

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université Ferhat Abbas – Sétif 1

Faculté des Sciences
De la Nature et de la vie



جامعة فرحات عباس - سطيف 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ÉCOLOGIE VÉGÉTALE

Mémoire

N°/SNV/2014

Présenté par

RAHMOUNI MALIKA

Pour l'obtention du diplôme de

Magister

en Biologie et physiologie végétale

Option : Valorisation des ressources végétales

Thème

**Contribution à l'étude de l'activité biologique et la
composition chimique des huiles essentielles de deux
Apiacées (*Ferula vesceritensis* Coss et DR et *Balansea
glaberrima* Desf.) Lange**

Soutenue publiquement le 24/06/2014

Devant le Jury

Président : H. Bouzerzour

Pr. UFA Sétif 1

Rapporteur : H. Laouer

Pr. UFA Sétif 1

Examineurs : S. Akkal

Pr. UM Constantine

S. Dahamna

Pr. UFA Sétif 1

Laboratoire de valorisation des ressources végétales

Dédicaces

A la mémoire de mon père

A ma mère que Dieu le tout-puissant la protège

A mon frère et mes sœurs

A mes nièces et mes neveux

A mes amies et mes collègues

Que ce travail soit une part de reconnaissance envers eux.

Remerciements

Je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce travail.

Je tiens à remercier mon encadreur, le professeur Hocine Laouer qui a dirigé ce travail et a veillé à ce qu'il soit mené à terme, ses conseils précieux m'ont été de grande utilité, sa disponibilité, sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements et ma profonde gratitude.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Madame et Messieurs les professeurs en acceptant d'être les membres de jury de ma thèse malgré leurs innombrables obligations. Je les remercie vivement pour cette marque d'intérêt. Leurs présence et participation à ce jury me touche particulièrement. J'en suis très honorée.

Monsieur le professeur H. Bouzerzour, Je suis très honorée d'avoir accepté d'être le président du jury de ma thèse. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements et soyez assuré de ma profonde gratitude. C'est pour moi un honneur et un privilège que vous présidez mon jury de thèse.

Monsieur le professeur S. Akkal, merci d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse, pour l'intérêt que vous portez à mon travail et pour le temps consacré à fin de l'évaluer.

Madame le professeur S. Dahamna votre venue en tant qu'examinatrice m'honore, je vous suis très reconnaissante et je vous adresse mes vifs remerciements. J'en suis très honorée

Je remercie Docteur F. Sahli qui m'a accueillie dans son laboratoire de bactériologie du C.H.U de Sétif pour les conditions techniques mises à ma disposition à fin de réaliser l'activité antibactérienne.

Je tiens à remercier le professeur Bruno Marongiu du département de chimie et géologie, laboratoire des fluides supercritiques et le docteur Danilo Falconieri de l'institut technique industriel (ITI), université de Cagliari Italie, d'avoir réalisé l'analyse de la composition chimique de nos huiles essentielles.

J'ai une très grande reconnaissance envers l'ensemble des enseignants pour le savoir qu'ils m'ont transmis.

Il est évident que je ne peux oublier de remercier ma famille qui a toujours répondu « présent » et ont été d'un grand secours moral en toutes situations.

Resumé

Suite à l'accroissement vertigineux du phénomène de biorésistance des souches bactériennes et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Ainsi Pour échapper aux conséquences du stress oxydatif, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant. Le criblage des huiles essentielles permet de découvrir de nouveaux antibactériens et antioxydants qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques et antioxydants conventionnels. Notre étude contribue à la connaissance des potentiels antioxydants et antibactériens des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la famille des Apiacées à savoir *Ferula vesceritensis* et *Balansea glaberrima*. Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation à l'aide d'un appareil type Clevenger. Toutefois, leur composition chimique a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/MS. L' α -pinène (28,57%) et l'aristolène (24,63%) sont les composés majoritaires de l'HE de *F. vesceritensis* par contre valencene (36,65%), l'apiole (34,87%) et γ -murolène (9,83%) sont les composés majoritaires de l'HE de *B. glaberrima*. Les résultats de l'activité antimicrobienne réalisée *in vitro* par la méthode de diffusion sur milieu gélosé montrent l'effet de l'HE de *F. vesceritensis* vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633. L'HE de *B. glaberrima* est non seulement active vis-à-vis de ces deux dernières souches mais aussi sur *E. coli* ATCC 25922 de même contre *A. flavus* NRRL 391 qui s'est montrée sensible. Contrairement à *C. albicans* ATCC 1024 qui a été faiblement inhibé par l'HE de *B. glaberrima*. Le potentiel antiradicalaire des HE a été déterminé par la méthode de DPPH. En effet les deux huiles ont montré un effet antiradicalaire trop faible par rapport à celui du BHT : les IC₅₀ de *B. glaberrima*, *F. vesceritensis* et du BHT sont respectivement: 9136,93 μ g/ml, 7440,68 μ g/ml, 41,35 μ g/ml.

Mots clés: *Ferula vesceritensis*, *Balansea glaberrima*, huiles essentielles, CPG/SM, activités antibactérienne et antioxydante.

Abstract

Because of the high level of résistance phenomenon to antibiotics being developed, the discovery of new antibacterial is being more than necessary. In addition, to avoid the consequences of oxidative Stress, it is necessary to reestablish the equilibrium of the balance oxidant/antioxidant. The screening of essential oils permits the discovery of new antibacterial and antioxidant.

Our study contributes to the knowledge of antibacterial and antioxidant properties of essential oils of two aromatic plants of the family Apiacées, namely *Ferula vesceritensis* and *Balansea glaberrima*. Essential oils were extracted by hydrodistillation and their chemical composition was analysed by Gas-Chromatography coupled to Mass-spectrometry (CPG/SM): α -pinéne (28, 57%) and aristolene (24, 63%) were the major compounds of *F.vesceritensis*, but the valencene (36, 65%), l'apiole (34, 87%) and γ -muroléne (9, 83%) were the major compounds in E.O of *B. glaberrima*. Antimicrobial activity was determined using the agar diffusion test.

The results of the antibacterial activity demonstrated the effect of E.O of *F.vesceritensis* towards *S.aureus* ATCC 25923 and *B.subtillus* ATCC 6633. The E.O of *B.glaberrima* is not only active towards those two later strains but *E. coli* ATCC 25922 as well. *A.flavus* NRRL 391 was inhibited by E.Oil of *B.glaberrima*. *C. albicans* ATCC 1024 was lowly inhibited by E.O of *F. vesceritensis*. The antioxidant activity was evaluated using the free radical scavenging effect of the DPPH. E.O of *F.vesceritensis* and *B.glaberrima* demonstrated an effect antiradicalar very low in comparison with BHT, the IC₅₀ of *B. glaberrima*, *F.vesceritensis* and BHT: 9136,93 μ g/ml, 7440,68 μ g/ml, 41,35 μ g/ml were respectively.

Key words: *Ferula vesceritensis*, *Balansea glaberrima*, Essential oils (E.O), CPG/SM, antibacterial activity, antioxidant activity.

ملخص

نظرا للزيادة الكبيرة لظاهرة المقاومة ومحدودية المضادات الحيوية التي هي مرحلة لتطور، فإن اكتشاف مضادات جديدة، أصبح أكثر من ضرورة. بالإضافة إلى تفادي تبعيات الكرب التأكسدي، فمن الضروري إعادة التوازن التأكسدي / المضاد التأكسدي. إن الفحص الاختباري (الغربلة) للزيوت الأساسية يسمح باكتشاف مضادات بكتيرية جديدة و مضادات أكسدة التي يمكنها أن تمثل بديل للمضادات الحيوية المستعملة وكذلك لمضادات الأكسدة التقليدية. دراستنا تساهم في معرفة القدرة المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا للزيوت الأساسية العطرية من عائلة Apiacées (الخيمية) والمتمثلة في *Ferula vesceritensis*، *Balansea glaberrima*. تم استخلاص الزيوت الأساسية بتقنية التقطير المائي أما التركيب الكيميائي فتم تحديده بواسطة كروماتوغرافيا الغازية إلى جانب قياس الطيف الكتلي CPG/MS. وتم التعرف على مركبين بنسبة عالية في الزيت الأساسي لـ *Ferula Vesceritensis* وهما α -pinene (28.57%)؛ γ -muroléne (9.83%) و l'aristoléne (24.63%). أما بنسبة للزيت الأساسي لنباتة *Balansea glaberrima* فتم التعرف على ثلاثة مركبات بنسب عالية. cValen(36.65%)، l'apiole(34.87%) و γ -muroléne (9.83%). نتائج النشاط المضاد للبكتيريات المنجز مخبريا بطريقة الانتشار في هلام الجيلوز بين تأثير الزيوت الأساسية لنباتة *Ferula Vesceritensis* اتجاه *S.aureus* ATCC 2 و *B. subtilis* ATCC 6633. إن الزيوت الأساسية المستخلصة من نبات *Balansea glaberrima* ليست فقط مثبطة اتجاه السلالتين الأخيرتين بل أيضا اتجاه *E. coli* ATCC.25922 إن القدرة المضادة للجذور الحرة للزيوت الأساسية تم تحديدها بمعايرة (DPPH). في الحقيقة الزيتين الأساسيين أظهر تأثير مضاد للجذور ضعيف بالمقارنة مع BHT: $IC_{50}=9136.93 \mu g/ml$ لنباتة *F. vesceritensis*؛ $IC_{50}=7440.68 \mu g/ml$ لنباتة *B. glaberrima* و $IC_{50}=41.35 \mu g/ml$ لـ BHT.

كلمات المفاتيح: *Balansea glaberrima*، *Ferula vesceritensis*، الزيوت الأساسية، النشاطية المضادة للبكتيريا و المضادة للأكسدة (DPPH).

Liste des abréviations

Abs : absorbance

AFNOR : Association Française de Normalisation

APG : Angiospermes phylogénétique groupe

ATCC: American Type Culture Collection

BHT: Butyl- hydroxyl-toluène

BN : Bouillon nutritif

°C : degré Celsius

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CA-SFM : Comité de L'antibiogramme de la société Française de microbiologie

CCM : Chromatographie en couche mince

CFU : Colony Forming Units

CIP : Centre Institut Pasteur de Paris

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DO : Densité Optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

EI : Impact Détection

FID : Détecteur à Ionisation de Flamme

HE : Huile essentielle

IRTF : Spectrométrie Infra- Rouge par Transformée de Fourier

KI : Indice de Kovats

LD₅₀ : Dose létale 50

MH: Mueller Hinton

Me OH: Methanol

MRSA: Methicillin- Resistant *Staphylococcus Aureus*

NCCLS: National committee for clinical laboratory standards

NRRL: Northern regional research laboratory

nm : Nanomètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

RF : Rapport frontal

RT : Temps de rétention

SD : Standard de déviation

SM : Spectrométrie de Masse

µg : Microgramme

U I : Unité internationale

µl : Microlitre

u.m. a : Unité de masse atomique

UV : Ultra-violet

Liste des figures

Figure 01: <i>Ferula vesceritensis</i> Coss et DR.....	06
Figure 02: Les principaux constituants du genre <i>Ferula</i>	07
Figure 03 : <i>Balansea glaberrima</i> Desf et Lange	07
Figure 04: Glande simple, entièrement chargée d'huile en forme de dôme (800 x).....	08
Figure 05: Les poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'un Origan.....	08
Figure 06: Montage de l'hydrodistillation	12
Figure 07: Entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion	13
Figure 08: Le montage d'extraction par micro-ondes	14
Figure 09: Synthèse des monoterpènes	17
Figure 10: Synthèse des sesquiterpènes	18
Figure 11: Exemple de quelques monoterpènes.....	19
Figure 12: Exemple de quelques diterpènes.....	20
Figure 13 : Exemple de quelques sesquiterpènes.....	21
Figure 14: Schéma du principe du fonctionnement d'un spectromètre de masse.....	25
Figure 15: Identification des constituants d'une huile essentielle par CPG et CPG/SM.....	26
Figure 16: Dispositif d'extraction type Clévenger.....	32
Figure 17 : Appareil de distillation type Clevenger	32
Figure 18: Etapes de réalisation de l'activité antibactérienne.....	36
Figure 19: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive.....	37
Figure 20 : Taux d'humidité de <i>F. vesceritensis</i> et de <i>B. glaberrima</i>	39
Figure 21 : Densité de l'huile essentielle de <i>F. vesceritensis</i> et <i>B. glaberrima</i>	41
Figure 22 : Pourcentage des composés chimiques de l'HE de <i>F. vesceritensis</i>	43

Figure 23 : Chromatogramme de l'HE de <i>F. vesceritensis</i>	44
Figure 24 : Pourcentage des composés chimiques de l'HE de <i>Balansea glaberrima</i>	46
Figure 25 : Chromatogramme de <i>Balansea glaberrima</i>	47
Figure 26 : Les zones d'inhibition de la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> induites par l'HE de <i>Ferula vesceritensis</i> et par les antibiotiques standards.....	49
Figure 27 : Les zones d'inhibition de <i>B. subtilis</i> induites par l'HE de <i>F.vesceritensis</i> et par la Gentamicine	49
Figure 28 : Les zones d'inhibition d' <i>E. coli</i> induites par l'HE de <i>B.glaberrima</i> et par les antibiotiques standards	51
Figure 29 : Les zones d'inhibitions de <i>S. aureus</i> (SARM) induites par l'HE de <i>B. glaberrima</i>	51
Figure 30 : Les zones d'inhibition de <i>B. subtilis</i> induites par l'HE de <i>B. glaberrima</i> et par la Gentamicine	52
Figure 31 : Moyennes générales des zones d'inhibition de neuf souches bactériennes sous l'effet de différentes dilutions de l'HE de <i>F. vesceritensis</i> et <i>B. glaberrima</i>	59
Figure 32 : La zone d'inhibition de la sporulation d' <i>A. flavus</i> induite par l'HE de <i>Balansea glaberrima</i> à la dilution 1/2	59
Figure 33 : Les zones d'inhibition induites par les antifongiques standards sur <i>Candida albicans</i> , <i>A. niger</i> et <i>A. flavus</i>	59
Figure 34 : Activité anti radicalaire de l'huile essentielle de <i>B. glaberrima</i>	60
Figure 35 : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de <i>F. vesceritensis</i>	60
Figure 36: Activité antiradicalaire du BHT	61
Figure 37: Activités antiradicalaires de l'huile essentielle de <i>F.vesceritensis</i> , <i>B.glaberrima</i> et du BHT.....	62

Liste des tableaux

Tableau 01 : Utilisations traditionnelles de <i>Ferula</i> sp.....	04
Tableau 02 : Variation de la composition de l'huile essentielle d' <i>Origanum gratissimum</i> en fonction de l'heure de la récolte.....	04
Tableau 03: Composition chimique de l'HE de <i>F. vesceritensis</i>	42
Tableau 04 : Composition chimique de l'HE de <i>Balansea glaberrima</i>	45
Tableau 05: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'HE de <i>F. vesceritensis</i> exprimés en mm.....	48
Tableau 06: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'HE de <i>B. glaberrima</i> exprimés en mm ¹	52
Tableau 07: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par les antibiotiques de synthèses	52
Tableau 08: Carrés moyens de l'analyse de la variance d'HE de <i>F. vesceritensis</i> et <i>B. glaberrima</i>	55
Tableau 09 : Valeurs moyennes des zones d'inhibition (mm) enregistrées par les souches bactériennes sous l'effet de différentes dilutions des HE	56
Tableau 10 : Carrés moyens de l'analyse de la variance sous l'effet de l'HE de <i>B. glaberrima</i>	56
Tableau 11 : Carrés moyens de l'analyse de variance sous l'effet de l'HE de <i>F.vesceritensis</i> et <i>B. glaberrima</i>	57
Tableau 12 : Pouvoir antifongique de l'HE des fruits de <i>F. vesceritensis</i>	58
Tableau 13 : Pouvoir antifongique de l'HE de la partie aérienne de <i>B. glaberrima</i>	58
Tableau 14 : Valeurs d'IC ₅₀ de <i>F. vesceritensis</i> , <i>B.glaberrima</i> et de BHT	61

Dédicaces

Remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

SOMMAIRE

Introduction 01

Partie bibliographique

Chapitre I

Etude des Apiacées

I.1. Description botanique de la famille des Apiacées 03

I.2. Utilisation en médecine traditionnelle 03

I.3. Le genre *Ferula* 05

I.3.1. Position systématique du genre *Ferula* 05

I.4. *Ferula vesceritensis* Coss et DR 05

I.4.1. Description botanique 05

I.4.2. Pharmacopée 06

I.4.3. Les principaux constituants chimiques 06

I.5. Description botanique de *Balansea glaberrima* (Desf.) Lange 07

Chapitre II

Étude des huiles essentielles

II.1. Définition 08

II.2. Répartition et localisation 08

II.3. Rôles des huiles essentielles dans la plante 08

II.4. Qualité des huiles essentielles	09
II.5. Les propriétés physiques des huiles essentielles	09
II.6. La toxicité des huiles essentielles	10
II.7. Les procédés d'extraction des huiles essentielles	11
II.7. 1. La distillation	11
II.7.1.1. L'hydrodistillation	11
II.7.1.2. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau	12
II.7.1.3. L'hydrodiffusion.....	12
II.7.2. Extraction par micro-ondes	13
II.7.3. Extraction par les solvants organiques	14
II.7.4. Extraction au CO ₂ supercritique	14
II.7.5. Extraction par enfleurage.....	15
II.7.6. Extraction par expression	15
II.8. La composition chimique des huiles essentielles	16
II.8.1. Les composés terpéniques	16
II.8.1.1. Les monoterpènes	19
II.8.1.2. Les sesquiterpènes	20
II.8.2. Les composés aromatiques dérivés du phénylpropanes	21
II.8.3. Les composés d'origines diverses	21
II.9. Les chémotypes	22
II.10. Les facteurs influençant la composition	22
II.11. Les méthodes d'analyses des huiles essentielles	23
II.11.1. La chromatographie sur couche mince (CCM)	24
II.11.2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)	24
II.11.3. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).....	25
II.12. Activités biologiques des huiles essentielles	26

