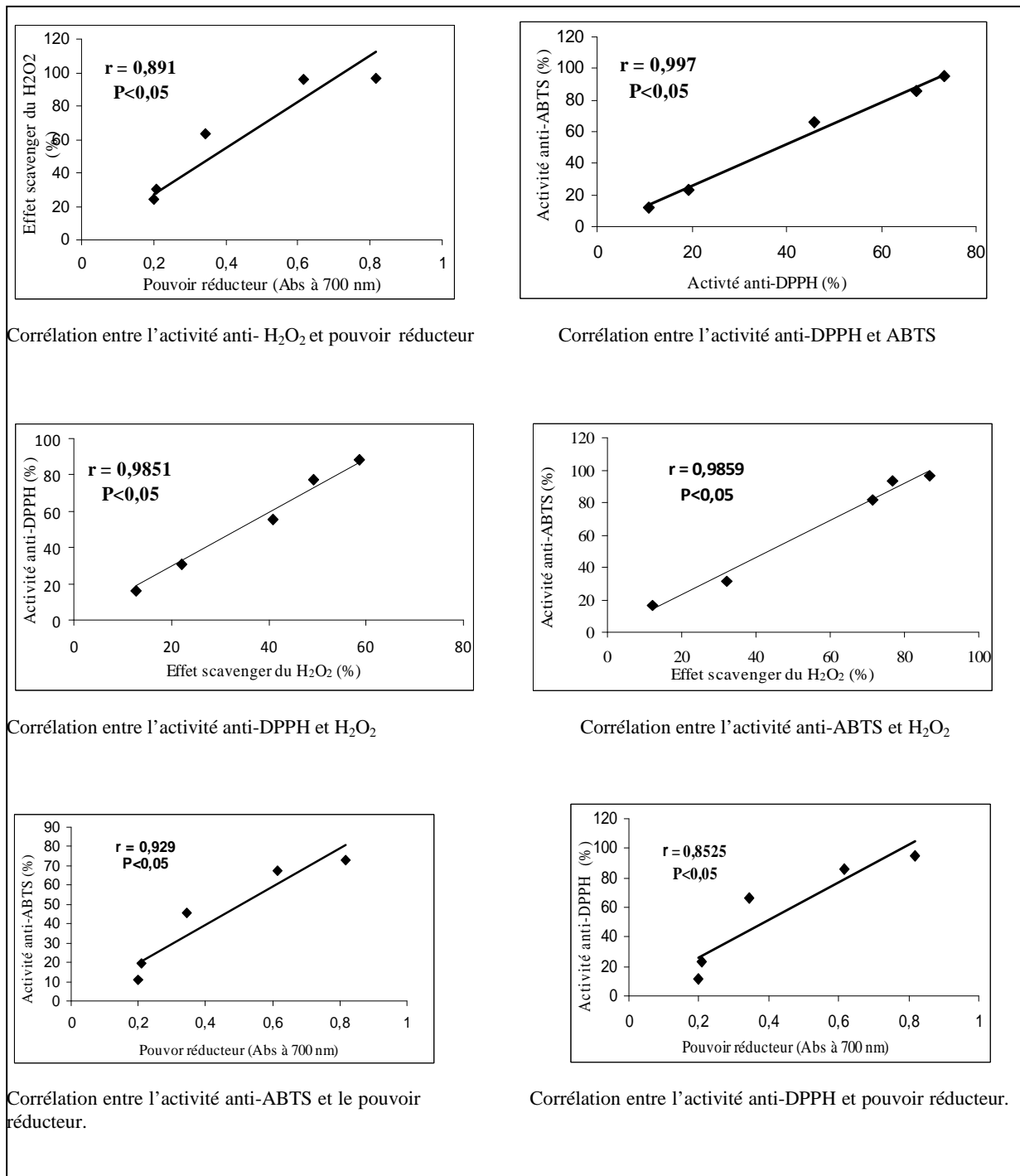


Figure 29 : Corrélation entre les différents tests de l'activité antioxydante des huiles essentielles.

III-3- Activité antibactérienne

Suite à la détermination des propriétés antioxydantes des espèces *Inula viscosa* L., *Salvia officinalis* L. et *Laurus nobilis* L, nous avons entrepris de tester l'activité antibactérienne de ses huiles essentielles par la technique d'aromatogramme ou du disque, une méthode qualitative de diffusion sur gélose.

La taille de l'inoculum est un paramètre déterminant de la fiabilité et de la reproductibilité du résultat. Un inoculum trop dense peut masquer un effet antibactérien et conduire à des résultats faussement négatifs. Un inoculum trop faible peut être à l'origine de tapis irréguliers rendant la lecture ambiguë et peut mener à des résultats faussement positifs. Nous avons donc opté à la méthode de dénombrement sur le milieu gélosé PCA, pour ajuster la turbidité de l'inoculum d'environ 10^7 UFC/ml, afin d'obtenir des tapis de colonies confluentes et suffisamment denses.

Le volume de l'inoculum par boîte de Pétri est de 1 ml pour avoir des étalements très homogènes des colonies après incubation. En effet, nous avons noté que des tapis trop irréguliers peuvent aussi rendre la lecture de certains aromatoigrammes ambiguë.

Etant donné la non miscibilité des huiles dans l'eau et les milieux aqueux utilisés en bactériologie, un solvant apolaire « DMSO » est utilisé pour préparer les différentes dilutions. Comme il peut par lui-même exercer un effet antibactérien nous avons effectué un témoin sans extrait. Nous avons obtenu un résultat négatif avec ce témoin, ce qui signifie que le solvant choisi ne présentant aucun effet sur la croissance des bactéries à étudier. Ceci est en accord avec plusieurs travaux utilisant le DMSO lors du criblage de l'activité antibactérienne des huiles essentielles (Maoz et Neeman, 2000 ; Thi Dung *et al.*, 2008 ; Schelz *et al.*, 2006).

III-3-1- Confirmation des souches

Dans cette étude, les souches bactériennes étudiées sont des souches de références, c'est à dire des souches préalablement déterminées, quelques tests biochimiques sont réalisés dans le but de confirmer l'appartenance de ces souches et d'autre part, de vérifier la pureté des cultures bactériennes. L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le tableau XII.