II.12.1. Propriétés antimicrobiennes	26
II.12.2. Propriétés antioxydantes	27
II.12.3. Propriétés thérapeutiques.....	27
II.12.3.1. Propriétés anti-inflammatoires	27
II.12.3.2. Propriétés anticancéreuses	28

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériel et Méthodes

III.1. Matériel	29
III.1.1. Matériel végétal.....	29
III.1.2. Matériel du test de l'activité antibactérienne	29
III.1.2.1. Souches microbiennes	29
III.1.2.2. Milieux de cultures.....	30
III.1.2.3. Les antibiotiques	30
III.1.2.4. Les antifongiques	30
III.1.3. Matériel du test de l'activité antioxydante (test DPPH).....	30
III.2. Méthodes	31
III.2.1. Détermination du taux d'humidité	31
III.2.2. Procèdes d'extraction des huiles essentielles	31
III.2.3. Calcul du rendement.....	33
III.2.4. Mesure de la densité.....	33
III.2.5. Analyses des huiles essentielles	33
III.2.6. Test <i>in vitro</i> de l'activité antibactérienne	34
III.2.6.1. Technique par contact direct	34
III.2.6.1.1. Les étapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne.....	34
III.2.7. Test <i>in vitro</i> de l'activité antifongique	37
III.2.7.1. Préparation de la suspension de spores	37

III.2.7.2. Test de diffusion de disque.....	37
III.2.8. Test <i>in vitro</i> de l'activité antioxydante (test DPPH)	37
III.2.8.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	37
III.2.8.2. Mode opératoire	38
III.2.9. Analyses statistiques	38

Chapitre VI

Résultats et discussion

VI.1. Le taux d'humidité	39
VI.2. Extraction de l'huile essentielle	39
VI.2.1. Rendement en huiles essentielles	39
VI.2.2. La densité	40
VI.3. Composition chimique de l'huile essentielle	41
VI.4. Pouvoir antibactérien	46
VI.5. Pouvoir antifongique.....	58
VI.6. Pouvoir antioxydant	60
Conclusion générale	64
Références bibliographiques	66
Annexes	

Partie bibliographique

Chapitre I

Etude des Apiacées

Introduction

Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées depuis longtemps dans le processus de stress oxydatif et la lutte contre les maladies infectieuses. Mais la découverte des antioxydants synthétiques et des antibiotiques a provoqué le déclin de la médecine à base de plante et l'a reléguée à un rang secondaire. Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (HE) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà à sa manière l'extraction des principes odorants. Puis progressivement les huiles essentielles se font connaître par leurs vertus thérapeutiques et deviennent alors des remèdes courants des médecines traditionnelles. La fumigation des personnes malades est en effet l'une des plus ancienne techniques thérapeutiques (Buchbaouer et *al.*, 1993).

De nos jours la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. Certaines huiles essentielles, sont utilisées comme les antibiotiques ou d'autres préparations chimiques pour leurs fortes actions antimicrobiennes fongicides et virucides (Belaiche, 1979). En effet de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants de préparations pharmaceutiques. Le thymol par exemple est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (Pauli, 2001). Les huiles essentielles peuvent causer de toxicité (sauge, absinthe). Quelques antioxydants naturels issus du romarin et de la sauge par exemple sont déjà exploités et commercialisés en tant qu'additifs alimentaires comme antioxydants (Schuller, 1990). Les antioxydants les plus connus sont ceux provenant du thé, du vin, des fruits, des épices et d'autres végétaux (Cao et Prior., 1998; Madsen et *al.*, 1998; Wang et *al.*, 1998).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 80 % de la population des pays en voie de développement ont recours presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour ses besoins de santé (Kansole, 2009)

L'Algérie possède une richesse floristique considérable. On compte environ 3000 espèces de plantes dont 15% sont des endémiques (Quezel et Santa, 1963). Ce mémoire s'intéresse à deux plantes de la famille des Apiacées, autrefois appelées Umbellifères en référence à leur inflorescence en forme d'ombelles.

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques à intérêt biologique, nos investigations visent à extraire les huiles essentielles, déterminer leurs compositions chimiques et d'évaluer leurs activités biologiques (antibactérienne, antifongique et antioxydante). La valorisation des huiles essentielles passe par une indispensable étape d'analyse qui nécessite l'utilisation du couplage CPG/SM, permettant l'identification de leurs constituants.

Ainsi ce mémoire est structuré en deux parties, initié par une recherche bibliographique ou nous apportons dans le premier chapitre une étude des plantes médicinales. Le deuxième chapitre élucide l'étude des huiles essentielles. La partie pratique est subdivisée en deux chapitres, un chapitre élucide le matériel utilisé et les méthodes suivies, par contre le suivant chapitre traite les résultats obtenus et leur discussion et enfin le mémoire s'achève par une conclusion générale, des références bibliographiques et des annexes.

I.1. Description botanique de la famille des Apiacées

Les Apiacées anciennement appelées Ombellifères, comprennent environ 3000 espèces se répartissant dans toutes les régions tempérées mais surtout dans l'hémisphère Nord (Filliat, 2012). L'inflorescence est la partie la plus importante de la plante car c'est grâce à elle que la famille des Apiacées est facilement reconnue. Paradoxalement, les espèces de cette famille sont assez difficiles à différencier les unes des autres. Il s'agit de plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces, parfois arbustives. Les feuilles sont alternes, composées, rarement simples. Souvent, les pétioles sont élargis à leur base, engainant la tige. La tige est souvent creuse. Les fleurs sont réunies en ombelles simples ou composées, munies de bractées appelées involucelles à la base. Elles comportent 5 pétales et 5 étamines et un ovaire à deux logs. Les fruits sont formés de 2 méricarpes présente chacune deux faces commissurales (plane) et dorsale (convexe). La face dorsale porte au moins 5 côtes séparées par 4 vallécules contenant des canaux sécréteurs courts (bandelettes) (Coste et Flahoult 1998). La majorité des Apiacées sont des plantes aromatiques grâce à leurs sécrétions d'huiles essentielles. L'appareil végétatif est parcouru de canaux sécréteurs contenant un mélange d'essence et de résines. Ces canaux sont très abondants au niveau des tiges ou l'on trouve un canal au niveau de chacune des cannelures, pourtant c'est au niveau des fruits que ces canaux sont les plus nombreux et les plus intéressants. Ces canaux sécréteurs sont situés au centre des organes de la plante et constitués d'une assise de cellules sécrétrices de forme allongée appelées poches sécrétrices. Ces dernières secrètent les essences qui sont délivrées dans le canal central. Ces canaux expliquent l'odeur forte qui se dégage des Apiacées lorsqu'on les broie.

I.2. Utilisation en médecine traditionnelle

La famille des Apiacées est la famille botanique la plus intéressante en phytothérapie pour le traitement des troubles fonctionnels digestifs (Filliat, 2012). De nombreuses espèces de *Ferula* sont connues depuis l'antiquité en tant que sources de gommés-oléorésines (des sécrétions obtenues par entailles répétées de la partie supérieure des racines) surtout le galbanum et l'ase fétide. L'ase fétide est réputée d'être carminative et spasmolytique (Bruneton, 2009). Elle est rarement toxique. En Asie centrale, *Assa-foetida* est utilisée aussi pour le traitement du cancer (Lee et al., 2010).

Plusieurs espèces du genre *Ferula* sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement des infections cutanées (Appendino et al., 2002) et l'hystérie (Boulos, 1983) et les troubles neurologiques et digestifs (Heywood, 1971). Alors que certaines variétés de *F. communis* sont connues pour leur toxicité (Rubiolo et al., 2006). Il faut souligner que les

racines et les résines des espèces de *Ferula* sont souvent les parties les plus utilisées en médecine traditionnelle (tableau 01).

Tableau 01 : Utilisations traditionnelles de *Ferula* sp (Alkhatib, 2010).

Noms d'espèces	Utilisation traditionnelle	Auteurs
<i>F. alliacea</i> Boiss.	Source d'ase fétide. Traitement de l'épilepsie, de l'hystérie et de la piqûre de scorpion. Propriétés carminatives et antiseptiques intestinales.	[Heywood, 1971]
<i>F. assa-foetida</i> L.	Source d'ase fétide. Arômes alimentaires. Propriétés expectorantes, carminatives, laxatives, stimulantes, antispasmodiques et anthelminthiques. Traitement de la grippe et du cancer.	[Heywood, 1971] [Lee et al., 2009] [Lee et al., 2010]
<i>F. badrakema</i> Kos. & Pol. syn. <i>F. gummosa</i>	Propriétés stimulantes. Traitement de l'épilepsie, de l'hystérie et des maux d'estomac.	[Heywood, 1971]
<i>F. communis</i> L. var. <i>breviedia</i> var. <i>communis</i>	Autrefois utilisée pour traiter l'hystérie et la dysenterie. Plante toxique pour les animaux et l'homme. Utilisée pour son latex, pour traiter les infections de la peau.	[Heywood, 1971] [Rubiolo et al., 2006]
<i>F. diversivittata</i> Regel & Schmalh	Prévention des convulsions et de l'hystérie	[Iranshahi et al., 2008]
<i>F. elaeochytris</i> Korovin	Les parties aériennes sont utilisées pour augmenter la fertilité chez les animaux. Aphrodisiaque.	[Miski et al., 1983]
<i>F. ferulaeoides</i> (S.) K. syn. <i>F. feruloides</i>	Utilisée pour traiter les muscles raides.	[Nagatsu et al., 2002]
<i>F. ferulago</i> L.	Antispasmodique	[Abd El-Razek et al., 2001]
<i>F. foetida</i> (Bunge) Regel	Source d'ase fétide. Propriétés diurétiques, anthelminthiques, antirhumatismales et antispasmodiques.	[Heywood, 1971] [Duan et al., 2002]
<i>F. galbaniflua</i> Boiss. & Buhse syn. <i>F. gummosa</i> Buhse	Source de galbanum. Utilisée dans la parfumerie et comme encens dans les églises. Propriétés antispasmodiques, expectorantes, carminatives et stimulantes. Traitement de l'aménorrhée et de l'hystérie.	[Heywood, 1971]
<i>F. hermonis</i> Boiss.	Utilisée au Moyen-Orient comme aphrodisiaque.	[Lhuilier et al., 2005]
<i>F. jeaschkeana</i> Vatke	Traitement des maladies et problèmes de peau.	[Heywood, 1971]
<i>F. kuhistanica</i> Eug. & Kor.	Traitement des maladies et problèmes de peau.	[Tamemoto et al., 2002]
<i>F. marmarica</i> Aschtaub	Source de gommés-oléorésines.	[Heywood, 1971]
<i>F. narthex</i> Boiss.	Source d'ase fétide.	[Heywood, 1971]
<i>F. orientalis</i> L.	Source de gommés-oléorésines.	[Miski et al., 1987]
<i>F. persica</i> Willd.	Source de gommés-oléorésines. Antidiabétique, utilisée aussi contre les douleurs dorsales et les rhumatismes.	[Heywood, 1971]
<i>F. suaveolens</i> Aitchison Hemsley	Peut-être source de gommés-oléorésines.	[Heywood, 1971]
<i>F. sumbul</i> Hook syn. <i>F. moschata</i> (Reinsch) Koso-Pol	Source de gommés-oléorésines. Propriétés antispasmodiques, stimulantes et carminatives. Pour traiter les problèmes de système nerveux.	[Heywood, 1971]
<i>F. szowitsiana</i> DC syn. <i>F. microloba</i> Boiss.	Source de gommés-oléorésines. Utilisée contre les rhumatismes.	[Heywood, 1971]
<i>F. teterrima</i> Kar. & Koro.	Utilisée en médecine traditionnelle chinoise contre les rhumatismes et des maladies de l'estomac.	[Yang et al., 2006]
<i>F. tingitana</i> L.	Source de gommés-oléorésines.	[Heywood, 1971]
<i>F. varia</i> Borszcz syn <i>F. schair</i>	Traitement contre la fièvre, les parasites intestinaux et pour rincer la bouche. Source de galbanum.	[Suzuki et al., 2007]
<i>F. vesceritensis</i> Coss. & DR. ex Batt.	La décoction de fruits est utilisée pour traiter les maux de tête, la fièvre et les infections de la gorge.	[Oughlissi-Dehak et al., 2008]

Des huiles essentielles, des extraits bruts et des produits purs obtenus de plantes du genre *Ferula* ont été testés pour plusieurs activités (antibactérienne, antivirale, estrogénique, ant-coagulante.....) (Maggi et al., 2009 ; Zhou et al., 2000 ; Ikeda et al., 2002 ; Kongure et al., 2004).

I.3. Le genre *Ferula*

Le genre *Ferula* se rattache à la famille des Apiacées qui appartient à l'embranchement des spermatophytes ou phanérogames (plantes à graines) et à la classe des Magnoliopsida (Dicotylédones). Les plantes du genre *Ferula* croissent souvent dans les régions arides. Ce genre comporte environ 150 espèces présentes du bassin méditerranéen jusqu'à l'Asie centrale (Pimenov et al., 1993). Le genre *Ferula* est représenté par cinq espèces en Algérie à savoir : *F. lutea* (Poiret) Maire, *F. cossoliella* Batt. et Trab., *F. communis* L., *F. tingitana* L. et *F. vesceritensis* Coss et DR (Quezel et Santa., 1962).

I.3.1. Position systématique du genre *Ferula* (classification APG III, 2009)

La classification APG III (2009), ou classification phylogénétique, est la troisième version de classification botanique des angiospermes établie par l'Angiosperms Phylogeny Group. La position de la famille des Apiacées y compris le genre *Ferula* dans ce système de classification est la suivante :

Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones vraies

Sous Classe : Astéridées

Super Ordre : Campanulidées

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre : *Ferula*

I.4. *Ferula vesceritensis* Coss. & DR

I.4.1. Description botanique

Plante vivace lorsque les conditions climatiques le permettent, pouvant atteindre plus de 1 mètre de hauteur. En été, elle n'est représentée que par une rigide tige creuse. Feuilles à division allongées. Fleurs vertes, à pétales larges portant des poils sur leur nervure dorsale. Floraison en avril-mai. Fruits ovales, à sommet pointus et portés par des pédoncules plus

courts qu'eux. Elle se rencontre dans la partie orientale de l'Atlas saharien et du Sahara septentrional. Plante endémique saharienne. Elle se rencontre dans la partie orientale de l'Atlas saharien et du Sahara septentrional.

I.4.2. Pharmacopée : Chahma (2006) signale que les fruits sont utilisés en infusion, pour le traitement des angines, des fièvres et des migraines



Figure 01 : *Ferula vesceritensis* Coss. & DR (Photos Rahmouni).

I.4.3. Les principaux constituants chimiques

La plupart des constituants du genre *Ferula* sont des sesquiterpènes et sesquiterpènes coumarines (Alkhatib, 2010). Plus de 70 espèces ont été étudiées chimiquement, les germacrènes, humulanes, carotènes, himachalanes et guaïanes ce sont les sesquiterpènes majoritaires du genre *Ferula* (Gonzalez et Barrera 1995; El-Razeh et al., 2003). Les férules sont connues par leur toxicité et leur pharmacologie.

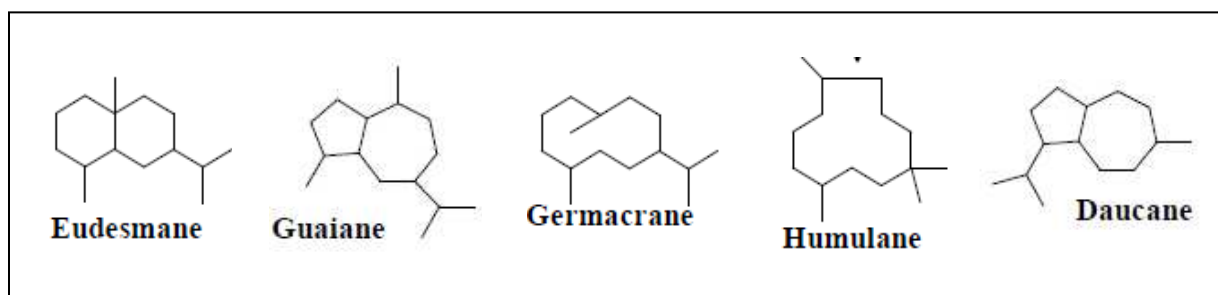


Figure 02 : Les principaux constituants chimiques du genre *Ferula*

I.5. Description botanique de *Balansea glaberrima* (Desf.) Lange

Plante vivace à bulbe de 1-2 cm, à tige annuelle très glabre de 15-60 cm. Feuilles inférieures à 3 lobes ovoïdes ± 3 lobés, les supérieures 2-3 pennatiséquées à lobes lancéolés aigus. Involucre et involucelle présents. Ombelles à 5-10 rayons grêles. Fleurs blanches. Fruits brunissant, 2-3 fois plus longs que larges, longs de 4-5 mm noirâtres 1 forêts –Elle est assez commune dans toutes les forêts des régions montagneuses. La plante est une endémique de l’Afrique du Nord (= *Scandix glaberrima* Desf, *B. Fontanesii* Boiss. et Reut.).



Figure 03 : *Balansea glaberrima* (Desf.) Lange (Photos Rahmouni).

Chapitre II

Etude des huiles essentielles

II.1. Définition

Les huiles essentielles sont des produits huileux, odoriférants et volatils contenues dans les différentes parties des végétaux (Bruneton, 1999; Wichtl et Anton, 1999; Ghestem et *al.*, 2001). Selon Cavalli (2002) les huiles essentielles ne sont pas des corps simples mais des assemblages de molécules diverses, ayant chacune leur propriété particulière, mais aussi une interaction biochimique et énergétique entre elles, donc une huile essentielle est désignée comme une véritable synergie en elle-même. La volatilisation des huiles essentielles les oppose aux huiles fixes par leur composition chimique et leurs caractéristiques. Elles sont fréquemment associées à d'autres substances, telles que des gommés et des résines et tendent elles-mêmes à se résinifier par exposition à l'air (Belaiche, 1979).

II.2. Répartition et localisation

Les huiles essentielles sont réparties dans tous les organes de certains végétaux. Il existe selon Belaiche (1979); Paris et Hurabielle (1981); Bruneton (1999) plusieurs systèmes de sécrétions tels que les poches sécrétrices schizogénèses (Myrtacées), les poches sécrétrices schizolysigènes (Aurantiacées), les canaux sécréteurs (Conifères et Apiacées), les poils sécréteurs (Lamiacées et Apiacées), et les cellules sécrétrices (Lauracées, Magnoliacées et Pipéracées). Garneau (2004) trouve que la plupart des huiles essentielles se retrouvent dans des glandes. Il faut noter cependant que plusieurs catégories de tissu sécréteur peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe.

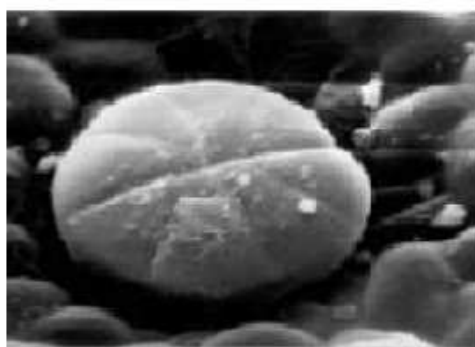


Figure 04 : Glande simple, entièrement chargée d'huile et en forme de dôme (800x) (Sharma et *al.*, 2003)



Figure 05 : Les poils épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan (Porter, 2001)

II.3. Rôle des huiles essentielles dans la plante

Beaucoup de plantes produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact est inconnu (Rai et *al.*, 2003). Elles pourraient avoir un rôle attractif vis-à-vis des

insectes pollinisateurs et favoriseraient ainsi la pollinisation, comme elles peuvent exercer un rôle répulsif pour les insectes et une action antiseptique vis-à-vis de certains microorganismes (Bruneton, 1999; Abou Zeid, 2000; Guignard, 2000). Certains auteurs affirment que les huiles essentielles jouent un rôle hormonal, régulateur et catalyseur dans le métabolisme végétal et semblent aider la plante à s'adapter à son environnement.

Belaiche (1979) signale que l'utilité des huiles essentielles pour les plantes désertiques est liée à la conservation d'une humidité indispensable à la vie des plantes, les vapeurs aromatiques permettent de saturer l'air autour de la plante empêchant le jour, la température de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de baisser de façon excessive.

II.4. Qualité des huiles essentielles

Selon la pharmacopée française et européenne, le contrôle des HE s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques: indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants. La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Une HE pure et naturelle est caractérisée par sa composition strictement «végétale» (pas de traces indésirables tels que des pesticides ou de produits chimiques ajoutés) (Pibiri, 2006).

II.5. Les propriétés physiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont aisément remarquables par leur odeur qui peut être très agréable (Lavande, Romarin...) ou repoussante (Barbote dite «Fétide»). Elles sont liquides à température ambiante, volatiles, apolaires et de densité généralement bien inférieure à celle de l'eau, ce qui permet leur obtention par hydro distillation. Elles sont Généralement incolores ou jaune pâle à l'exception de quelques huiles essentielles telles que l'huile de l'Achillée et l'huile de la Matricaire. Ces dernières se caractérisent par une coloration bleu à bleu verdâtre, due à la présence de l'azulène et du chamazulène (Abou zeid, 2000). La plupart des huiles essentielles ont une densité inférieur à celle de l'eau, il existe cependant, des exceptions telles que les huiles essentielles de Sassafras, de Girofle et de Cannelle dont la densité est supérieure à celle de l'eau. Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire (Paris et Hurabeille, 1981; Duraffourd et *al.*, 1990; Salle et Pelletier, 1991). Les huiles essentielles s'évaporent et se sont volatiles à température ambiante. Très peu solubles dans l'eau à laquelle, elles communiquent leurs odeurs, cette eau est dite «eau distillée florale». Les huiles essentielles sont solubles dans les alcools, dans les

huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques (Paris et Hurabielle, 1981; Bruneton, 1999; Abou Zeid, 2000; Ghestem et *al.*, 2001). Leur point d'ébullition est toujours supérieur à 100°C et dépend de leurs poids moléculaire par exemple les points d'ébullition du caryophyllée, du géraniol, du citral, et du α -pinène sont 260, 230, 228 et 165°C respectivement (Abou Zeid, 2000), mais d'après valnet (1984), ce point varie de 160 à 240°C.

II.6. La toxicité des huiles essentielles

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

Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde (Smith et *al.*, 2000) ou phototoxiques (huile de Citrus contenant des furocoumarines (Naganuma et *al.*, 1985). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique, à titre d'exemple les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (Franchomme et Péroël 1990). Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capable d'induire la formation de cancer (Homburger et Boge., 1968), c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme la safrol (Sassafras), l'estragole (*Artemisia dracunculus*), la β -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hépatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs (Wiseman et *al.*, 1987). Le safrol et l'estragole, par exemple, sont métabolisés par les microsomes au niveau du foie des rats et des souris en dérivés hydroxylés puis en esters sulfuriques électrophiles qui eux sont capables d'interagir avec les acides nucléiques et les protéines (Kim et *al.*, 1999). Toutefois, ces résultats sont controversés car il existe des différences chez l'homme dans le processus de métabolisation de ces composés. Le safrol, par exemple, est métabolisé chez l'humain en dihydroxysafrol et trihydroxysafrol non cancérigène (Franchomme et Péroël 1990). De plus, tout dépend de la dose administrée lors des expériences et bien souvent la dose absorbée par l'animal est loin de correspondre à celle qu'un homme est susceptible d'ingérer par jour (Guba, 2001).

II.7. Les procédés d'extraction des huiles essentielles

L'obtention des huiles essentielles fait appel à diverses techniques d'extraction. Certaines sont plus anciennes et simple d'opération et d'autres plus récentes et performantes mais plus complexe d'opération. Ces dernières visent à optimiser la qualité de l'huile, tout en maintenant un rendement intéressant. Les techniques d'extraction les plus employées sont: la distillation, l'extraction par les solvants, l'extraction par enfleurage, l'extraction par expression, l'extraction par micro-ondes, l'extraction au fluide supercritique.

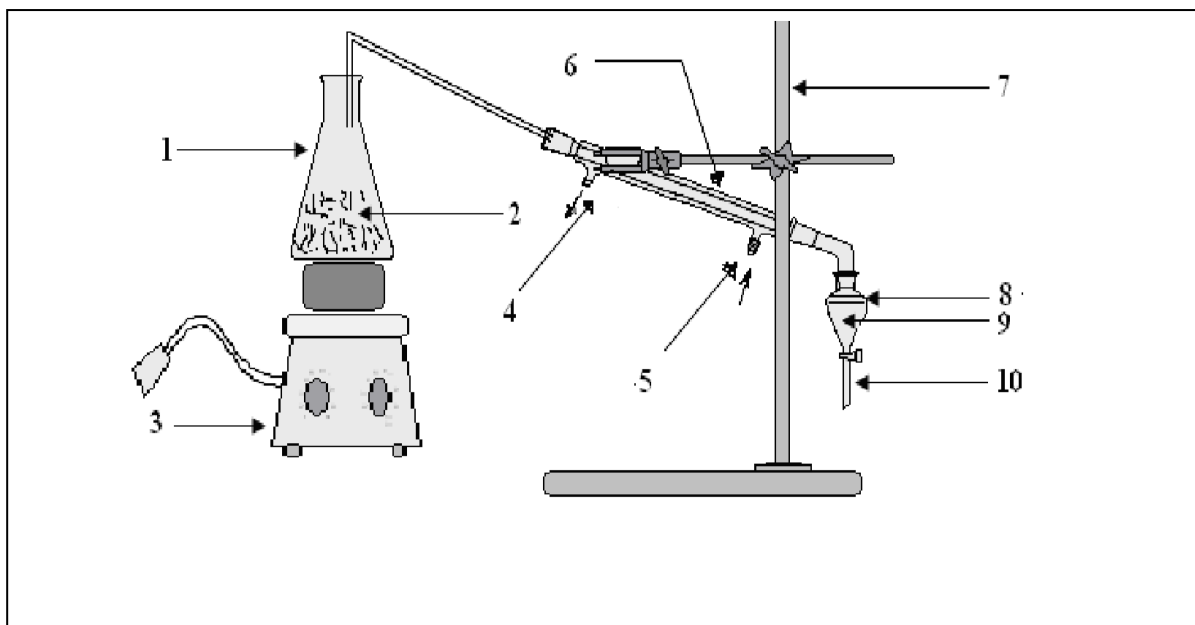
II.7.1. La distillation

La technique d'extraction des huiles essentielles utilisant l'entraînement des substances aromatiques grâce à la vapeur d'eau est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle. La méthode est basée sur l'existence d'un azéotrope de température d'ébullition inférieure des deux composés, l'huile essentielle et l'eau, pris séparément. Ainsi, les composés volatils et l'eau distillent simultanément à une température inférieure à 100°C sous pression atmosphérique normale. En conséquence, les produits aromatiques sont entraînés par la vapeur d'eau sans subir d'altérations majeures (Franchomme et Pénéol 1990). Il existe précisément trois différents procédés utilisant ce principe: l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Beaucoup de confusion règnent autour de l'utilisation de ces trois termes. Quelques éclaircissements s'imposent donc.

II.7.1.1. L'hydrodistillation (water distillation)

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée (Figure 13). La méthode appliquée dont le principe est similaire à celui de Clevenger. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat. L'inconvénient de cette méthode est que le matériel végétal risque facilement de se calciner, ce qui entraîne une modification de la composition chimique et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle (Abou zeid, 2000). Il faut noter cependant que certaines fleurs dont les molécules sont trop fragiles pour survivre à une hydro distillation, elles sont extraites soit par des solvants organiques (hexane, éther de pétrole, éthanol) (Mimosa, Narcisse, Rose, Tubéreuse....), soit par la technique ancienne de l'enfleurage (Jasmin et Rose de Grasse). Après distillation les huiles essentielles sont recueillies et conservées au

réfrigérateur à 4°C dans des flacons sombres pour les préserver de la chaleur et de la lumière (Denny, 1991).



Légende : 1 -le flacon Erlenmeyers, 2-l'eau+la plante, 3-chauffe-ballon, 4-la sortie de l'eau, 5-l'entré de l'eau, 6-réfrigérant, 7-le support de réfrigérant, 8-l'huile essentielle, 9-l'eau aromatique, 10-l'ampoule à décompter

Figure 06 : le montage de l'hydrodistillation (Luicita, 2006).

II.7.1.2. Distillation par entrainement à la vapeur d'eau (Stream distillation)

C'est le procédé qui est le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des fins thérapeutiques (Bego, 2001). Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée à travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entrainées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (Franchomme et Péroël 1990).

II.7.1.3. L'hydrodiffusion

Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas (per descendu) et à pression réduite, la vapeur d'eau à travers de la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils ce qui lui vaut une appellation spéciale: «essence de percolation» (Franchomme et Péroël, 1990; Richard, 1992).

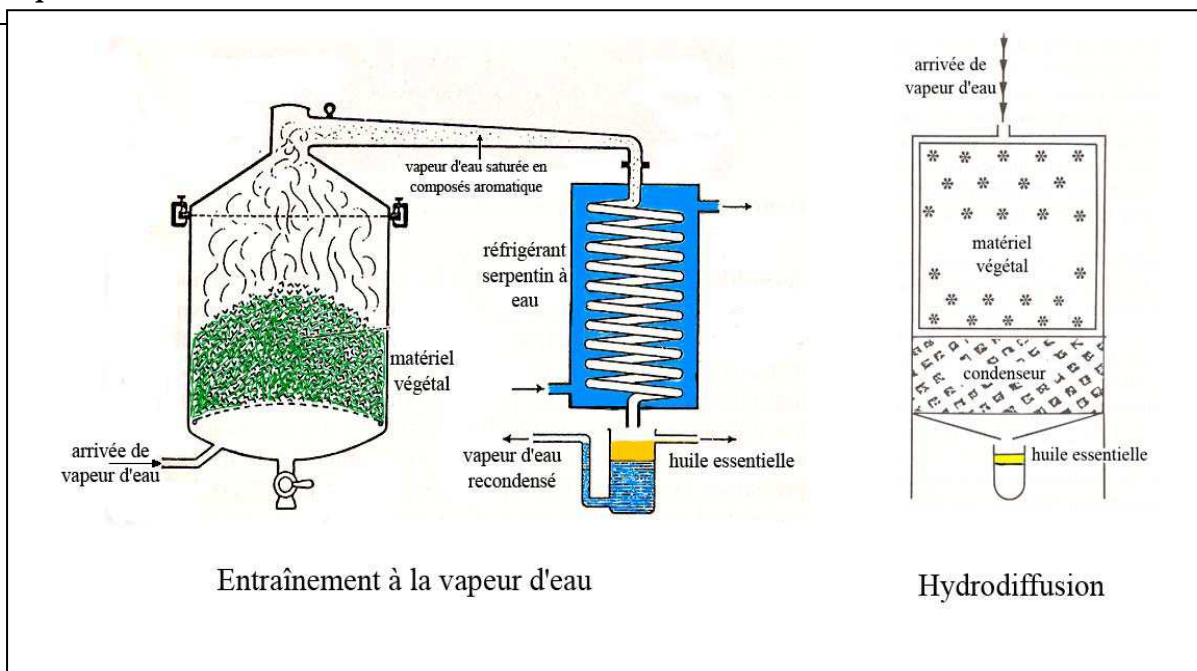


Figure 07 : Entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodiffusion (Lucchesi, 2005).

II.7.2. Extraction par micro-ondes

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation (fig. 08). Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable. En guise d'exemple, l'extraction par micro-ondes de deux kilos de *Menthe piperita* permet d'obtenir environ 1% d'huile essentielle en 15 minutes alors que deux heures d'hydrodistillation sont nécessaires pour obtenir un rendement similaire à partir de la même masse de la plante (Mengel et al., 1993). La composition de l'huile essentielle obtenue par ce procédé est bien souvent semblable à celle obtenue avec un procédé traditionnel d'entraînement à la vapeur. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes. Ceci est dû à la faible quantité d'eau présente dans le système et à la rapidité du processus de chauffage. Ainsi les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées (Bendahou et al., 2007; Lucchesi et al., 2007). Cette technique présente donc beaucoup d'avantages: technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (Mengel et al., 1993; Lucchesi et al., 2004). L'extraction par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée (Chemat et al., 2006; Flamini et al., 2007; Lucchesi et al., 2007).

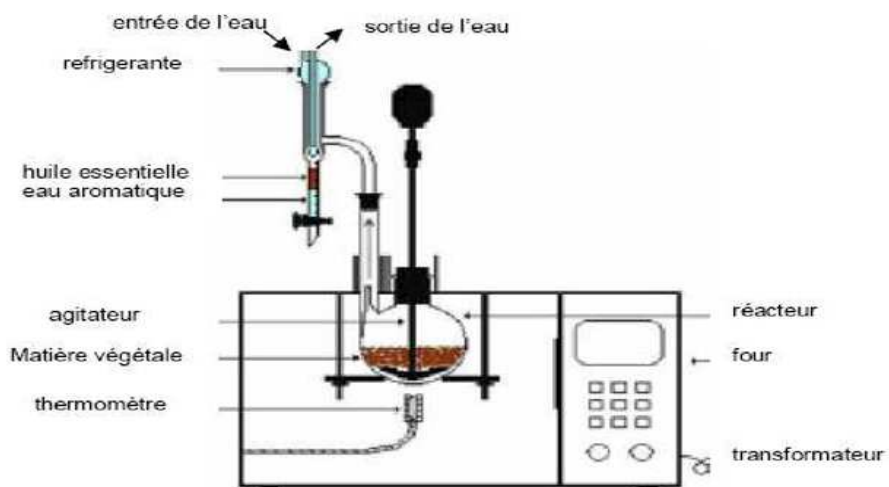


Figure 08 : Le montage d'extraction par micro-ondes (Luicita, 2006).

II.7.3. Extraction par les solvants organiques

Certains procédés d'extraction ne permettent pas d'obtenir des huiles essentielles mais des concrètes. Il s'agit d'extraits des plantes obtenus au moyen de solvants non aqueux. Ces derniers sont généralement des solvants usuels (hexane, éther de pétrole) utilisés en chimie organique. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres (Richard, 1992; Robert, 2000). L'extraction à l'aide des solvants organiques pose un problème de toxicité des solvants résiduels ce qui n'est pas négligeable lorsque l'extrait est destiné aux industries pharmaceutiques et agro-alimentaires (Bruneton, 1999).