Tableau XII : Caractérisation biochimique des souches bactériennes

Souches Tests	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>L. innocua</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Gram	-	-	+	+	-
Mobilité	+	-	+	-	+
Catalase	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	-
Citrate	-	+	-	-	+
Glucose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	+	+
Saccharose	+	+	-	-	-
H ₂ S	+	-	-	-	-
Gaz	+	+	-	-	-
Uréase	-	-	-	+	+
Indole	+	-	-	+	-
RM	+	+	+	-	-
VP	-	+	+	+	+
Coagulase	-	-	-	+	-
ADH	+	-	-	+	-
LDC	+	-	-	+	+
ODC	+	-	-	-	+
Nitrate réductase	+	+	-	+	+
King A	-/-	-/-	-/-	-/-	+
King B	-/-	-/-	-/-	-/-	+

-/- : Non déterminée

III-3-2- Antibiogramme

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de six antibiotiques par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Résultats de l'antibiogramme (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

ATB Souches	OFX (5 µg)	E (10 UI)	PG (6 µg)	AMP (10 µg)	C (30 µg)	G (15 µg)
<i>E. coli</i>	-/-	6±00 ^R	-/-	7±1,24 ^R	23±0,8	-/-
<i>K. pneumoniae</i>	29±0,98	19±0,4 ^R	6±0,2 ^R	-/-	25±0,25	-/-
<i>L. innocua</i>	31±0,57	11±1,69 ^R	6±00 ^R	-/-	-/-	29±0,86
<i>S. aureus</i>	22,5±0,67	-/-	8±1,8 ^R	6±00 ^R	18±0,9 ^R	-/-
<i>P. aeruginosa</i>	21,5±0,14 ^R	-/-	6±0,25 ^R	-/-	-/-	12±2,23 ^R

Le diamètre des disques est pris en considération.

-/- : Non testé.

R: Bactérie est résistante

La comparaison des résultats trouvés avec ceux des tableaux des CASFM (2009), permet de conclure que la plupart des souches bactériennes utilisées sont résistantes aux antibiotiques.

III-3-4-Pouvoir antibactérien des huiles essentielles

Dans le cas particulier de la thérapeutique antimicrobienne, les phénomènes de résistances microbiennes et les effets secondaires des antibiotiques imposent la recherche permanente de nouvelles molécules efficaces et non toxiques (Zouhdi et al., 1997).

L'objectif de présent travail est de mettre en évidence par la technique d'aromatogramme l'activité antibactérienne des huiles essentielles vis-à-vis des souches pathogènes de référence et multirésistantes.

Les résultats illustrés dans le tableau XIV, montrent la variation de l'activité antibactérienne en termes de diamètres d'inhibition en fonction de type et de la concentration des huiles essentielles étudiées et en fonction de la souche bactérienne.

Tableau XIV : Activité antibactérienne des huiles essentielles d'*I. viscosa*, *S. officinalis* et *L. nobilis*

Plante Souches	Diamètres des zones d'inhibition en (mm)											
	<i>Inula viscosa</i>				<i>Salvia officinalis</i>				<i>Laurus nobilis</i>			
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/1	1/2	1/4	1/8	1/1	1/2	1/4	1/8
<i>Escherichia coli</i>	31,5 ^a ± 0,8	21,5 ^b ± 0,8	10,5 ^d ± 0,16	9,5 ^d ± 0,12	24,5 ^b ± 0,12	9,5 ^d ± 0,9	7,5 ^d ± 0,4	06 ^d ± 00	29,5 ^a ± 0,23	16,5 ^c ± 0,24	8,5 ^d ± 0,04	06 ^d ± 00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29,5 ^a ± 0,02	15,5 ^b ± 0,12	8,5 ^c ± 0,11	06 ^c ± 00	22,5 ^a ± 0,37	12,5 ^b ± 1,5	8,5 ^c ± 1,1	06 ^c ± 00	26,6 ^a ± 1,5	13,5 ^b ± 0,17	8,33 ^c ± 0,56	06 ^c ± 00
<i>Listeria innocua</i>	28,5 ^a ± 0,4	19,00 ^b ± 0,1	9,5 ^c ± 0,7	7,5 ^c ± 00	26,5 ^a ± 0,11	9,5 ^c ± 0,40	8,5 ^c ± 1,07	06 ^c ± 1,15	25,5 ^a ± 0,11	14,5 ^b ± 0,40	8,5 ^c ± 0,7	06 ^c ± 1,9
<i>Staphylococcus Aureus</i>	43,5 ^a ± 0,1	21,5 ^b ± 0,3	14,5 ^c ± 0,14	06 ^d ± 00	21,5 ^b ± 0,2	18,5 ^c ± 0,05	8,5 ^d ± 0,02	7,5 ^{*d} ± 0,05	29,5 ^b ± 0,2	14,5 ^c ± 0,5	9,5 ^{*d} ± 0,09	06 ^d ± 00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15,5 ^a ± 1,23	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	10,12 ^b ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	7,5 ^c ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00	06 ^c ± 00

*Toutes les valeurs sont exprimées par moyenne de trois essais (n=3) avec ± l'écartype.

*Dans la même ligne les valeurs portant la même lettre ne diffèrent pas significativement, les valeurs sont classées par ordre croissant a<b<c<d.

III-3-4-1- Activité des huiles essentielles sur *Escherichia coli*

Les résultats obtenus indiquent que toutes les huiles ont montré un effet inhibiteur vis-à-vis d'*E. coli*. Des zones d'inhibition allant de 06 mm à 31,5 mm sont observées. Le meilleur résultat obtenu vis-à-vis de cette souche est celui de l'huile brute de *I.viscosa* avec un diamètre d'environ 32mm qui ne présente aucune différence ($P < 0,05$) par rapport à *L. nobilis*, ce qui pourrait indiquer une activité bactéricide de ces huiles vis-à-vis de cette souche. Plus les huiles sont concentrées, meilleure est l'activité, donc l'activité est proportionnelle à la concentration des huiles essentielles.