II.7.4. Extraction au CO₂ supercritique

L'originalité de cette technique d'extraction réside dans le type de solvant employé: le CO₂ supercritique. Au-delà du point critique ($p=73,8$ bars et $T= 31,1^{\circ}\text{C}$), le CO₂ possède des propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction, qui plus est, facilement modulable en jouant sur les conditions de température et de pression. Cette technique présente énormément d'avantage. Tout d'abord le CO₂ supercritique est un solvant idéal puisqu'il est naturel, inerte chimiquement, ininflammable, non toxique, sélectif, aisément disponible et peu couteux. De plus, il s'élimine facilement de l'extrait sans laisser des résidus. Outre ces avantages, le principal point fort est la qualité irréprochable de l'extrait

puisque aucun réarrangement ne s'opère lors du processus. Son unique inconvénient est le coût très élevé de son installation (Pellerin, 1991). En jouant sur les conditions de température et de pression, il est possible de rendre l'extraction plus sélective aux composés odorants et ainsi obtenir des extraits de composition tout à fait semblable aux huiles essentielles, non chargées en molécules non volatiles. Ainsi, la température et la pression ne pas dépasser pour extraire uniquement les principes volatils est 60°C et 60 bars (Richard, 1992). Cette technique est aujourd'hui considérée comme la plus prometteuse car elle fournit des extraits de très haute qualité (Weening et *al.*, 2007) et qui respecterait intégralement l'essence originelle de la plante.

II.7.5. L'extraction par enfleurage

Ce procédé se base sur la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Il consiste à déposer des pétales de fleurs fraîches sur des plaques de verre recouvertes de minces couches de graisses (graisse animale type syndaux). Selon les espèces, l'absorption des huiles essentielles des pétales par le gras peut prendre de 24 heures (Jasmin) à 72 heures (Tubéreuse). Les pétales sont éliminés et remplacés par des pétales fraîches jusqu'à saturation du corps gras. On épuise ce corps gras par un solvant que l'on évapore ensuite sous vide (Belaiche, 1979; France Ida, 1996). Pour les fleurs qui supportent une macération à chaud, elles sont immergées dans un corps gras chauffé à 45-60°C pour une durée de 1 à 2 heures puis le corps gras est filtré et séparé des pétales de fleurs. La macération est surtout utilisée pour les fleurs délicates qui perdent leurs arômes très rapidement après la cueillette, comme les Violettes et certains Lys (France Ida, 1996). Cette opération est appelée également digestion ou enfleurage à chaud (Bruneton, 1999). La technique d'enfleurage est rarement pratiquée de nos jours, en raison de son faible rendement et de l'importante main d'œuvres qu'elle nécessite (Abou Zeid, 1988).

II.7.6. Extraction par expression

Ce procédé ne convient que pour l'extraction des essences d'agrumes (Citron, Orange, Pamplemousse, Bergamote....) car les essences sont altérables par entraînement à la vapeur d'eau. L'expression des zestes est réalisée soit manuellement, soit à l'aide d'une machine. Ce procédé consiste à rompre les poches sécrétrices et recueillir directement l'huile essentielle (Bruneton, 1999); ou encore après scarification mécanique, un entraînement de l'huile essentielle par un courant d'eau. L'essence est séparée par décantation comme précédemment (Paris et Hurabielle, 1981). Cette méthode artisanale est totalement abandonnée au bénéfice des machines utilisées pour permettre l'extraction des jus des fruits d'une part, et d'essence d'autre part (Belaiche, 1979).

II.8. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles se composent généralement de très nombreux constituants qui appartiennent de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétique distinctes: le groupe des terpénoïdes (composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane, ce groupe est beaucoup moins fréquent. Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

II.8.1. Les composés terpéniques

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbones ($C_5 H_8$) reconnue par Wallach dès 1887. Mohammedi (2006) signale que Cet isoprène est à la base du concept de la «règle isoprénique» énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen et *al.*, (1958) et Bloch et *al.*, (1959). Cette règle considère le diphosphate d'isopentényle (IPP), désigné sous le nom d'isoprène actif comme le véritable précurseur de la molécule terpénique (fig.09 et 10). La conversion de l'IPP en composés terpéniques se déroule dans les trois compartiments; cytoplasme, mitochondries et plastes et les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion sont hydrosolubles ou membranaires. Selon le nombre d'unité isoprénique, on distingue les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les triterpènes (C_{30}), les tetraterpènes (C_{40}), les polyterpènes (~4000) (Lafont et Duval, 2001; Dubey et *al.*, 2003). Seuls les terpènes les plus volatils (masse moléculaire n'est pas trop élevée) (terpinols: 136 u.m.a (unité de masse atomique), terpinols; 154 n.m. a, et sesquiterpènes: 200 u.m.a.) qui confère aux huiles essentielles le caractère volatil qui est à la base de leurs propriétés olfactives. Les constituants majoritaires des huiles essentielles sont généralement les mono et sesquiterpènes. Les terpènes sont constitués d'un mélange d'hydrocarbures et de composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures. Dans certaines huiles essentielles, les hydrocarbures prédominent (ex. l'essence de Térébenthine) dans d'autres, la majeure partie de l'essence est constituée de composés oxygénés.

Il est à noter que l'odeur et le goût des huiles essentielles sont donnés par ces composés oxygénés. Parmi ces composés oxygénés on note: les alcools comme le géraniol, les esters comme acétate de linalyl, les aldéhydes, (menthane, camphre) les cétones, les éthers, les phénols et les peroxydes (Paris et Hurabielle, 1981; Svoboda et Hampton, 1999).

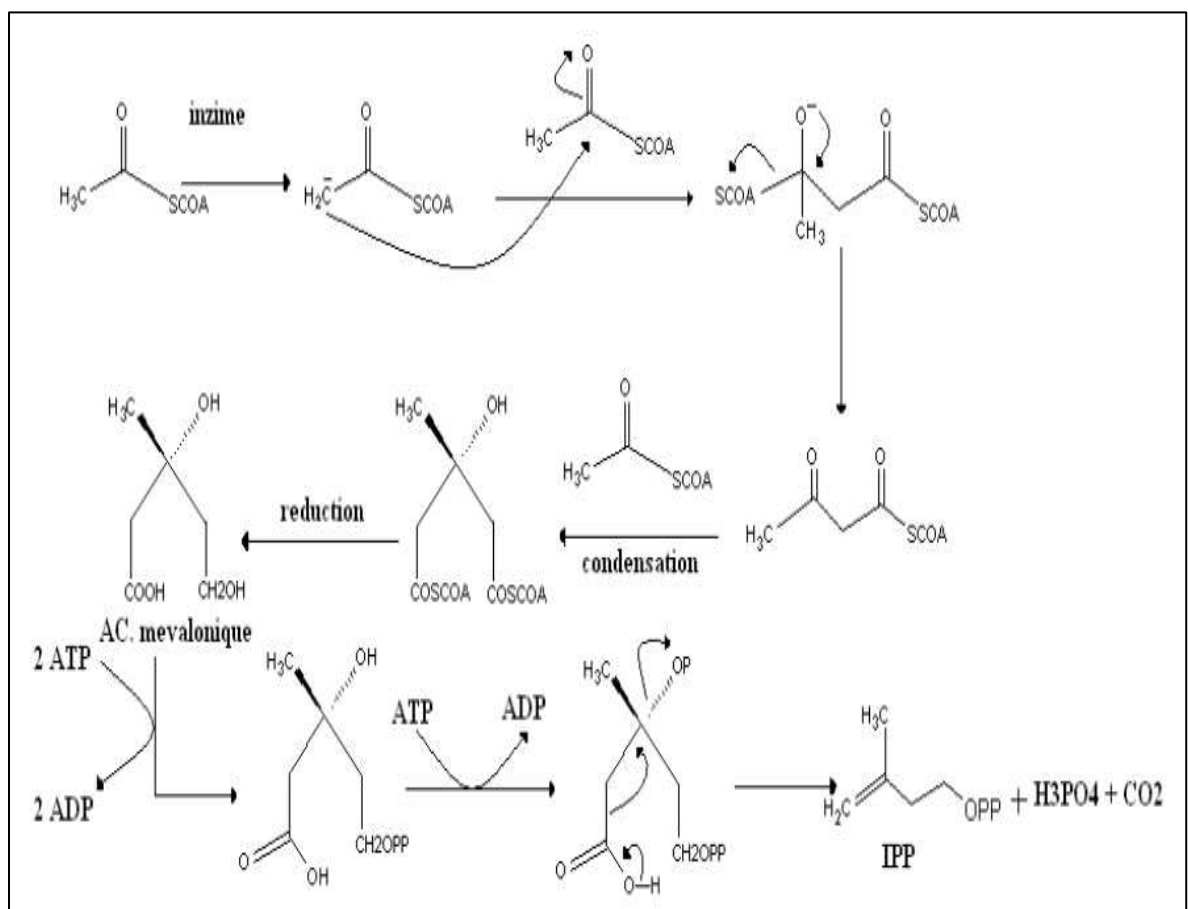
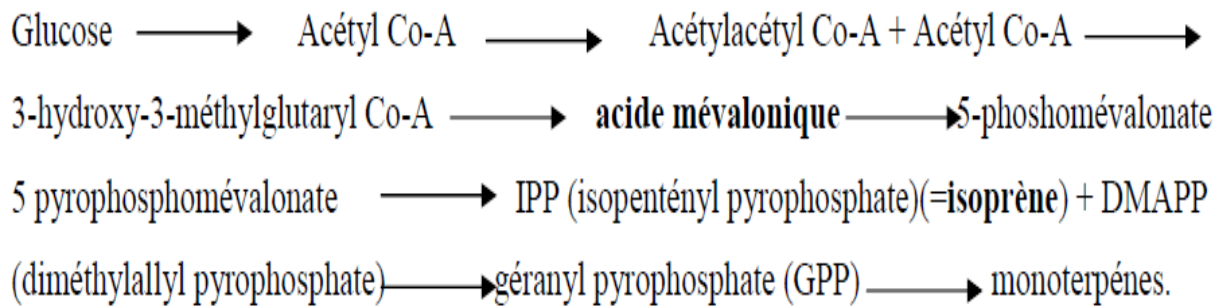


Figure 09: Biosynthèse de monoterpènes

Il convient de souligner que la synthèse des terpènes n'est pas propre aux végétaux. Le squalène, ainsi que son nom l'indique est un terpène abondant chez les requins. Des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent également chez les spongiaires et les cœlentérés (Guignard, 2000).

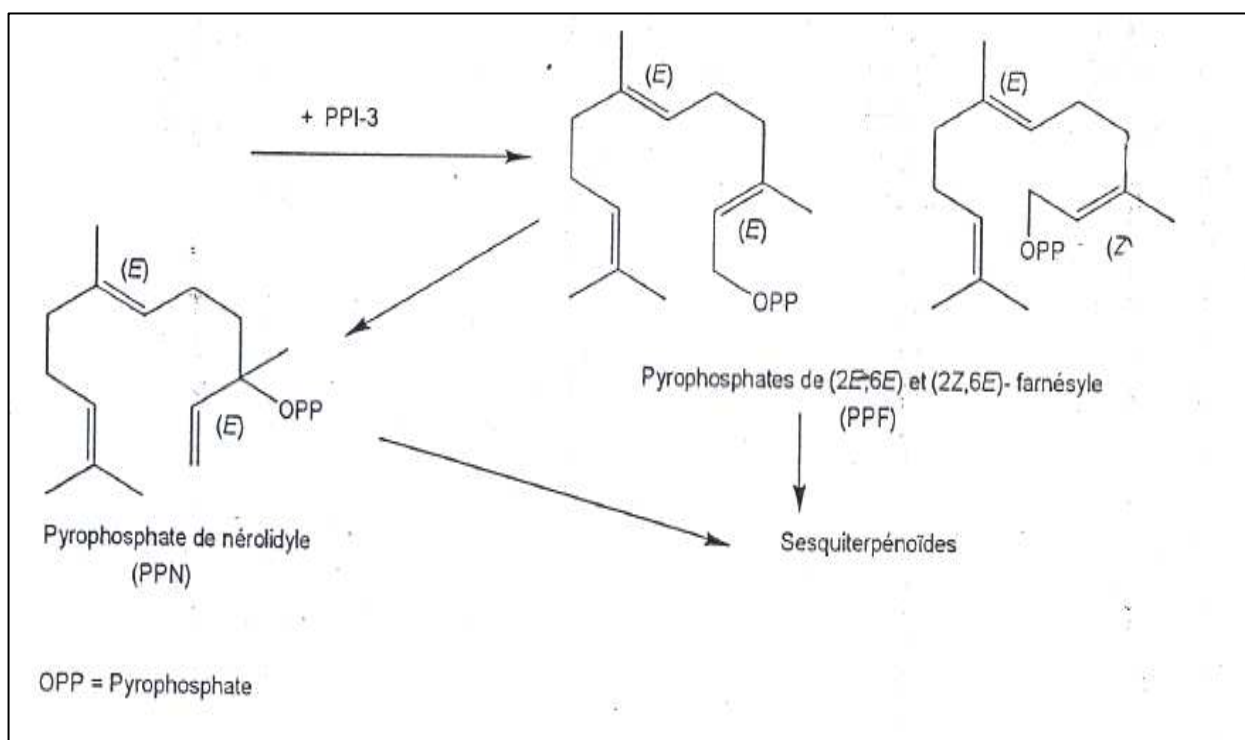
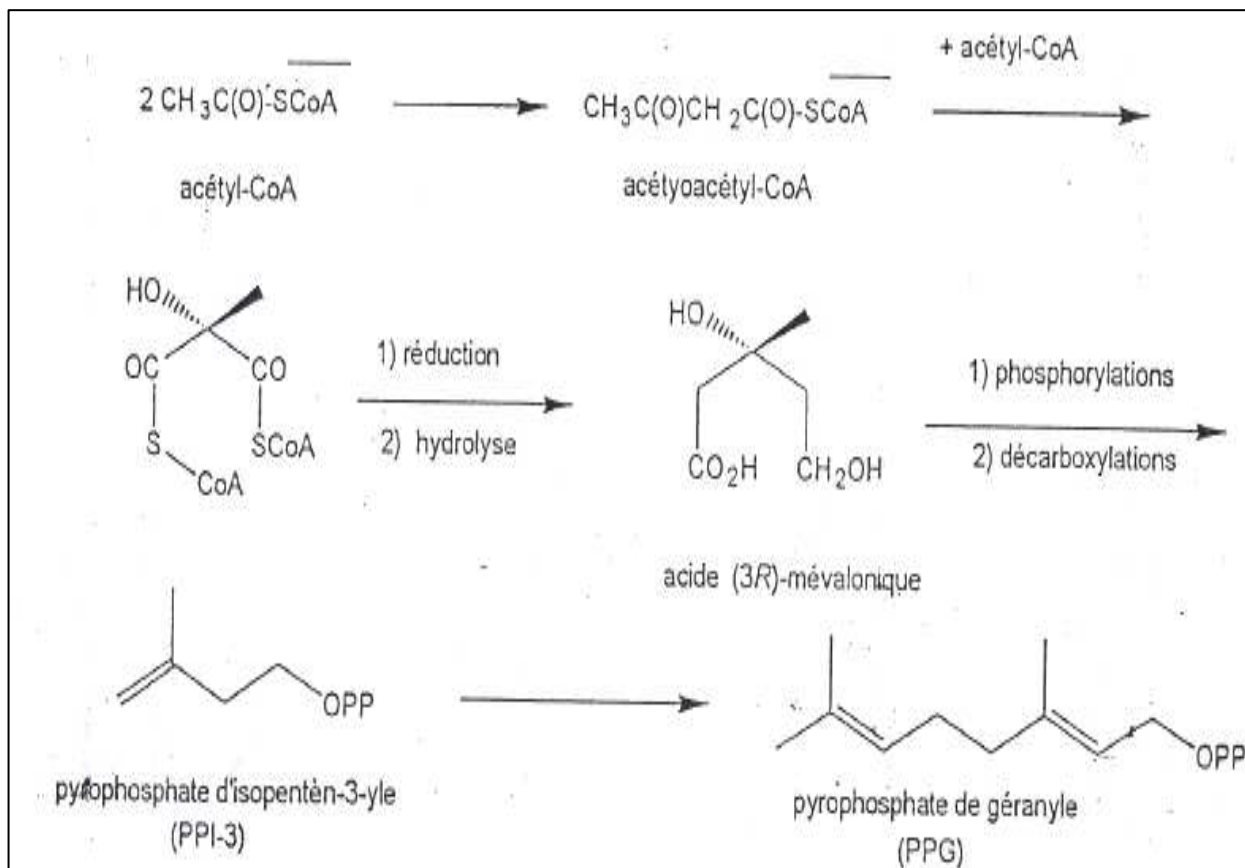


Figure 10 : Biosynthèse de sesquiterpènes

II.8.1.1. Les monoterpènes

Sont formés par 2 unités d'isoprènes, de formule générale (C₁₀ H₁₆), ils peuvent être (Fig11) acycliques (néroli, géraniole, (+)-citronellal et β-mycènes), monocycliques (limonène, (-)-menthol, phellandréne, α-terpinéol, carvone, menthone, pulégone, cinéol, diosphénol, aldéhyde cuminique, thymol, carvacrol, P-cymène) ou bicycliques (α-pinène, camphre, bornéol, verbénène, pinocamphore, et thuyène (Bruneton, 1999). Ils portent des fonctions dont le degré d'oxydation est variable (alcool, aldéhydes, cétone) (wichtl et Anton, 1999).