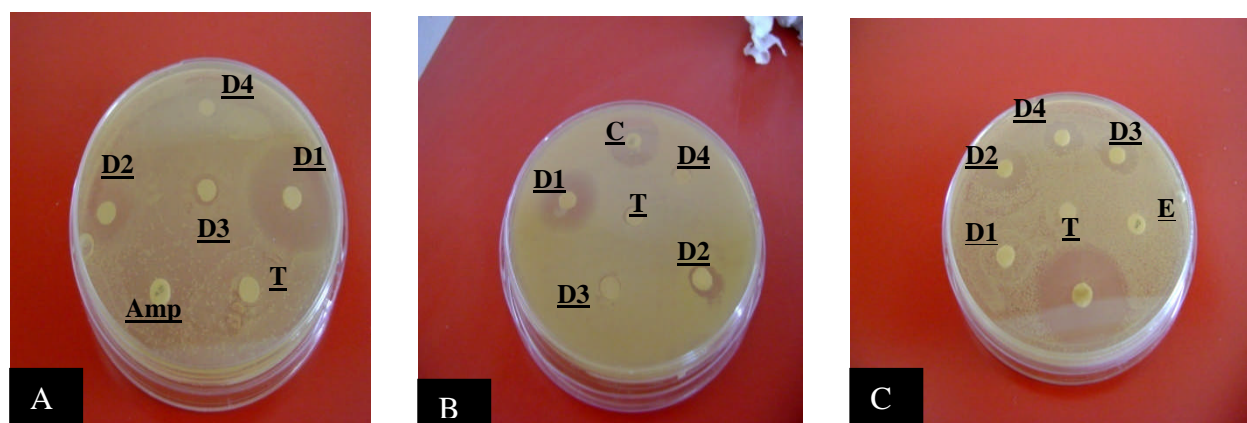


Figure 20 : Activité des huiles essentielles sur *E.coli*. A) Huiles essentielles de *L.nobilis*, B) huiles essentielles *S.officinalis*, C) huiles essentielles de *I.viscosa* . D1 : huiles brutes ; D2 : dilution 1/2 ; D3 : dilution 1/4 ; D4 : dilution 1/8 ; C : chloramphénicol 30 μ g/ml ; E : érythromycine 10UI ; Amp : ampicilline 10 μ g/ml.

Ces résultats sont en accord avec des travaux ayant mis en évidence la sensibilité de *E.coli* aux huiles essentielles. Koba et al. (2004) ont montré son inhibition par les huiles essentielles de la famille des Labiées. Schelz et ses collaborateurs (2006) ont montré son inhibition par sept huiles essentielles de plantes médicinales dont celles appartenantes à la famille des astéracées et des lamiacées. Les mêmes auteurs ont observé des diamètres des zones d'inhibition de 14 à 32mm sur *E.coli* et avec inoculum de densité de 10^7 UFC/ml et des disques chargés de 20 à 30 μ l d'huile (Schelz et al., 2006). La sensibilité d'*E.coli* aux huiles essentielles est déterminée aussi en phase gazeuse (microatmosphère). En effet, Nedovostova et al. (2009) ont obtenu une CMI < 0.005 μ l/cm³ sur *E.coli* par la méthode d'aromatogramme en phase gazeuse.

L'essence de *S.officinalis* utilisée dans cette étude est plus active que celle de *S.officinalis* de Tunisie rapportée par Hayouni et al. (2008b) ; des diamètres d'inhibition de 20mm sont obtenus vis-à-vis de *E.coli*.

III-3-3-4- Activité des huiles essentielles sur *Klebsiella pneumoniae*

Comme le montre la figure 31, les huiles brutes ont inhibé la croissance de l'espèce *K.pneumoniae*. Des diamètres d'inhibitions supérieures ou égales à 22 mm sont observés. Du point de vue statistique, il n'existe pas une différence entre les trois espèces vis-à-vis de *K.pneumoniae*. Les dilutions 1/2, 1/4 et 1/8 ont donné des zones d'inhibition inférieures à 15mm ce qui voudrait dire qu'en diluant nos huiles leur effet diminue, l'activité est proportionnelle à la concentration.

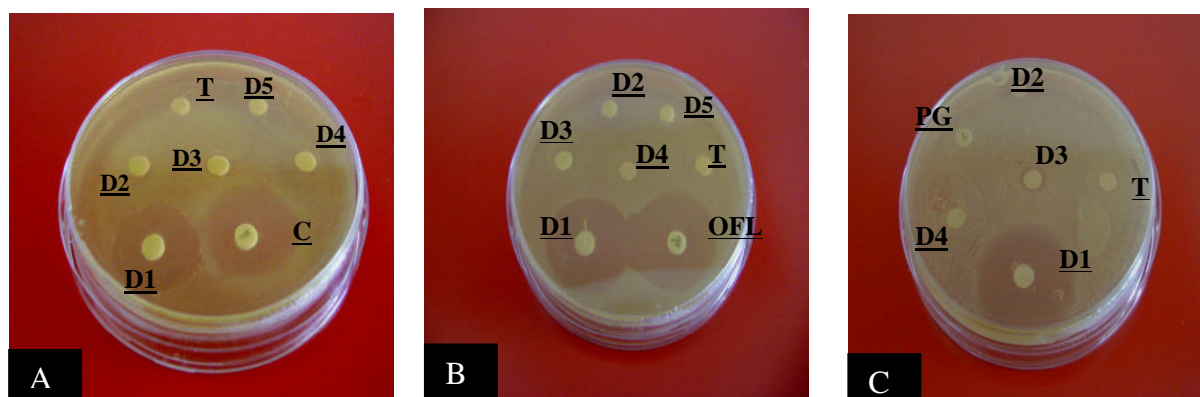


Figure 31 : Activité des huiles essentielles sur *K.pneumoniae*. A) Huiles essentielles de *S.officinalis*, B) huiles essentielles *L.nobili*, C) huiles essentielles de *I.viscosa* . D1 : huiles brutes ; D2 : dilution 1/2 ; D3 : dilution 1/4 ; D4 : dilution 1/8 ; C : chloramphénicol 30µg/ml ; PG: pénicilline 6 µg/ml ; OFL : oflaxacine 5µg/ml .

D'autres études ont montré la sensibilité de l'espèce *Klebsiella pneumoniae* aux huiles essentielles. En effet, sa sensibilité à l'égard des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Eucalyptus globulus*, deux espèces appartenant à la même famille que *Salvia officinalis*, a été mise en évidence par Mouchid et ses collaborateurs (2005). Son inhibition par les huiles essentielles de clou de girofle et de la sauge a été observée par Nascimento et ses collaborateurs (2000).

Aussi, Pereira et ses collaborateurs (2004) ont rapporté l'effet inhibiteur des huiles essentielles de *S.officinalis* sur *K. pneumoniae*. Ainsi, les huiles essentielles de l'espèce *S.officinalis* utilisée dans notre étude sont plus actives que celles utilisées par Hayouni et ses collaborateurs (2008b).

III-3-3-4- Activité des huiles essentielles sur *Listeria innocua*

Les diamètres d'inhibition calculés contre la souche *L.innocua* est de 06 à 28,5 mm. Des zones d'inhibition de 28,5, 26,5, 25,5 mm obtenues pour les huiles brutes d'*I.viscosa*, *S.officinalis* et *L.nobilis*, respectivement et qui ne présentent pas une différence significative ($P < 0,05$). Une augmentation de l'activité (en termes de diamètre d'inhibition) suite à l'élévation de la concentration est observée.

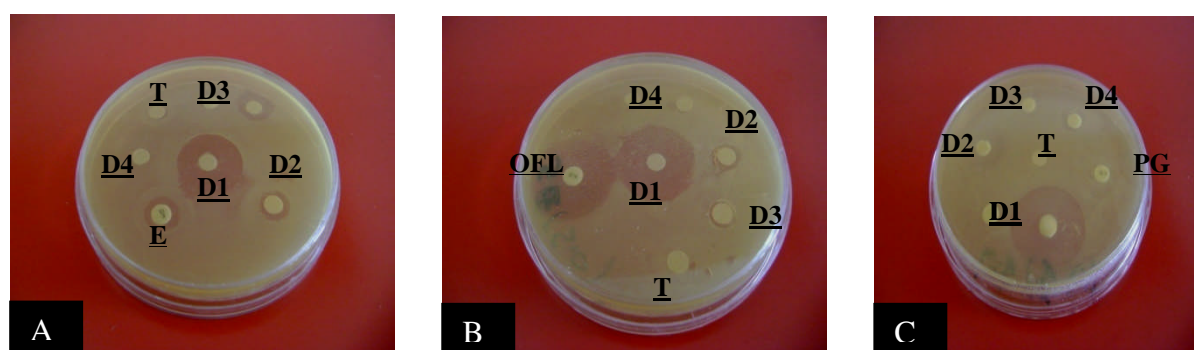


Figure 32: Activité des huiles essentielles sur *Linnocua*. A) Huiles essentielles de *L.nobili*, B) huiles essentielles *S.officinalis* *L.nobili*, C) huiles essentielles de *I.viscosa*. D1 : huiles brutes ; D2 : dilution 1/2 ; D3 : dilution 1/4 ; D4 : dilution 1/8 ; T : témoin (DMSO) ; E : érythromycine 30µg /ml ; PG : pénicilline 6 µg /ml ; OFL : oflaxacine 5µg /ml .

Des travaux antérieurs ont mis en évidence la susceptibilité des espèces du genre *Listeria* aux huiles essentielles de différentes plantes. Bakkali et ses collaborateurs (2008) ont mis en évidence la sensibilité de quelques espèces du genre *Listeria* aux huiles de *Pinus koraiensis* et *Lavandula angustifolia*. Holley et Patel (2005) ont montré que la souche *L.innocua* est très sensible aux acides cinnamiques et l'eugénol extraits du clou de girofle.

III-3-3-4- Activité des huiles essentielles sur *Staphylococcus aureus*

Comme on peut le voir à partir de la figure 33, toutes les huiles essentielles ont inhibé la croissance de l'espèce *S. aureus*. Des diamètres d'inhibition allant de 29,5 à 43,5 mm ont été enregistrés. Ce qui indique la sensibilité et l'effet bactéricide des huiles utilisées vis-à-vis de cette souche. Une meilleure inhibition est observée pour l'essence d'*I.viscosa* suivi de celles de *S.officinalis* et *L.nobilis* qui ne présentent aucune différence significative ($P < 0,05$) entre elles.

Nous constatons également que l'activité est proportionnelle à la concentration des huiles essentielles, plus les extraits sont concentrés meilleure leur activité antibactérienne.

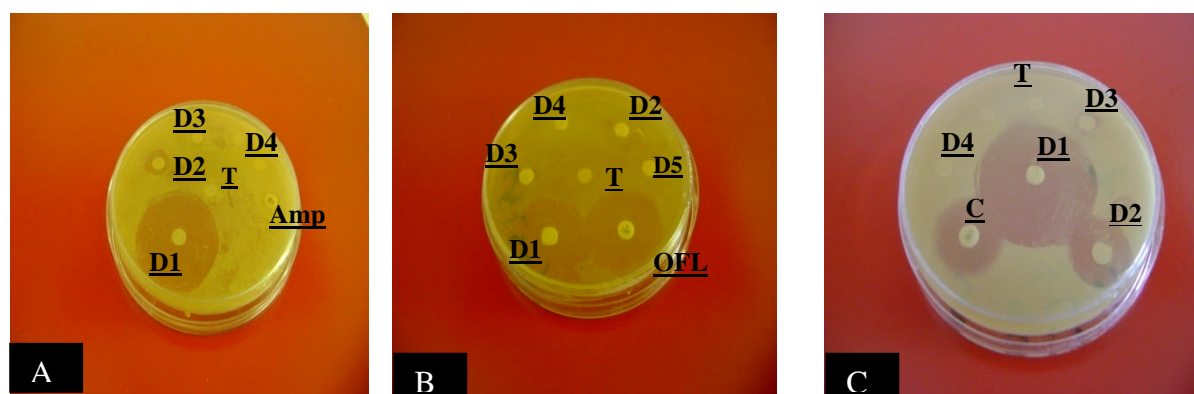


Figure 33 : Activité des huiles essentielles sur *S.aureus*. A) Huiles essentielles de *L.nobili*, B) huiles essentielles *S.officinalis*, C) huiles essentielles de *I.viscosa*. D1 : huiles brutes ; D2 : dilution 1/2 ; D3 : dilution 1/4 ; D4 : dilution 1/8 ; C : chloramphénicol 30µg /ml ; Amp ampicilline 10 µg /ml ; OFL : oflaxacine 5µg /ml .

La sensibilité de l'espèce *Staphylococcus aureus* aux huiles essentielles est en accord avec d'autres études. En effet, Mangena et Muyima (1999) ont montré l'effet inhibiteur de l'espèce *Artemisia afra*. Aussi, Nedovostova et ses collaborateurs (2009) ont obtenu une CMI < 0,003 µl/cm³ sur *S.aureus* par la méthode d'aromatogramme en phase gazeuse. Koba et ses collaborateurs (2004) ont rapporté la sensibilité de cette espèce vis-à-vis des essences de la famille des Lamiacées.