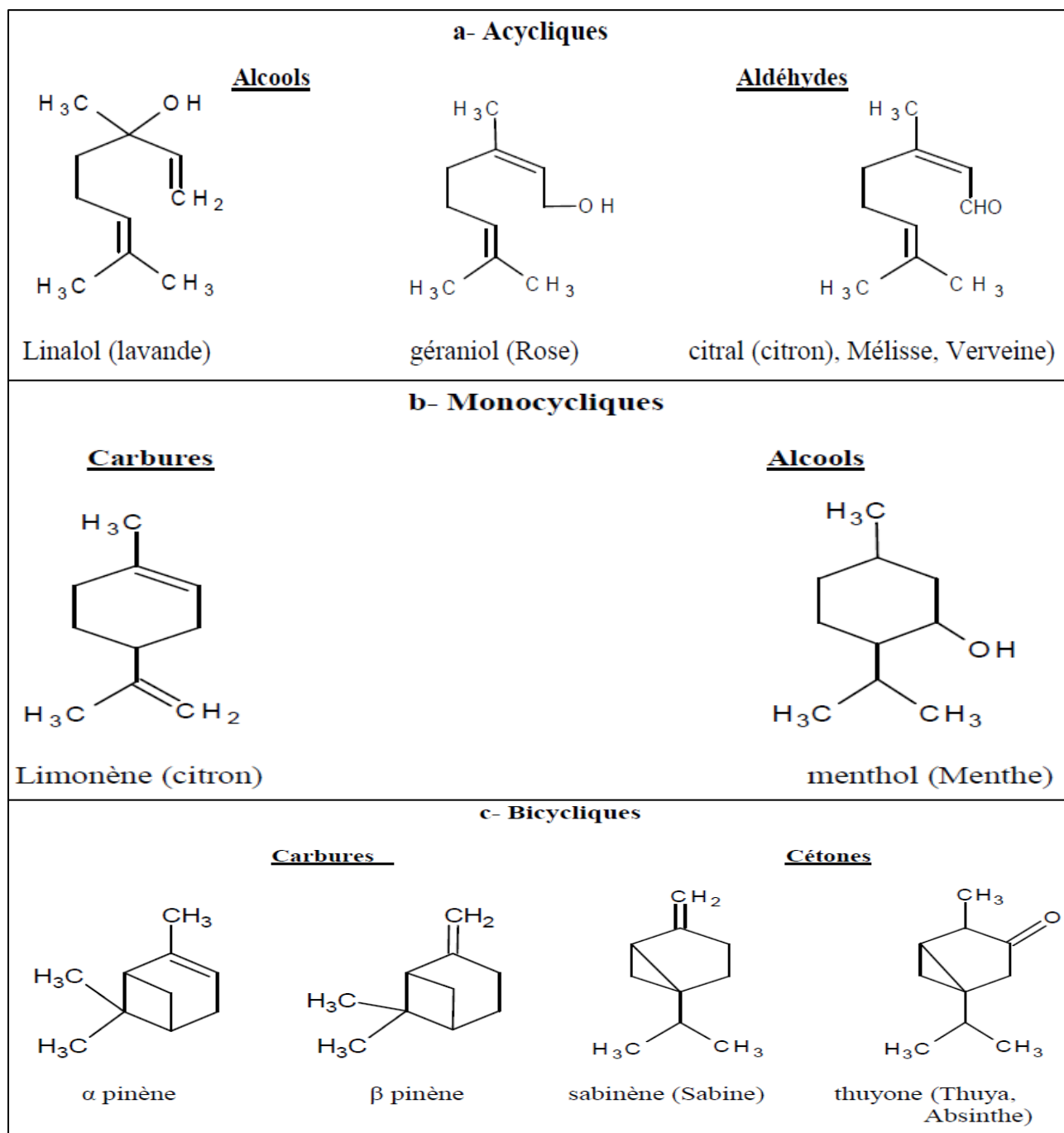


Figure 11 : exemple de quelques monoterpènes

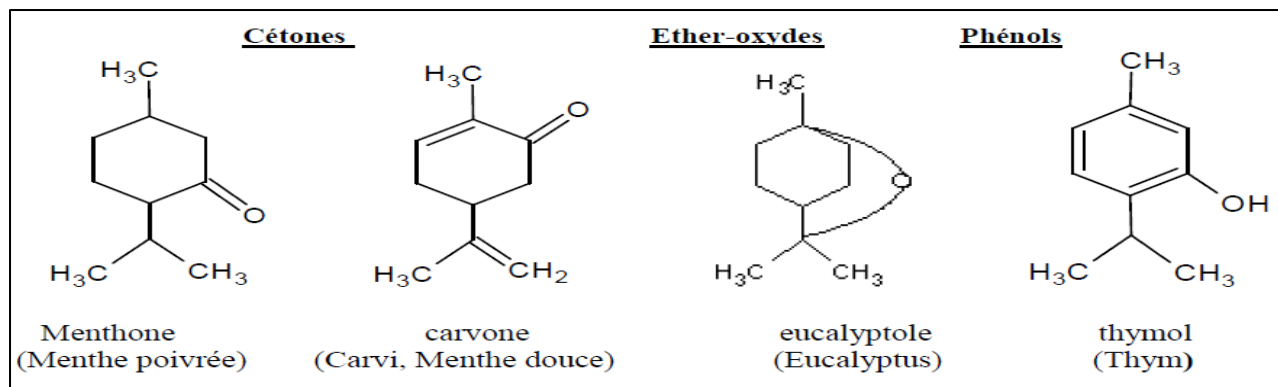


Figure 11 (suite): exemple de quelques monoterpènes

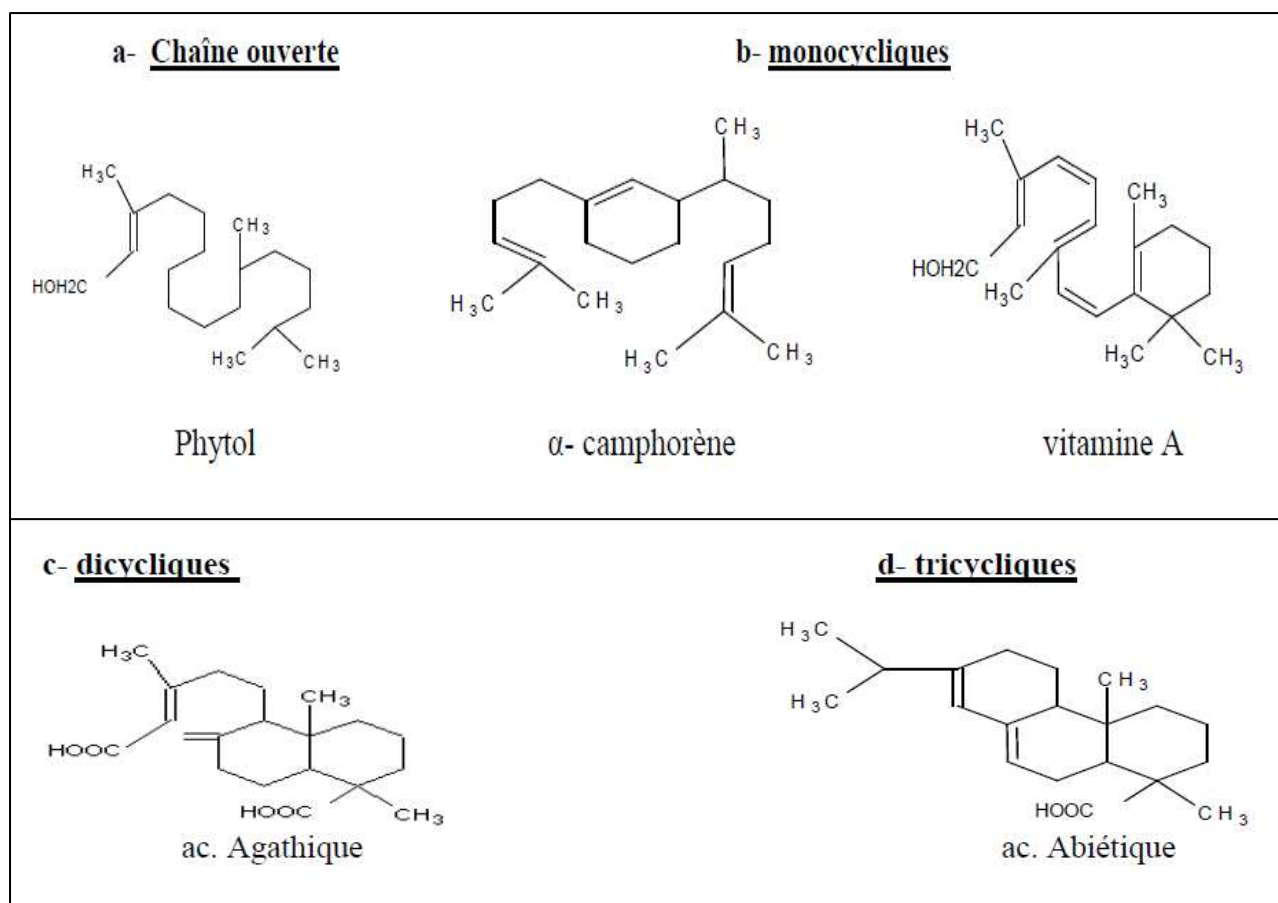


Figure 12: exemple de quelques diterpènes

II.8.1.2. Les sesquiterpènes

Sont formés de l'assemblage de 03 unités isoprènes (C_{15}), leur formule est $C_{15}H_{24}$, les variations structurales dans cette série sont de même nature que le cas précédent, carbures, alcools et cétones étant les plus fréquents (Bruneton, 1999). Comme les monoterpènes, les sesquiterpènes peuvent être (Fig13) acycliques (farnésol), monocyclique (humulène, α -zingibérène), ou

polycycliques (matricine, arténuaie β , artémisinine), des alcools (farnésol, carotol, β -santalol, patchoulol), des cétones (nootkatone, cis-longipinane-2,7-dione, β -vétivone, des aldéhydes (sinensals) et des esters (acétate de cédryle).

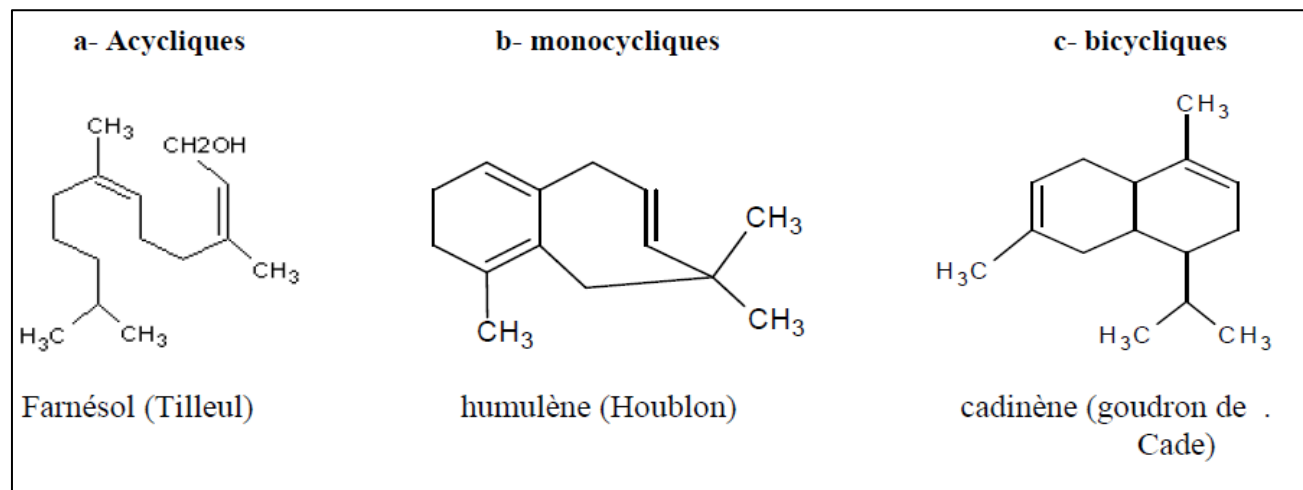


Figure 13: exemple de quelques sesquiterpènes

II.8.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), mais qui sont beaucoup moins fréquents que les terpènes et dont la biogénèse est totalement différente (Paris et Hurabielle, 1981). D'après Bruneton (1999) ces composés sont très souvent des allyl et propényl phénols parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiacées (Anis, Fenouil, anéthol, anisaldéhyde, méthyl-chavicol=estragol, Persil: apiole) mais aussi de celles du Girofle (eugénol), de la Muscade (safrol, eugénol), de l'Estragon (eugénol), du Basilic (eugénol), de L'Accorce (asarones) ou des Cannelles (cinnamaldéhydes, eugénol, safrol). Selon le même auteur, on peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C_6-C_1 comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'antranilate de méthyl, mais aussi des lactones dérivées des acides cinnamiques (Bruneton, 1999).

II.8.3. Composés d'origines diverses

Ces composés entrent également dans la constitution des huiles essentielles mais en faible proportion. Il s'agit de produits issus de la dégradation des acides gras et des terpènes. Des composés azotés et soufrés peuvent également se rencontrer dans les huiles essentielles mais d'une manière très rare (Bruneton, 1999; Svoboda et Hampton, 1999). Abou Zeid (1988) signale que le composé soufré le plus rencontré est l'allyle-isothiocyanate issu de la dégradation d'un glucoside sinigraside qui se

trouve dans les graines de Moutarde noire. Ce composé est incolore, fluide et de saveur piquante. Certaines plantes aromatiques produisent des huiles essentielles dont les composés terpéniques renferment l'élément nitrogène. Parmi ces composés on cite l'indole, extrait de l'huile essentielle de Citron et des fleurs de Jasmin. Signalons enfin que, dans les Concrètes, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaire plus importante, non entraînés à la vapeur d'eau, mais extractibles par les solvants: homologues des phényles propanes, diterpènes, etc. (Bruneton, 1999).

II.9. Les chémotypes

Au sein d'une même espèce de plante, la composition de l'huile essentielle des divers individus peut présenter des profils chimiques ou chémotypes différents. L'exemple le plus marquant est celui de l'espèce sauvage *Thymus vulgaris* présente dans le Sud de la France. Il existe en effet six chémotypes différents pour cette seule espèce. Ces différences sont au niveau de la nature du monoterpène majoritaire de l'huile essentielle qui peut être soit le géraniol, l' α -terpinéol, le thuyanol-4, le linalool, le carvacrol ou le thymol (Thompson et al., 2003). Ce polymorphisme chimique existe aussi pour bien d'autres espèces. *Origanum vulgare* (Mockute et al., 2001), *Mentha spicata* (Edris et al., 2003) en sont des exemples. Il est important de noter que des huiles essentielles à chémotypes différents présenteront non seulement des activités différentes mais aussi des toxicités très variables. Ainsi, la méconnaissance des chémotypes peut parfois être à l'origine d'accidents graves. L'absinthisme (intoxication à l'absinthe) en est un exemple frappant.

II.10. Les facteurs influençant la composition

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques. Chez *Mentha piperita* par exemple, les nuits froides favorisent la formation de menthol alors que les nuits tempérées favorisent celles du menthofuranne (Bruneton, 1999). Les études portant sur la variation de la composition chimique des huiles essentielles en fonction du cycle circadien et des saisons sont nombreuses (Assad et al., 1997; Lopes et al., 1997). L'heure de la récolte du matériel végétal ainsi que le moment dans l'année sont en effet des facteurs importants. A titre d'exemple, il a été démontré que, la composition de l'huile essentielle de feuilles d'*Origanum gratissimum*, varie considérablement en fonction de l'heure de la récolte (Tableau 02) (Vasconcelos et al., 1999).

Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en huile essentielle. Les Citrus par exemple ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la

température est élevée (Bruneton, 1999). Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* sont plus riches en huile essentielle sous l'effet de fertilisants (Alvarez-Castellanos et Pascal-Villabos, 2003)

Tableau 02 : Variation de la composition de l'huile essentielle d'*Origanum gratissimum* en fonction de l'heure de la récolte (Vasconcelos et *al.*, 1999)

constituants	Heures de la récolte										
	8 h	09 h	10h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h
β-pinène	3,5	--	--	--	--	--	--	2,0	--	2,7	1,3
Myrcène	1,6	--	1,0	--	--	--	--	--	--	0,8	--
1,8-cineole	52,1	32,4	27,4	7,1	--	2,5	--	60,7	32,5	75,5	22,5
Linalol	1,5	--	7,9	--	--	1,4	--	--	--	1,0	--
4-terpineol	0,6	--	2,3	--	--	2,5	--	--	--	--	--
α-terpinéol	1,1	--	1,8	--	--	1,8	--	--	--	--	--
Eugénol	14,0	32,4	29	90,0	98,0	91,9	80,3	27,5	67,0	11,4	39,5
β-Élémen	0,4	--	8,3	--	--	--	--	--	--	--	--
β-caryophyllene	4,4	--	1,3	--	--	--	7,9	2,9	--	--	11,6
β-Maaliléne	4,8	--	12,2	--	--	--	11,5	2,4	--	--	13,4

II.11. Les méthodes d'analyses des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques. La chromatographie est la technique la plus fréquemment utilisée pour la séparation des constituants des huiles essentielles dont le principe est basé sur la séparation des constituants d'un mélange par entraînement d'une phase mobile liquide ou gaz, le long d'une phase stationnaire solide ou liquide fixé. La chromatographie s'appuie sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans l'échantillon analysé et obtenue par partition des solutés la phase fixe et mobile. Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à une force de rétention, affinité du soluté pour la phase fixe et à une force de mobilité, entraînement du soluté par la phase mobile (entraînement qui dépend essentiellement de la solubilité de la molécule dans la phase mobile). La résultante de ces deux forces étant variable selon la molécule, chacune elle migre à une vitesse qui lui est propre (Audigie et *al.*, 1995).