En effet, des diamètres des zones d'inhibition de 12 à 24 mm ont été obtenues avec les huiles de *Romarinus officinalis* et *Petronia incana*, respectivement (Mangena et Muyima, 1999).

Les huiles essentielles d'origan inhibent *S.aureus* résistant à la méthicilline (Nostro et al., 2007).

Des travaux antérieurs ont mis en évidence la sensibilité de l'espèce *S.aureus* aux huiles essentielles de *L.nobilis* (Fang et al., 2005 ; Barla et al., 2007). deSouza et ses collaborateurs (2005) ont rapporté une CMI égale à 0,8 % avec un inoculum de 10⁸ UFC/ml et une charge du disque de 20 µl /ml de l'essence de *L.nobilis*. De même, Oussalah et ses collaborateurs (2007) ont montré la sensibilité de cette souche à l'huile d'*I.graveolens*, une espèce assez proche à l'*I.viscosa*, ces mêmes auteurs a rapporté une CMI de 0,2/0,1 (v/v).

Néanmoins, l'espèce *Staphylococcus aureus* peut être résistante aux d'autres extraits de plantes. Ainsi, les extraits aqueux des feuilles de *L.nobilis* sont inactifs vis-à-vis de cette souche testée par Arora et Kaur (1999). Les huiles essentielles de *S.officinalis* que nous avons testé sont plus actives que les deux essences de Tunisie et Brésil dont l'inefficacité vis-à-vis de *S. aureus* a été rapportée par Hayouni et ses collaborateurs (2008b) et Delamare Longaray et ses collaborateurs (2007), respectivement.

La plus grande susceptibilité de *S.aureus* vis-à-vis des huiles essentielles par rapport aux autres espèces bactériennes testées s'expliquerait par une meilleure perméabilité d'un ou des composé (s) actif (s).

III-3-3-4- Activité des huiles essentielles sur *P.aeruginosa*

Parmi les huiles essentielles testées, seule l'essence d'*Inula viscosa* présente une activité antibactérienne modérée vis-à-vis des souches *P.aeruginosa*. En effet des diamètres d'inhibition de 6 à 15,5 mm sont enregistrés pour l'huile d'*I.viscosa*. Quant aux huiles essentielles de *S.officinalis* et *L.nobilis* les zones d'inhibition ne dépassent pas 06 à 10,5 mm, respectivement qui ne présentent aucune différence significative entre elles (P<0.05).

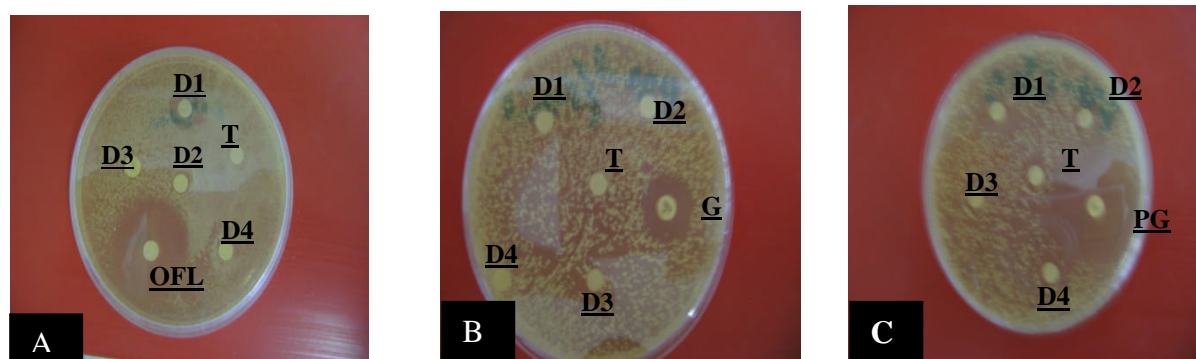


Figure 34: Activité des huiles essentielles sur *P.aeruginosa*. A) Huiles essentielles de *I. viscosa*, B) huiles essentielles de *L.nobili*, C) huiles essentielles de *S.officinalis*. D1 : huiles brutes ; D2 : dilution 1/2 ; D3 : dilution 1/4 ; D4 : dilution 1/8 ; G : gentamicine 10µg /ml ; OFL : oflaxacine 5µg /ml ; PG : pénicilline 6µg /ml.

La faible activité des huiles essentielles vis-à-vis *P.aeruginosa* est en accord avec la littérature qui montre que cette espèce est généralement peu sensible aux huiles essentielles et antibiotiques en général (Carson et Riley, 1995; Arora et al., 1999 ; Hammer et al., 1999 ; Piri, 2005). La résistance de *P. aeruginosa* aux huiles essentielles a été déjà signalée par Hayouni et al. (2008b) concernant l'essence de *S.officinalis* de Tunisie. De même, Delamare Longaray et al. (2007) ont montré la résistance de *P.aeruginosa* aux huiles essentielles de l'espèce *Salvia officinalis* cultivées en Brésil.

Ce comportement n'est pas surprenant car les souches de *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associée à la nature de sa membrane externe. Cette barrière a une capacité de synthétiser et sécréter des agrégats structurés appelés biofilms ou matrice composés de polysaccharides. Ces biofilms forment une barrière physique contre l'entrée d'agents antimicrobiens et elle secrète aussi un complexe enzymatique extracellulaire qui peuvent dégrader les huiles essentielles (Mann et al., 2000)

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis des huiles testées, nous constatons que l'efficacité de ces huiles diffère d'une bactérie à une autre. *Pseudomonas aeruginosa* est la plus résistante, cependant, *Staphylococcus aureus* est la plus sensible aux huiles testées. Nos résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les bactéries à Gram positif montrent la plus grande sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles (Russel, 1999 ; Burt, 2004 ; Holley et Patel., 2005 ; de Souza et al., 2005 ; Bakkali et al., 20008 ; Nedorostova et al., 2009).

Il est probable que ce résultat soit dû à une différence dans la capacité de pénétration des composés actifs présents dans les huiles essentielles. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface empêche la diffusion des molécules hydrophobes (Nikaido, 2003). Les bactéries à Gram positif sont moins protégées contre les agents antibactériens, le peptidoglycane n'entrave que la diffusion des poids moléculaires à 50KD (Hogan et Kolter, 2003).