La première approche, qui est la plus couramment employée, est l'utilisation du couplage chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/MS) ou la spectrométrie Infra-Rouge par transformée de Fourier (IRTF),

II.11.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est la plus simple des méthodes chromatographiques, il s'agit d'un outil précieux pour l'analyse en phytochimie: son utilisation est très simple, elle est assez peu onéreuse et surtout elle permet très facilement de recourir à des réactifs chimiques pour la détection, la caractérisation ou l'augmentation du seuil de détection de certaines molécules. Une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) se compose d'un support en aluminium ou en verre, sur lequel est fixé une fine couche d'un matériel adsorbant (gel de silice, gel de cellulose...) comme phase stationnaire. On la place en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre; elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile nommée éluant, qui est constituée d'un ou de plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide sur la phase stationnaire, cette dernière est mise en contact avec la phase mobile. La séparation des constituants du mélange à analyser s'effectue grâce à l'ascension de la phase mobile le long de la phase stationnaire. La révélation des molécules est réalisée soit par exposition de la plaque à une lampe UV ou par pulvérisation de divers révélateurs. Chaque molécule est caractérisée par sa référence frontale ou son Rapport Frontal (RF), qui est le rapport de la distance parcourue par le soluté à la distance parcourue par le solvant (Stahl, 1975; Bounias, 1990; Audigie et *al.*, 1995).

Bruneton (1999) précise que la technique de CCM, bien que beaucoup moins performante que la chromatographie en phase gazeuse, peut être utilisée en routine pour le control de qualité des huiles essentielles.

II.11.2. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation des composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit.

Pour chacun des composés, deux indices de rétention polaire et apolaire, peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires à température constante (indice de Kovats) ou en programmation de température (indice de Rétention). Ils sont ensuite comparés avec ceux de produits de référence (mesurés au laboratoire ou décrits dans la littérature). Toutefois, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus au laboratoire

et ceux de la littérature (en particulier sur colonne polaire). C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarités différentes est nécessaire. Malgré tout, ceci ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CPG et la spectrométrie de masse (CPG/SM) ou plus rarement L'IRTF. La combinaison de ces deux techniques complémentaires, est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides.

II.11.3. Chromatographie en phases gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Cette technique (fig. 15) a été utilisée pour l'analyse de la composition des huiles essentielles. Elle permet d'obtenir à la fois les temps de rétention des constituants volatils de l'échantillon pour un programme donné et leurs spectres de masse. Les systèmes modernes sont par ailleurs généralement pilotés par un logiciel, qui peut prendre en charge la comparaison automatique des spectres obtenus avec des bibliothèques de spectres contenant des informations sur des milliers de composés. La coélution avec des témoins authentiques en CPG peut permettre de confirmer une proposition de structure. C'est une technique qui permet de connaître dans la majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation. Dans la source d'ionisation (fig. 14) les molécules sont bombardées à l'aide, d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil. Il existe plusieurs analyseurs de masse les plus utilisés pour l'analyse des huiles essentielles sont le «quadripôle» et le «piège à ion» ou ion «ion trap».

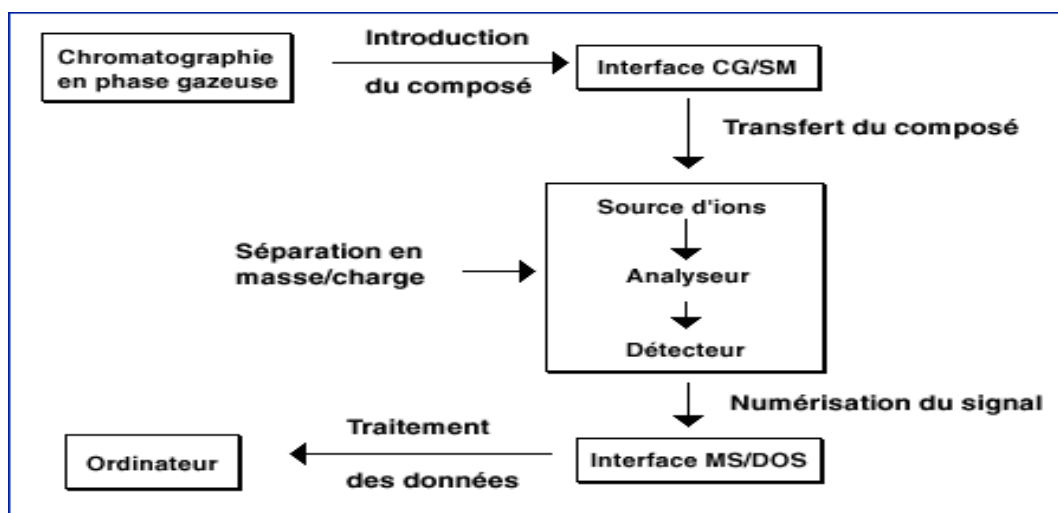


Figure 14 : Schéma du principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse

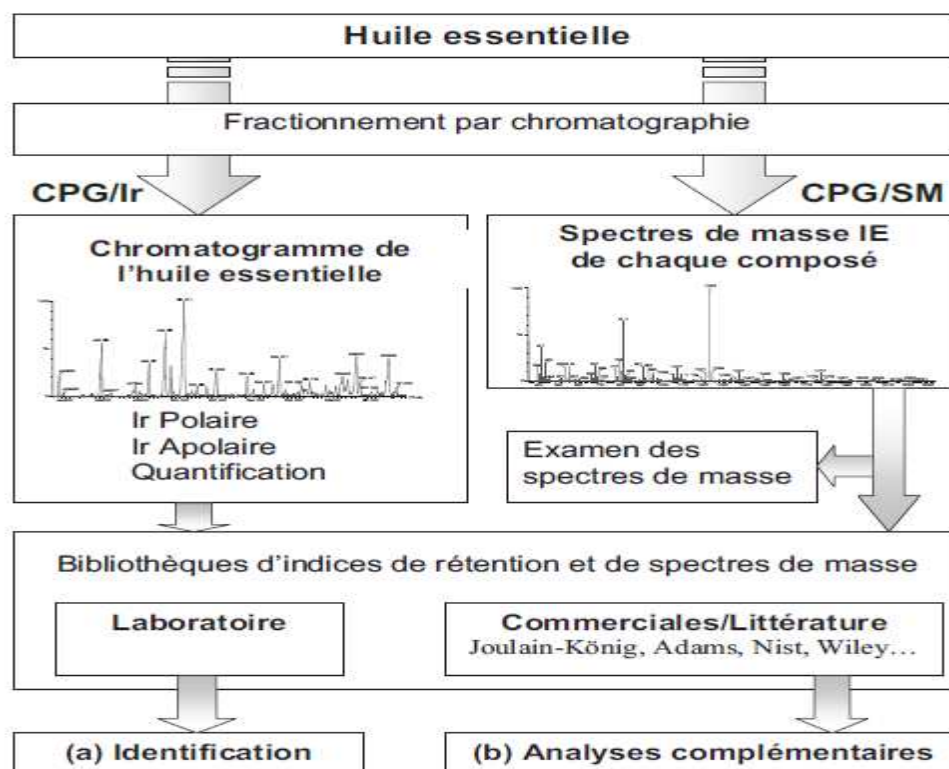


Figure 15: identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM (Paolini, 2005).

II.12. Activités biologiques des huiles essentielles

II.12.1. Propriétés antimicrobiennes

Les plantes aromatiques sont utilisées depuis des siècles dans les préparations alimentaires non seulement pour la saveur qu'elles apportent mais également pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques. Les huiles essentielles d'Origan, du Thym, de la Sauge, du Romarin et du clou de Girofle, ont toutes une particularité commune: elles sont riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés possèdent un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries: *Escherichia coli*, *Bacillus creus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium jejuni*, *Lactobacillus sake*, *Staphylococcus aureus* et *Helicobacter pylori* (Pauli, 2001; Fabian et al., 2006). D'autres familles de composés présentent aussi des propriétés antibactériennes intéressantes: certains alcools, aldéhydes et cétones monoterpéniques (géraniol, linalol, menthol, nérol, camphre, carvone, etc.), des phenylpropanes (cinnamaldéhydes) et des monoterpènes (γ -terpinène, p-cymène). La plupart de ces composés sont également de très bons agents antifongiques. Le thymol, le carvacrol et l'eugénol sont encore ici les composés les plus actifs. Beaucoup de groupes de recherches ont étudié, par exemple, l'effet de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* contre la souche *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline («methicillin-resistant

Staphylococcus aureus» ou MRSA) (Dryden et al., 2004, Chan et Loudon 1998, Carson et Riley, 1995). Cette huile dont le composé majoritaire est le terpinén-4-ol, a montré de très bon résultat *in vitro* contre la prolifération de MRSA. Toutefois, son efficacité en milieu clinique demeure contestée (Flaxman et Griffith, 2005). Un grand nombre de composés volatils ont été testés contre une large gamme de champignons: *Candida* (*C. albicans*), *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*), *Penicillium chrysogenum*, et bien d'autres (kalemba et Kunicha, 2003).

II.12.2. propriétés antioxydantes

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors de déséquilibre entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydants, est en relation avec l'apparition de maladies telles que l'Alzheimer (Butterfield et Louder, 2002) l'artériosclérose et le cancer (Garden, 1997). Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine E, α -tocophérol, BHT, etc.) (Béliveau et Gingras, 2005). Les huiles essentielles de Cannelle, Muscade, clou de Girofle, Basilic, Persil, Origan et Thym possèdent de puissants composés antioxydants (Edris, 2007). Le thymol et le carvacrol sont encore une fois les composés les plus actifs. Leur activité est en relation avec leur structure phénolique car les composés de ce type ont des propriétés xylo- réductrices jouent ainsi un rôle important en neutralisant les radicaux libres et en décomposant les peroxydes (Braga et al., 2006). L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques: le linalool, le 1,8-cinéol, le géraniol, nérol, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène, γ -terpinène et l' α -terpinoléne (Edris, 2007).

II.12.3. propriétés thérapeutiques

II.12.3.1. Propriétés anti-inflammatoires

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (Murayama et al., 2005). Plusieurs études ont, par exemple, mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (koh et al., 2002; Caldefie-chézat et al., 2004; Caldefie-Chézet et al., 2006) et de son composé principal, l' α -terpinéol (Hart et al., 2000). Les composés actifs agissent en empêchant la libération d'histamine ou en réduisant la production de médiateurs de l'inflammation. Un autre exemple, l'huile essentielle de Géranium (Maruyama et al., 2005) ainsi que le linalol et son

acétate (Peana et *al.*, 2002) ont montré une activité anti-inflammatoire sur des œdèmes de pattes de souris induit par le carraghénane. Les huiles essentielles représentent donc une nouvelle option dans le traitement des maladies inflammatoires.

II.12.3.2. Propriétés anti cancéreuses

Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention des chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (Edris, 2007). Les huiles essentielles agissent au niveau de la prévention du cancer ainsi qu'au niveau de sa suppression. Il est bien connu que certains aliments, comme l'Ail ou le Curcuma, sont de bonnes sources d'agents anticancéreux utiles pour prévenir l'apparition de cancer (Béliveau et Gingras, 2005).

Il existe d'autres composés volatils qui ont montrés une activité cytotoxique contre diverses lignées cellulaires cancéreuses (gliomes, cancer du côlon, du poumon, du foie, du sein, etc.) (Edris, 2007). Le géraniol, un alcool monoterpénique très fréquent dans les huiles essentielles, diminue la résistance des cellules cancéreuses du colon (TC118) envers le 5-fluorouracil, un agent anticancéreux. De ce fait, le géraniol potentialise l'effet inhibiteur de la croissance tumorale du 5-fluorouracil (Carnesecchi et *al.*, 2002; Carnesecchi et *al.*, 2004). L'huile essentielle de Sapin baumier et un de ses composés, l' α -humulène, ont montré une activité anticancéreuse significative sur plusieurs lignées cellulaires ainsi qu'une faible toxicité envers les cellules saines. L' α -bisabolol, un alcool sesquiterpénique présent dans un grand nombre d'huiles essentielles. Ce sesquiterpène monocyclique est un composé fréquent. Il est par exemple, le composé majoritaire de l'huile essentielle de Camomille (*Matricaria chamomilla*) à plus de 50% (Jakovlev et *al.*, 1979) et de l'huile essentielle de bourgeon de Peuplier (*Populus balsamifera*) à plus de 25% . L' α -bisabolol est un ingrédient courant des préparations cosmétiques et pharmaceutiques du fait de ses nombreuses qualités. Il est, en effet, très apprécié par ces industries car il est non toxique (LD₅₀=15,11 ml/Kg chez la souris) (Habersang et *al.*, 1979). Il dégage une odeur florale agréable (Ohloff, 1994).

L'activité anticancéreuse de l' α -bisabolol a été découverte en 2004 par une équipe de chercheurs en Italie (Cavalieri et *al.*, 2004). Ces chercheurs ont mis en évidence l'effet apoptotique de l' α -bisabolol sur des cellules tumorales au niveau du système nerveux central

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériel et Méthodes

III. 1. Matériel

III. 1.1. Matériel végétal

Deux espèces végétales à savoir *Ferula vesceritensis* et *Balansea glaberrima* ont été récoltées en plein floraison dans deux sites écologiques différents. Les fruits de *F. vesceritensis* ont été récoltés en juin 2012 dans la région de Ghardaïa. La plante est connue dans cette région sous le nom d'El kalkha ou Habet Lahlaoua. Les fruits sont utilisés en infusion, pour le traitement, des fièvres et des migraines. Tandis que les parties aériennes de *B. glaberrima* ont été récoltées en Mai 2013 dans la région d'Azazgua, à 737 m d'altitudes dans la grande Kabylie (N 36 73046, E 004450 65). Les fruits de *F. vesceritensis* et la partie aérienne de *B. glaberrima* sont débarrassés des impuretés et comme cette dernière a été fraîchement récoltée, elle a été séchée à l'ombre dans un endroit sec et à température ambiante. Un spécimen de chaque plante a été conservé au laboratoire de valorisation des ressources biologiques naturelles

III.1.2. Matériel du test de l'activité antimicrobienne

III.1.2.1. Souches microbiennes

L'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles de *F. vesceritensis* et *B. glaberrima* a été évaluée sur neuf souches bactériennes (Gram+ et Gram-), deux moisissures et une levure. Parmi les bactéries, six sont des souches de référence dont cinq proviennent de l'Américain Type Culture Collection (ATCC), ce sont: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* résistant à la meticilline (SARM) ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et une provient de la Collection l'Institut Pasteur de Paris (CIP) il s'agit de *Listeria inocula* CIP 74915. Ces bactéries sont conservées dans un soucier dans du glycérol à – 80°C. Les autres souches bactériennes ont été isolées à partir de prélèvements cliniques humains (pus, urines, hémoculture) et identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie et parasitologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Sétif (CHU) ce sont: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* multirésistant, ces trois souches sont très souvent responsable des infections nosocomiales.

L'activité antifongique des huiles essentielles de *F. vesceritensis* et *B. glaberrima* a été évaluée sur trois souches de références à savoir *Aspergillus niger* 2C A 936, *A. flavus* NRRL (Northen Regional Reseach Laboratory) 391 et *Candida albicans* ATCC 1024. Elles proviennent du Laboratoire de Microbiologie Appliquée de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, Bejaia.

III.1.2.2. Les Milieux de culture

La culture des bactéries a nécessité l'utilisation de plusieurs milieux de culture: La gélose Mueller Hinton (MH), gélose au sang, gélose nutritive (GN), Chapman (milieu sélectif pour le staphylocoque), l'hektoen (milieu sélectif pour *Pseudomonas*) et les bouillons d'enrichissement comme le bouillon nutritif (BN) et le bouillon gélose tamponné (BGT). Le milieu sabouraud-chloramphénicol a été utilisé pour la culture des moisissures et le même milieu additionné d'actidione a servi à la croissance des levures. Ces milieux de culture proviennent de l'institut Pasteur d'Alger.

III.1.2.3. Les antibiotiques

Les antibiotiques testés sont les suivants: Pénicilline (P), Amoxicilline + acide clavulanique (AMC), Ampicilline (AM), Oxacilline (OX), Cefazoline (CZ), Ceftazidime (CAZ), Tobramycine (TM), Gentamycine (GM), Kanamycine (K), Erythromycine (E), Linkomycine (L), Doxycycline (DO), Furane (FT), Ofloxacine (OFX) (voir annexes). Il est à signaler que ces antibiotiques proviennent de deux fabricant Bio-Rad et Oxoid.

III.1.2.4. Les antifongiques

Les disques d'antifongiques utilisés pour l'antifongigramme sont: Amphotéricine B (AB), Clotrimazole (CTR) et la Nystatine (NY) (voir annexes). L'Amphotéricine B (AB) provient du fabricant Bristol-Myers-Squibb, et le Clotrimazol 1% provient du fabricant ARAC-Syrie. Enfin, la Nystatine provient du fabricant Bio-Rad.

III.1.3. Matériel du test de l'activité antioxydante (test DPPH)

Le test *in vitro* de l'activité antioxydante de nos huiles essentielles a nécessité comme matériel, un spectrophotomètre UV-visible, qui permet en mesurant, à une longueur d'onde précise (la longueur d'onde d'absorption maximale de la molécule ou du complexe qu'elle forme avec un réactif, λ_{\max}), l'intensité de cette absorption (densité optique, DO) par rapport à un témoin de concentration connue, de déterminer la quantité de la molécule présente dans un échantillon, un radical libre qui est le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), un antioxydant standard qui est le butyl-hydroxy toluène (BHT) et un solvant comme le méthanol. Le BHT et le DPPH ont pour provenance Sigma Aldrich USA,

III .2. Méthodes

III.2.1. Détermination du taux d'humidité

La teneur en eau de la partie aérienne de *F. vesceritensis* et celle de *B. glaberrima* a été déterminée par le procédé de séchage à l'étuve à 105 °C (Twidwel et *al.*, 2002, Simpson, 1999). Le taux d'humidité (%) est calculé par la formule suivante: $H\%=(M1-M2) \times 100/P$

Ou H% : taux d'humidité en %

M1: Masse de la matière végétale avant séchage en gramme.

M2 : Masse de la matière végétale après séchage en gramme.

P: Masse de la prise d'essai en gramme.

III.2.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Le matériel végétal est soumis à une hydrodistillation, selon la technique décrite par la pharmacopée européenne, en se servant d'un dispositif d'extraction type Clevenger (fig. 16). Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. Elle consiste à mettre un poids du végétal dans un ballon en verre avec une quantité suffisante d'eau distillée, sans pouvoir autant remplir tout à fait le récipient afin d'éviter le passage du liquide dans le tube vertical lors du chauffage. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile qui se dégagent passent à travers le tube vertical puis dans le serpentín de refroidissement où aura lieu la condensation. La densité des huiles essentielles étant plus faible que celle de l'eau, elles surnagent à la surface de cette dernière. L'huile essentielle ainsi obtenue est récupérée puis traitée par un déshydratant, le sulfate de sodium, pour éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans l'huile. L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition. Les huiles essentielles obtenues doivent être conservées de manière adéquate à l'abri de l'oxydation et de la polymérisation provoquée par la lumière et par la variation de température.

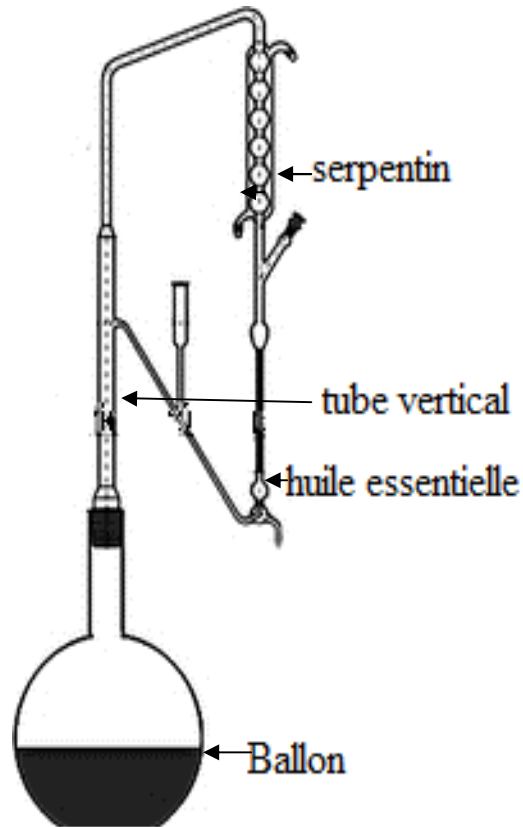


Figure 16 : Dispositif d'extraction type Clevenger



Figure 17: Appareil de distillation type Clevenger avec un Cryostat-réfrigérant

III.2.3. Calcul du rendement

Le rendement en huiles essentielles est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante sèche à traiter (Caree, 1953). Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante: $R (\%) = PB/PA \times 100$, Où :

R(%): Rendement de l'huile en pourcentage ; PB: poids de l'huile en gramme ; PA: poids de la plante en gramme.

III.2.4. Mesure de la densité

La densité relative de l'huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile et la masse d'un égal volume de l'eau distillée à 20°C (AFNOR, 1992).

III.2.5. Analyse des huiles essentielles

La séparation et l'identification des constituants des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse (CPG), couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS). L'analyse par (CPG) a été réalisée à l'aide d'un gaz chromatographe (Agilent, modèle 7890A, palot Alto, CA), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) couplé à un détecteur de masse quadripolaire Agilent modèle 5973) qui fonctionne en mode impact d'électron (EI) à 70 eV. Le gaz chromatographe est équipé de deux colonnes capillaires de silice fusionnée de 30 mètres de longueur par 2,25 mm de diamètre et d'une épaisseur de 0,25 µm. Les paramètres d'analyses sont les suivant : le gaz est l'hélium. Un taux d'augmentation de 03°C par minute est maintenu à 25°C pendant 20 minutes dans des conditions isothermales ; la température de l'injecteur (mode split, ratio 1/10) est de 300°C. L'injection est de 1 µl d'huile essentielle diluée dans le chloroforme (1/100 v/v). L'analyse GC-MS a été réalisée dans un gaz chromatographe (Agilent, model 6890N, palot-alto) équipé d'un injecteur Split-Splitless, un autosampler Agilent model 7683 fusionné de deux colonnes capillaires de Silice (30m fois 0,25mm id et d'épaisseur 0,25 µm) de différentes polarités (HP-5,5% phenyl-methylpolysiloxane, DB-Waxetr, polyethylene-glycol.7683 Les constituants de l'huile essentielle sont identifiés par comparaison par leurs spectres de masse et leurs indices de rétention avec ceux de la base de données (NISTOS NIST). Les résultats sont confirmés par l'indice Kovats dans des phases semi polaire rapportées dans la littérature (Adams, 2007). L'indice de rétention des constituants est déterminé par rapport au temps de rétention d'une série de n-alcanes avec interpolation linéaire. Le pourcentage des constituants est calculé en se basant sur les surfaces des pics des GC sans FID réponse Factor

III.2.6. Test *in vitro* de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *F. vesceritensis* et *B. glaberrima* a été déterminée selon la technique par contact direct (méthode de diffusion ou méthode de disque).

III.2.6.1. Technique par contact direct

C'est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Elle permet de prévoir l'efficacité antimicrobienne *in vitro* de l'huile essentielle, il s'agit en fait d'une appréciation de l'aspect qualitatif de l'activité. Elle est aussi appelée méthode de disques. Elle a été initialement conçue pour les antibiotiques de synthèse (antibiogramme). La technique de l'antibiogramme selon les recommandations de NCCLS (National Comitee For Clinical Laboratory Standars) est utilisée à l'échelle internationale dans les laboratoires de bactériologie pour la mesure du pouvoir antimicrobien.

Selon Belaiche. (1979), L'aromatogramme inspiré de la méthode de Shroeder et Messing (1949) consiste à substituer les disques d'antibiotiques par des disques en papier filtre imprégnés d'huile essentielle et les déposer sur la surface des gélosesensemencées par le germe à tester. Après incubation, les diamètres d'inhibitions sont mesurés en millimètres. Ces derniers correspondent aux zones où les germes avaient été inhibés ou détruits par la diffusion de l'huile essentielle.

Les huiles essentielles sont considérées comme actives si elles produisent des diamètres d'inhibition supérieurs ou égaux à 15 mm (Rossi et *al.* 2007). Mais selon Duraffourd et *al.* (1990), la sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm, la sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, elle est moyenne pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible.

III.2.6.1.1. Les étapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne

La réalisation du test de l'activité antibactérienne se fait selon les étapes suivantes :

1. Reisolement : Les différentes souches bactériennes doivent être repiquées par la méthode de stries, puis incubées à 37°C pendant 18h à 24h afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.
2. Préparation de la suspension bactérienne : L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure et jeune de 18 heures dans de l'eau physiologique stérile, l'opacité de la suspension bactérienne doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland (10^8 Colony Forming Units CFU / ml) ou à une densité optique de 0.08 – 0.1 à la longueur d'onde 625 nm. La densité optique (DO) peut être ajustée en ajoutant plus de culture ou de l'eau physiologique. Il faut noter que pas

être utilisé au-delà de 15 minutes à partir de sa préparation car la concentration et donc l'opacité risque d'augmenter à cause de la croissance bactérienne.

3. L'ensemencement : Il consiste à tremper un écouvillon stérile dans le tube contenant la suspension bactérienne préparée, puis le frotter, après l'avoir essoré à l'intérieur du tube, sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas de façon à former des stries serrées, pour une bonne distribution de l'inoculum sur la surface gélosée, l'opération doit être répétée à trois reprises en tournant la boîte de Pétri chaque fois d'un angle de 60°. Étant donné le nombre requis de boîtes de Pétri (une boîte pour chaque dilution, également 01 boîte pour le témoin négatif et deux à trois boîtes pour l'antibiogramme le même écouvillon doit être rechargé pour chaque boîte.
4. L'application des disques : Des disques en papier filtre stérile sont imbibés de 10 µl d'huile essentielle diluée dans l'éthanol aux dilutions 1/2, 1/5 et 1/10 (v/v), après 4 à 5 minutes les disques sont déposés à la surface des géloses ensemencées. Les disques imprégnés de 10 µl d'éthanol servent de témoin négatif. Chaque 3 disques de concentrations similaires ont été déposés dans la même boîte, afin de garantir les conditions expérimentales comparables. Des antibiogrammes ont été effectués en parallèle avec les aromatochromogrammes. Le choix des antibiotiques est basé sur les directives du (NCCLS).
5. Incubation : Les bactéries exigent un délai d'incubation de 24h pour la croissance des bactéries jusqu'au stade de colonies décelables à l'œil nu.
6. Mesure du halo d'inhibition en mm : Après incubation à 37°C, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés. Ces derniers renseignent sur l'activité antibactérienne de l'huile testée. Afin de déterminer si l'huile a un effet bactéricide (bactéries tuées) ou bactériostatique (bactéries survivent mais ne se multiplient pas), un prélèvement de la zone d'inhibition est transféré dans un bouillon nutritif, qui doit être incubé à 37°C pendant 24 heures, après le temps d'incubation si le milieu est trouble ceci indique un pouvoir bactériostatique, tandis qu'un milieu clair indique un pouvoir bactéricide.

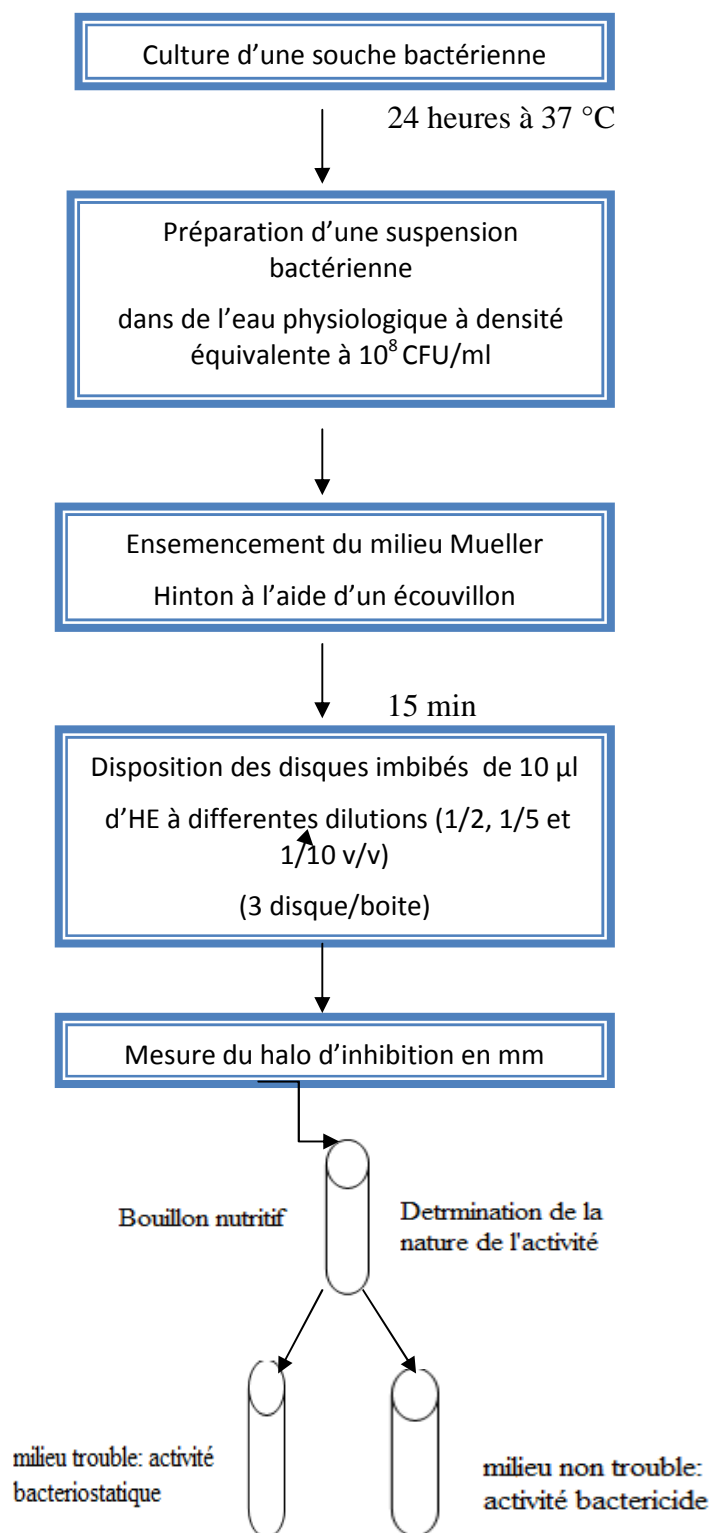


Figure 18 : Etapes de réalisation de l'activité antibactérienne

III.2.7. Test *in vitro* de l'activité antifongique

III.2.7.1. Préparation de la suspension de spores

Les champignons sont ensemencés sur milieu saboureaud + chloramphénicol puis incubés à 25C° pendant 7 à 10 jours, jusqu'à ce que la sporulation soit complète. A partir de ces colonies, des spores sont prélevées stérilement puis mises en suspension dans du tween 80 à une concentration de 0.1% dans de l'eau distillée stérile. Une cellule de malassez permet de compter les spores en suspension à 10⁶ UFC / ml (Akgul, 1989; Dean et Svoboda, 1990).

III.2.7.2. Test de diffusion de disque

L'inoculation du milieu gélosé de Sabouraud chloramphénicol ou Sabouraud chloramphénicol actidione est réalisée en surface à l'aide d'une suspension de spores ajustée à 10⁶ spores/ml, puis les moisissures sont incubées à 25C° pendant 72 heures alors que les levures sont incubées à 25C° pendant 48 heures.

III.2.8. Test *in vitro* de l'activité antioxydante (test DPPH)

III.2.8.1. Effet scavenger du radical DPPH

Le composé chimique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) fut l'un des premiers radicaux utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques (Blois, 1958; Brands et *al.*, 1995). La molécule de DPPH est caractérisée comme un radical relativement stable grâce à la délocalisation de l'électron célibataire de la molécule, cette délocalisation donne naissance à une couleur violette qui se caractérise par une bande d'absorption dans une solution de méthanol aux environs de 520 nm, quand une solution DPPH est mélangée à celle d'une substance qui peut fournir un atome d'hydrogène, ceci donne naissance à la forme réduite (diphénylpicryl hydrazine), avec perte de la couleur violette (Kilani et *al.*, 2005) (Vori fig19).

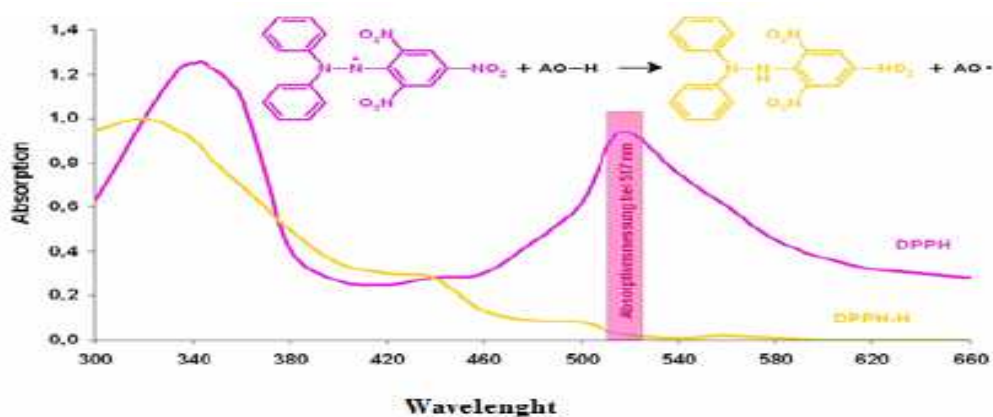


Figure 19: Schéma de transformation du DPPH de sa forme active à celle inactive

L'intensité de la décoloration du DPPH est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez–Moreno, 2002). Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence comme, l'acide ascorbique (vitamine C), le Butyle – Hydroxy-Toluène (BHT) etc. L'activité d'un antioxydant peut être caractérisée par une grandeur appelée la CI_{50} (concentration inhibitrice à 50%). La CI_{50} est la quantité de substance (extrait ou standard (μg)) présent dans 1ml de milieu réactionnel pouvant réduire l'absorbance (perte de la couleur violette) du DPPH à moitié.