L'ensemble des résultats montre que les huiles essentielles étudiées sont douées d'une activité antibactérienne contre les souches utilisées dans cette étude. Cette importante bioactivité des huiles essentielles étudiées est en relation avec leur composition chimique. En effet, Oussalah et ses collaborateurs (2006) ont rapporté que l'effet antibactérien des huiles essentielles est attribué aux monoterpènes particulièrement aux phénols. Dans la première partie de ce travail nous avons mis en évidence la richesse de l'espèce *I.viscosa* en monoterpènes (thymol et carvacrol), et selon les données de la littérature (Fiorini et al., 1998 ; Radulescu et al., 2004 ; Fang et al., 2005 ; Longaray-Delamare et al., 2007) , *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* sont deux espèces très riches aussi en monoterpènes, notamment le 1,8 cinéole, α -pinène, *p*-cimene ...etc, ce qui pourrait expliquer l'origine de cette activité antibactérienne de ces trois huiles étudiées.

D'autre part, nous avons constaté que l'essence d'*I.viscosa* présente une efficacité plus que les autres espèces. Cette divergence peut être attribuée à leur teneur en carvacrol et thymol. Ces deux composés phénoliques sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. En effet, les huiles essentielles possèdent ces composés phénoliques, sont hautement actifs contre les bactéries en dépit de leur hydrophobicité (Dorman et Dean, 2000 ; Oussou et al., 2004 ; de Billerbek, 2007 ; Kaloustian et al., 2008 ;). Dorman et Deans (2000) ont testé un grand nombre de composés purs sur 25 genres de bactéries et ils ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne, suivi du carvacrol et de l' α -terpinéol. Ceci concorde avec nos résultats où, la présence de ces deux phénols dans l'huile essentielle d'*I.viscosa*, traduit leur activité antibactérienne relativement supérieure aux autres espèces. Ces mêmes auteurs ont montré que la différence de l'efficacité antibactérienne observée entre le thymol et le carvacrol est due à la position du groupement hydroxyle sur la structure phénolique des deux molécules.

Les composés phénoliques causent des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux ions potassium, une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, une perturbation de la force proton motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires (Lambert et al., 2001 ;Burt, 2004 ; Bakkali et al., 2008).

Il est également probable que cette activité antibactérienne n'est pas due à la présence des substances particulières seulement mais, sont le résultat de l'interaction entre divers structures aromatiques (Dorman et Dean, 2000 ; Marino et *al.*, 2001 ; Delaquis et *al.*, 2002). D'après Oussou et ses collaborateurs (2004), ces molécules agiraient le plus souvent par une action synergique, soit seule au sein de l'huile essentielle. En plus de ces composés majoritaires, les composés mineurs peuvent contribuer significativement à l'activité des huiles essentielles (Lahlou, 2004)

Conclusion

Conclusion et perspectives

Dans le but de rechercher de nouveaux agents naturels antibactériens et antioxydants aux intérêts thérapeutiques, les huiles essentielles de trois plantes médicinales de la flore Algérienne, *Inula viscosa* L., *Salvia officinalis* L. et *Laurus nobilis* L. ont fait l'objet d'une étude phytochimique. Différentes analyses sont appliquées à ces plantes : extraction des huiles essentielles, analyse de l'essence *I.viscosa* par la CPG, évaluation de leur effet antioxydant par quatre méthodes analytiques (DPPH, TAEC, H₂O₂ et le pouvoir réducteur) et enfin la détermination de leur pouvoir antibactérien *in vitro* sur des souches pathogènes et multirésistantes : il s'agit de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (NAR), *Klebsiella pneumoniae* (E47) et *Listeria innocua* (CLIP 74915).

L'analyse des résultats obtenus montre que toutes les plantes étudiées possèdent des teneurs importantes en eau qui varient de 55.9 à 81.66 %, ce qui confirme leurs richesses hydriques. L'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation a montré une rentabilité en huile essentielle chez *Salvia officinalis* L (1,12%), alors qu'il s'affaiblit en passant de *L .nobilis* (0,88%) à *I. viscosa* (0,22%). Les propriétés organoleptiques (Aspect, couleur, odeur) de ces essences ont été déterminées.

L'étude de l'activité antiradicalaire des trois radicaux DPPH, ABTS et H₂O₂ montre que la plus grande activité est obtenue avec l'huile d'*Inula viscosa* L, suivi respectivement par celles de deux espèces *Salvia officinalis* L et *Laurus nobilis* L. D'autres part, l'espèce *Laurus nobilis* L. présente l'activité réductrice la plus importante. Ces variations peuvent être attribuées à la composition chimique des huiles testées.

L'existence d'une très bonne corrélation entre les différents tests de l'activité antiradicalaire dont les coefficients de corrélation varient de 0,985 à 0,997 est prouvée d'une part, et entre l'activité antiradicalaire et le pouvoir réducteur, dont les coefficients de corrélations allant de 0,852 à 0,925 d'une autre part. Néanmoins, il y a une excellente corrélation entre l'activité antiradicalaire avec les deux radicaux DPPH et ABTS (r=0,997). L'ensemble des résultats obtenus indique une très bonne corrélation qui peut être expliquée par la teneur de ces huiles étudiées en substances ayant à la fois une activité réductrice et antiradicalaire.

L'évaluation qualitative de l'effet antibactérien montre que la plupart des souches bactériennes utilisées sont résistantes aux antibiotiques utilisés et que les huiles essentielles sont actives sur ces souches testées. Des zones d'inhibition de diamètres variables sont observées à au moins une des quatre concentrations testées. Néanmoins, l'activité a été le plus souvent observée pour l'extrait brut. En comparant la susceptibilité des pathogènes étudiées, les bactéries Gram positives sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries Gram négatives, ce qui concorde avec beaucoup d'études réalisées dans cette optique. L'huile d'*Inula viscosa* L. présente une meilleure activité antibactérienne que d'autres plantes. L'effet antibactérien est proportionnel à la concentration de l'huile essentielle.

Les résultats de l'analyse chimique de la composition de l'huile *Inula viscosa* L. par chromatographie en phase gazeuse indiquent la richesse de cette dernière en monoterpènes oxygénés, dominé par le thymol (6,93%), l'iso-dihydrocarveol (5,04%) et carvacrol (2,27%). Ce qui pourrait être à l'origine des résultats observés.

Cette étude peut être considérée comme une première source d'information sur les propriétés phytochimiques, antibactériennes et antioxydantes des huiles essentielles d' *Inula viscosa* L., de *Salvia officinalis* L. et de *Laurus nobilis* L., ces plantes locales sont une source inestimable en divers composés doués des activités biologiques, ce qui témoigne et justifie leur utilisation en alimentation et en médecine traditionnelle comme traitement à plusieurs pathologies. Cependant, malgré leur importance, ces résultats restent partiels et d'autres travaux sur ces plantes s'imposent aux niveaux pharmacologiques et chimiques, il serait intéressant à l'avenir :

- De déterminer les concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles.
- De déterminer les concentrations minimales bactéricides des huiles essentielles
- D'étudier d'autres propriétés biologiques des ces plantes, à savoir les propriétés antifongiques, anti-inflammatoire, anti-virale et autres.
- De procéder à une séparation par des méthodes plus avancées telles que l'HPLC, la GC-MS et la RMN, afin d'identifier les composés responsables des activités antioxydantes et antibactériennes.
- De tester les composés identifiés individuellement en faisant appel à des tests pharmacologiques *in vivo*.
- De vérifier l'absence d'effets cytotoxiques de ces composés.

Références bibliographiques

Annexes

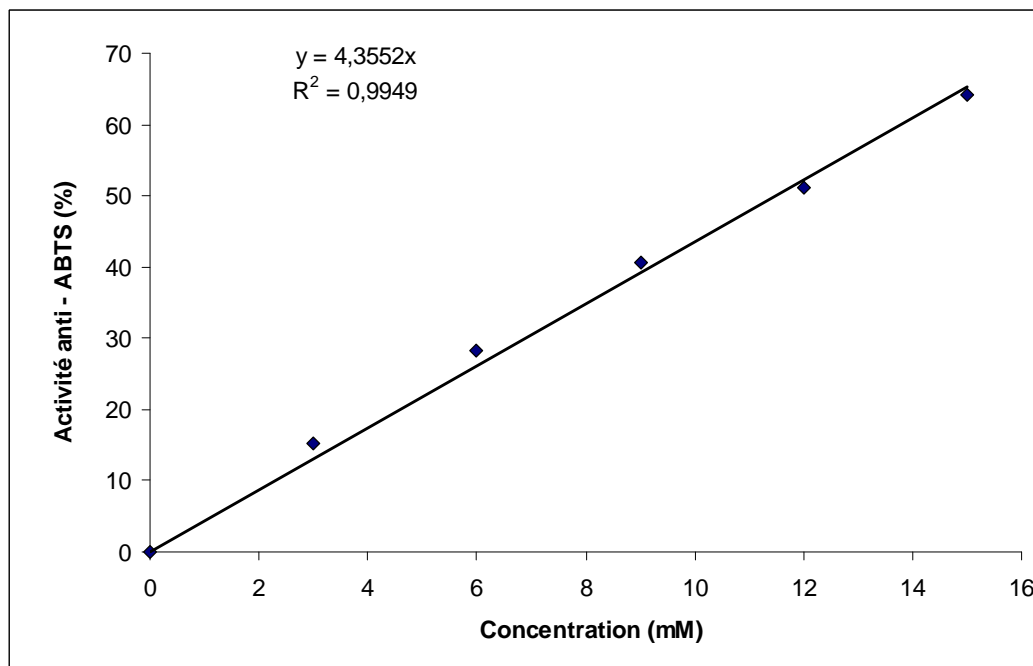
Annexe N° 01 : Courbe d'étalonnage

Figure 1 : Courbe d'étalonnage avec le Trolox

Annexe N°02 : Protocole des tests effectués**Coloration de Gram**

- Le frottis est fixé à la chaleur.
- On colore une minute au violet de Gentiane.
- On traite une minute avec le lugol.
- On fait couler l'éthanol durant 1 à 3 secondes, jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis.
- On rince à l'eau.
- On traite à la fushine 30 secondes.
- On rince brièvement, on sèche la lame à l'aide d'un buvard.
- On examine à l'objectif à immersion (x100).

Lecture

- Coloration violet : Gram+
- Coloration rose : Gram-

Test de la catalase

Un fragment de culture solide de 18 à 24h est déposé sur une lame, on ajoute au dessus une goutte d'eau oxygénée à 10V la formation de bulles d'air traduit la présence de la catalase.

Test de la coagulase

0,5 ml d'une culture de 18 à 24h est ajouté à 1ml de plasma humain, le tube est incubé à 37°C, et examiné 1, 2, 3, et 24h un résultat positif se traduit par la formation d'un caillot.

Test de la ADNase

Ensemencement par strie de la surface d'un milieu gélosé à l'ADN (gélose à l'ADN). Après 18h d'incubation à 37°C, une solution de HCL à 1N est pulvérisée sur la boîte. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une zone claire autour de la strie après quelques minutes.

Test de l'utilisation des citrates

Le milieu de citrate de Simmons est ensemencé par strie longitudinale à partir d'une suspension de bactéries dans l'eau physiologique, incubation à 37°C, lecture après 48h, les tubes observés durant 5 jours. Un résultat positif se traduit par un virage au bleu.

Test VP et RM

Les deux tests réalisés en parallèle, un seul tube du milieu Clark-Lubs est ensemencé avec deux gouttes de suspension bactérienne, incubé à 37°C pendant 48h.

Test VP

Après 48h d'incubation, 1ml du milieu est prélevé, une goutte du réactif VPI et une goutte du réactif VPII sont ajoutés, on laisse 10 à 15 minutes en position inclinée. Une réaction se traduit par l'apparition d'une coloration rouge ou rose.

Test RM

Après 48h d'incubation, 2ml du milieu sont prélevés, une à deux gouttes de la solution de rouge de méthyle sont ajoutés. Une coloration rouge indique une réaction positive, une coloration jaune indique une réaction négative.

Test de la réduction des nitrates

Un tube de bouillon nitraté est ensemencé avec une culture de 24h, incubé 18 à 24h à 37°C, après on ajoute 5 gouttes de réactif nitrate réductase I et 5 gouttes du réactif nitrate réductase II. Une coloration rouge ou rose indique la réduction des nitrates en nitrites.

Test de fermentation du glucose, lactose, production de gaz et de H₂S sur Milieu Hajna-Kligler :

Ensemencer abondamment la surface par stries serrées ou par inondation le milieu Hajna-Kligler puis le culot par simple piqure, à l'aide de la même pipette boutonnée. Le bouchon n'est pas vissé a fond pour permettre les échanges gazeux. On incube 24h à 37°C. Le virage au jaune du culot indique la fermentation du glucose, le virage au jaune de la pente indique la fermentation du lactose, noircissement du milieu indique la production de H₂S. La production de gaz se traduit par la formation d'une poche de gaz qui parfois peut décoller la totalité de la gélose vers le haut.

Test de l'urée indole

2ml d'une culture de 18 à 24h sont prélevés, une à deux gouttes de la solution de l'urée indole sont ajoutés. Après 24h d'incubation à 37°C. le virage du milieu au curise indique la production du l'uréase. La production de l'indol se traduit par la formation d'un annou rouge après l'addition de quelques gouttes de réactif de Covaks.

Résumé

Dans cette étude, les huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* ont été évaluées *in vitro* pour leurs activités antioxydantes et antibactériennes. Nos résultats indiquent que l'huile *I.viscosa* a montré la plus grande activité antiradicalaire contre les trois radicaux DPPH, ABTS et H₂O₂, suivi respectivement par celles de deux espèces *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis*. D'autres part, l'espèce *Laurus nobilis* présente l'activité réductrice la plus importante. Ces variations peuvent être attribuées à la composition chimique des huiles testées

L'activité antibactérienne de ces trois huiles a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose contre des souches de référence et multirésistante : il s'agit de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (NAR), *Klebsiella pneumoniae* (E47) et *Listeria innocua* (CLIP 74915). *Pseudomonas aeruginosa* a été l'espèce la plus résistante, cependant, *Staphylococcus aureus* s'est montrée la plus sensible aux huiles testées.

Les résultats de l'analyse chimique de la composition de l'huile *Inula viscosa* par chromatographie en phase gazeuse indiquent la richesse de cette dernière en thymol (6,93%) and carvacrol (2,27%), ce qui pourrait être à l'origine des résultats observés.

Ces résultats mettent en valeur les différentes applications thérapeutiques de ces plantes dans la médecine traditionnelle et comme des épices alimentaires et encouragent la recherche de nouvelles molécules naturelles à caractères anti-oxydant et antibactérien dans plusieurs domaines industriels : pharmacologique, cosmétique, alimentaire, etc.

Mots clés : Huiles essentielles, *Inula viscosa*, *Salvia officinalis*, *Laurus nobilis*, activité antioxydante, activité antibactérienne, chromatographie en phase gazeuse

Abstract

In this study, essential oils of *Inula viscosa*, *Salvia officinalis* and *Laurus nobilis* have been evaluated *in vitro* for their anti-oxidant and anti-bacterial activities. Our results indicate that *Inula viscosa* oil exhibited high scavenging activity against the three radicals DPPH, ABTS and H₂O₂, followed respectively by those of two species *Salvia officinalis* and *Laurus nobilis*. Other share, the species *L.nobilis* L presents the reducing activity most significant. These variations can be allotted to the chemical composition of oils tested

The anti-bacterial activity of these three oils was evaluated by the method of diffusion on gélose against strains of reference and multiresistant: it is about *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (NAR), *Klebsiella pneumoniae* (E47) and *Listeria innocua* (CLIP 74915). *Pseudomonas aeruginosa* was the most resistant; however, *Staphylococcus aureus* was the most sensitive to oils tested.

The results of the chemical analysis of the composition of oil *Inula viscosa* by gas chromatography indicate the richness of the latter in the thymol (6,93%) and carvacrol (2, 27%), could be at the origin of the results observed.

These results highlight the various therapeutic applications of these plants in traditional medicine and like food spices and stimulate research of novel natural molecules with antioxidant and anti-bacterial in several industrial fields: pharmacological, cosmetic, food, etc.

Keywords: Essential oils, *Inula viscosa*, *Salvia officinalis*, *Laurus nobilis*, antibacterial, antioxidant, gas chromatography.

المخلص:

في هذه الدراسة للزيوت الأساسية لثلاثة نباتات طبية لكل من *Inula viscosa*, *Salvia officinalis*, *Laurus nobilis* تم تقييمها من خلال فعاليتها ضد بكتيريا المضادة للإنسان ومدى نشاطها المضاد للأكسدة قوة التثبيط الجذور الحرة DPPH, ABTS و H₂O₂ وقوتها الإرجاعية. نتائجا بيّنت أنّ الزيوت الأساسية *Inula viscosa* تملك الأكثر قوة لتثبيط ضد الجذور الحرة DPPH, ABTS et H₂O₂ مقارنة للزيوت الأخرى. بينما *Laurus nobilis* أبدت قوة إرجاعية كبيرة وهذا يمكن أن يفسر باختلاف التركيب الكيميائي لهذه الزيوت الأساسية. من جهة أخرى، دراسة هذه الزيوت بطريقة إنتشار على السطح جيلوز ضد بكتيريا مضادة ومقاومة:

Staphylococcus aureus (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (NAR), *Klebsiella pneumoniae* (E47) و *Listeria innocua* (CLIP 74915) حيث كانت *Pseudomonas aeruginosa* الأكثر مقاومة بينما *Staphylococcus aureus* كانت البكتيريا الأكثر حساسية حيث كل الزيوت كبحت نموها.

نتائج التحليل الكيميائي لزيوت *Inula viscosa* بواسطة الكروماتوغرافية في الحالة الغازية بيّنت لنا غناها بعنصرين فعّالين (6,93%) thymol و (2,27%) carvacrol الذي يمكن أن يفسر مصدر إختلاف النتائج المتحصلة عليها في هذه الدراسة. هذه النتائج قد قيمت إستعمال هذه النباتات في معالجة الكثير من الأمراض في الطب التقليدي وتشجيع البحث على جزيئات جديدة متميزة في قدرتها ضد الأكسدة وكبحها لبكتيريا في مجال العلاجي.

مفتاح الكلمات: الزيوت الأساسية، المفعول المضاد الحيوي، المفعول ضد الأكسدة، الكروماتوغرافية في المرحلة الغازية، *Inula viscosa*, *Laurus nobilis*, *Salvia officinalis*