Il est à noter que plus la CI_{50} est petite plus l'antioxydant a une activité plus importante, toute fois il est important de noter que l'utilisation de différents protocoles de mesure et différents indices d'évaluation de l'activité antioxydante réduit la fiabilité d'une comparaison des valeurs.

III.2.8.2. Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml de méthanol (0,004%). Selon le Protocole décrit par Que et *al.* (2006). 600 μl de solution méthanolique de DPPH est mélangée à 600 μl de solution méthanolique de l'huile essentielle à différentes concentrations, le mélange vortexé est laissé à l'obscurité pendant 30 minutes et la décoloration par rapport au contrôle négatif (composé de 600 μl de la solution methanolique de DPPH et 600 μl de méthanol) est mesurée à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, BHT, dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que celles de l'échantillon testé. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante (Wang et *al.*, 2002).

$\text{Inhibition\%} = \frac{\text{Abs du control} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs du controle}} \times 100$

III.2.9. Analyses statistiques

Les résultats du test de l'activité antioxydante effectué *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm standard de déviation (SD). Les valeurs d' IC_{50} (concentration inhibitrice à 50 %) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe (% inhibition = f (concentrations)). Les calculs sont faits à l'aide de logiciel Excel Version 2007 et les courbes sigmoïdes sont réalisées par le logiciel Graph-pad. Tandis que les résultats de l'activité antibactérienne effectuée *in vitro* ont été traités par l'analyse de la variance (ANOVA) réalisé avec le logiciel CoStat.

Chapitre VI

Résultats et discussion

VI.1. Le taux d'humidité

Les végétaux sont riches en eau. Les analyses de nos échantillons ont révélé un taux d'humidité important compris entre 50,84% et 71,52%. Cela signifie approximativement que la moitié ou plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée par l'eau. Nous constatons, suivant la figure 20 que *B. glaberrima* est très riche en eau avec un taux de 71,52%, presque les 2/3 de la plante sont formés par de l'eau par contre *F. vesceritensis* comprend en poids approximativement des proportions équivalentes de matière fraîche et d'eau. La réduction de teneur en eau chez *F. vesceritensis* peut être expliquée par évaporation de l'eau par transpiration qui est fonction de sa structure et épaisseur de l'épiderme aussi les conditions climatiques sous lesquelles elle est soumise.

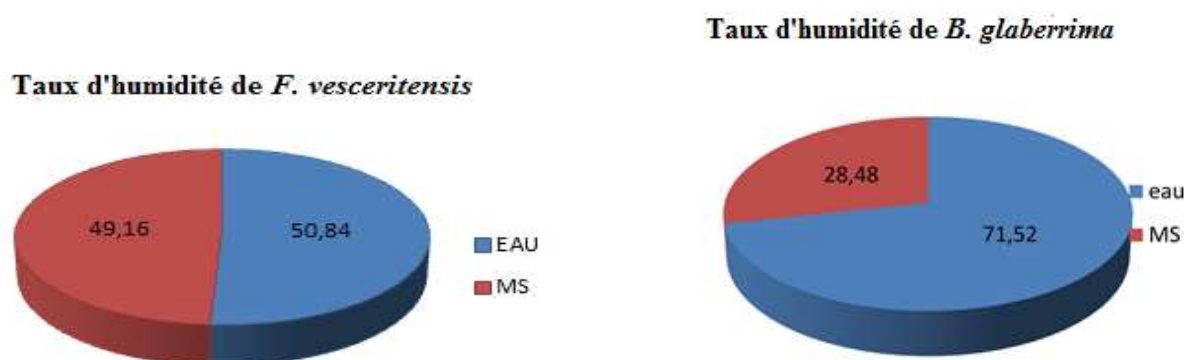


Figure 20: Taux d'humidité de *F. vesceritensis* et de *B. glaberrima* en pourcentage.

VI.2. Extraction de l'huile essentielle

VI.2.1. Rendement en huiles essentielles

Le rendement des fruits de *F. vesceritensis* en huile essentielle est de l'ordre de 0,138%. Tandis que, celui de la partie aérienne de *B. glaberrima* est de 0,260%. Le rendement de *F. vesceritensis* est considéré faible comparativement à celui obtenu par hydrodistillation à partir des feuilles de la même espèce collectée dans la même région (Ghardaïa) qui est de 1,82% (Zellagui et al., 2012), ainsi s'il est comparé à ceux d'autres espèces du même genre *Ferula* tel que celui de *F. ferulaoides* collectée à la Mongolie variant de 2.4 à 3.2 % (Shatar, 2005) et *F. gummosa* originaire d'Iran qui varie de 1,66 à 3,85 % (Talebi et al., 2008). Il faut noter qu'aucune étude préalable n'a été réalisée sur *B. glaberrima*, ses résultats vont être comparés à ceux de *F. vesceritensis* et à ceux d'autres Apiacées. Il est à signaler que l'ensemble de ces huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation. Par contre, les différences enregistrées dans les rendements sont dues à plusieurs

facteurs: l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment climatiques (température et humidités), l'espèce végétale, l'organe végétal, le stade de la croissance, la période de cueillette, la conservation du matériel végétal et la méthode d'extraction. (Granger et *al.*, 1973; Rosua et Granados, 1987; Fournier et *al.*, 1989; Hoekel et Omar, 1993; Khajeh et *al.*, 2004 ; Khajeh et *al.*, 2005 ; Viljoen et *al.*, 2006; Sefidkon et *al.*, 2007). Les Citrus par exemple ont une teneur plus importante en huile essentielle lorsque la température est élevée (Bruneton, 1999). Les fleurs de *Chrysanthemum coronarium* sont plus riches en HE sous l'effet de fertilisants (Alvaez-Castellanos et Pascal-villabos, 2003). Il est démontré que l'insuffisance ou l'excès d'eau a un effet négatif sur le rendement en huiles essentielles. Le pourcentage de l'huile volatile est passé de 1.4 % (pendant la période des jours longs) à 0.7% (pendant la période des jours courts) (El-Zakhem, 2003). La teneur en huiles essentielles dépend aussi du moment de la récolte, les sommités fleuries et les feuilles doivent être récoltées avant la floraison, car selon Salle et pelletier (1991), après la floraison, 70% des huiles essentielles s'évaporent dans l'air ; par contre, la plante entière est généralement récoltée pendant la floraison (Fluck, 1942).

Le Rendement et la composition des huiles essentielles varient selon les différents organes végétaux. Une étude effectuée sur *Rosmarinus officinales* L par Fathy et *al.* (1965) a révélé selon la partie analysée les pourcentages d'huiles essentielles suivants: 0.092% dans les rameaux, 0.05% dans les feuilles et 0.061% dans la plante entière. Les feuilles et les rameaux représentent respectivement 70% et 30% de la plante. Selon Guenther (1972) les différentes parties de la plante fournissent des huiles essentielles dont la quantité et la qualité diffèrent. Jacob in Fathy et *al.*, (1965) ont étudié l'effet de diverses conditions de séchage sur la teneur en huiles essentielles du *Rosmarinus officinales* L, et d'autres plantes aromatiques, il a conclu que le séchage direct au soleil provoque une perte des huiles essentielles supérieur à 20% alors que pour un séchage à l'ombre, cette perte ne varie que de 2 à 10%.

VI.2.2. La densité

Les valeurs de la densité de l'huile essentielle de *F. vesceritensis* et celle de *B. glaberrima* sont respectivement: $0,779 \pm 0,007$ et $0,883 \pm 0,037$ (fig. 21). La densité de l'huile essentielle de *F. vesceritensis* est un peu faible comparativement à celle de *B. glaberrima*. La densité nous renseigne selon Garner (1996) sur la composition chimique: ainsi une densité inférieure à 0,9 indique la présence, dans cette huile, de composés terpéniques et aliphatiques à des taux élevés, alors qu'une densité supérieure à 1, signifie une composition très riches en composés terpéniques polycycliques.

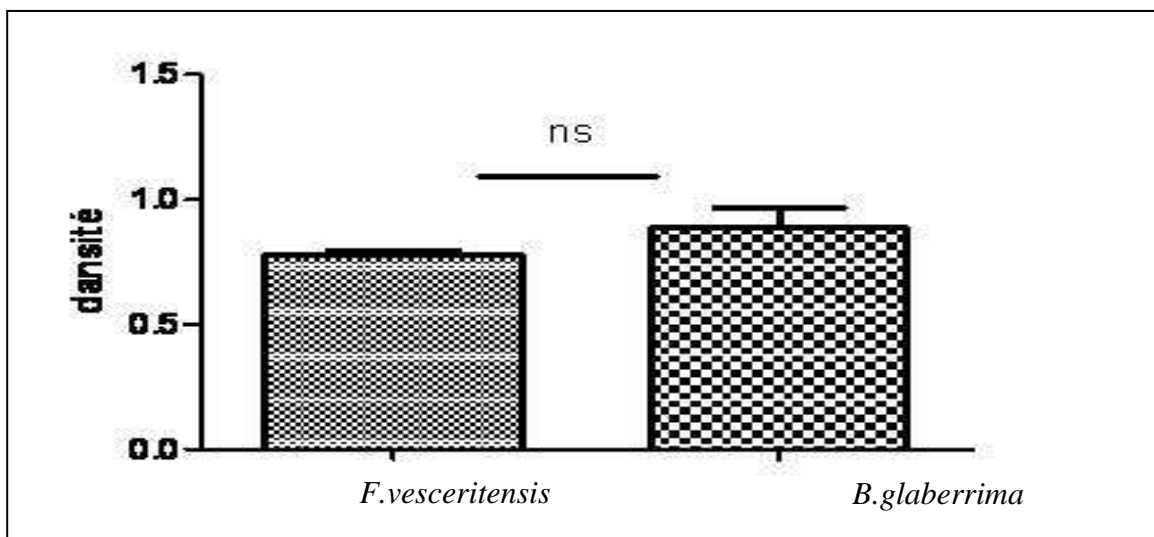


Figure 21 : Densité de l'huile essentielle de *F. vesceritensis* et *B. glaberrima*

VI.3. Composition chimique de l'huile essentielle

L'examen des résultats des analyses (tableau 03) fait apparaître que l'huile essentielle de *F. vesceritensis* est constituée de 53 composés dont 40 sont identifiés ce qui correspond à 96,00% de la totalité de l'huile (fig. 22 et 23). Cette huile est caractérisée par une fraction importante des monoterpènes et sesquiterpènes avec prédominance des sesquiterpènes, leurs pourcentages sont respectivement 43,45 et 49,68%. Le composé majoritaire des monoterpènes est l' α -pinène (28,57%). Par contre, le représentant majoritaire des sesquiterpènes est l'aristolène avec un pourcentage de 24,63%. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux qui ont montré que le genre *Ferula* est réputé par sa richesse en sesquiterpènes. Des travaux effectués par Zellagui et *al.* (2012) sur l'huile essentielle des feuilles de *F. vesceritensis* ont révélé la présence de 23 composés dont 4 sont majoritaires: 5,9-tetradecadiyne (24,72%), germacrene D (24,51%), farnesene (8,57%), α -bisabolene (8,57%), le reste des composés est minoritaire. L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de plusieurs espèces du même genre originaires d'autres provenances a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Shatar (2005) a montré que l'huile essentielle des racines de *F. ferulaoides* de la Mongolie est dominée par guaiol (58,76%) et (E)-nerolidol (10,16%). De même Ghasemiy et *al.* (2005) ont étudié l'huile essentielle des fruits de *F. gummosa* d'Iran dont l'analyse chimique a révélé la présence de deux monoterpènes hydrocarbonés avec des taux élevés, il s'agit de: β -pinène (43,78%) et α -pinène (27,27%). Il faut noter qu'avec les mêmes proportions, ces deux derniers composés ont été retrouvés dans l'huile essentielle de *F. gummosa* collectée à Isfahan (Talebi et *al.*, 2008). Toutefois, l'huile essentielle de *F. latisecta* collectée en Iran est caractérisée par 3 composés majoritaires (Z)-ocimène (32,4%), E-ocimène (20,3%), et cis-pinocarvone (11,4%) (Zohreh et *al.*, 2006). Les résultats obtenus

pour les différents travaux montrent que l' α -pinène est non seulement le composé majoritaire de *F. vesceritensis* mais aussi de *F. gummosa* d'Iran et d'Isfahan.

Tableau 03: Composition chimique de l'huile essentielle des fruits de *F. vesceritensis*.

PIC	RI Kovats	TR (min)	Composés	Air %
1	930	5,064	α -thujene	0,64
2	938	5,256	α-pinene	28,57
3	952	5,606	Camphene	0,47
4	957	5,733	Thuja 2,4 (10)-diene	0,10
5	976	6,236	sabinene	0,43
6	980	6,336	β-pinene	5,98
7	992	6,690	Myrcene	1,26
8	1027	7,735	O-cymene	0,46
9	1031	7,871	Limonene	3,33
10	1040	8,159	Z- β -Ocimene	0,48
11	1128	11,359	α -Campholenol	0,16
12	1141	11,836	Trans-pinocarveol	0,16
13	1196	14,161	Myrtenal	0,18
14	1221	15,145	Fenchyl acetate	1,00
15	1286	17,899	Bornyl acetate	0,20
16	1351	20,535	α -Cubebene	0,20
17	1376	21,615	α -Copaene	0,64
18	1380	21,781	Daucene	0,32
19	1384	21,982	β -Bourborene	0,29
20	1418	23,377	Arristoléne	24,63
21	1427	23,722	NI	1,87
22	1431	23,884	β-Gurjurene	4,86
23	1435	24,037	NI	0,26
24	1441	24,273	NI	0,43
25	1460	25,125	NI	0,21
26	1476	25,702	γ -Murolene	1,02
27	1480	25,851	Amorpha-4,7 (11) diene	0,16
28	1485	26,056	B -Selinene	0,97
29	1490	26,284	Rans- Murola-4(14) ,5-diene	0,15
30	1493	26,415	α -Selinene	0,84
31	1496	26,542	Isodaucane	0,19
32	1499	26,655	α Murolene	1,12
33	1510	27,075	NI	0,23
34	1513	27,180	γ -Cardinene	2,41
35	1523	27,569	Δ -Cardinene	5,20
36	1537	28,085	α -Cardinene	0,47
37	1540	28,198	NI	0,18
38	1542	28,281	α -Calacorene	0,51
39	1549	28,539	NI	0,23
40	1574	29,527	Germacrène D-4-ol	0,19
41	1576	29,580	Spathulenol	0,29

42	1580	29,759	NI	0,29
43	1603	30,686	NI	0,26
44	1621	31,320	NI	0,43
45	1627	31,530	NI	1,06
46	1640	31,984	Epi- α -Cardinol	2,18
47	1645	32,172	α -Murolol	0,44
48	1648	32,286	β -Eudesmol	0,30
49	1653	32,483	α -Cardinol	1,29
50	1687	33,755	Shyobunol	0,72
51	1556	36,172	Aristolone	0,80
52	1767	36,552	NI	0,4
Monoterpènes		Hydrocarbonés : 41,74%		
		Oxygénés : 1,71%		
Sesquiterpènes		Hydrocarbonés 43,48%		
		Oxygénés : 6,20%		
Composés hydrocarbonés		85,2%		
Composés oxygénés		7,9%		
composés identifiés		96,0%		

Légende :

KI : Indice de Kovats

RT : Temps de rétention

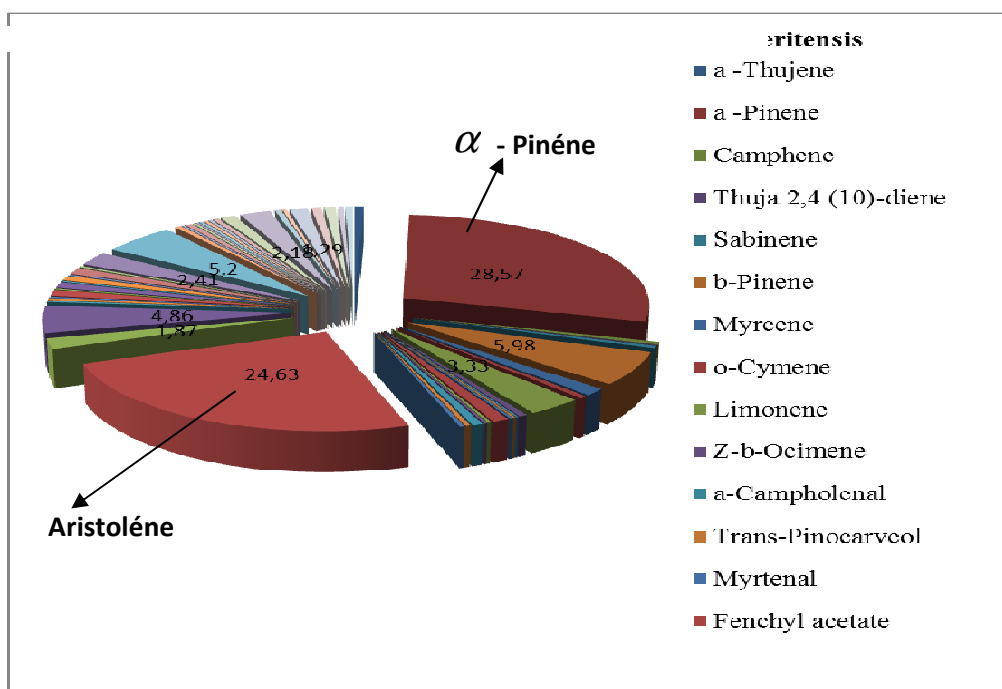


Figure 22 : Pourcentage des composés chimiques de l'HE de *F. vesceritensis*

Abundance

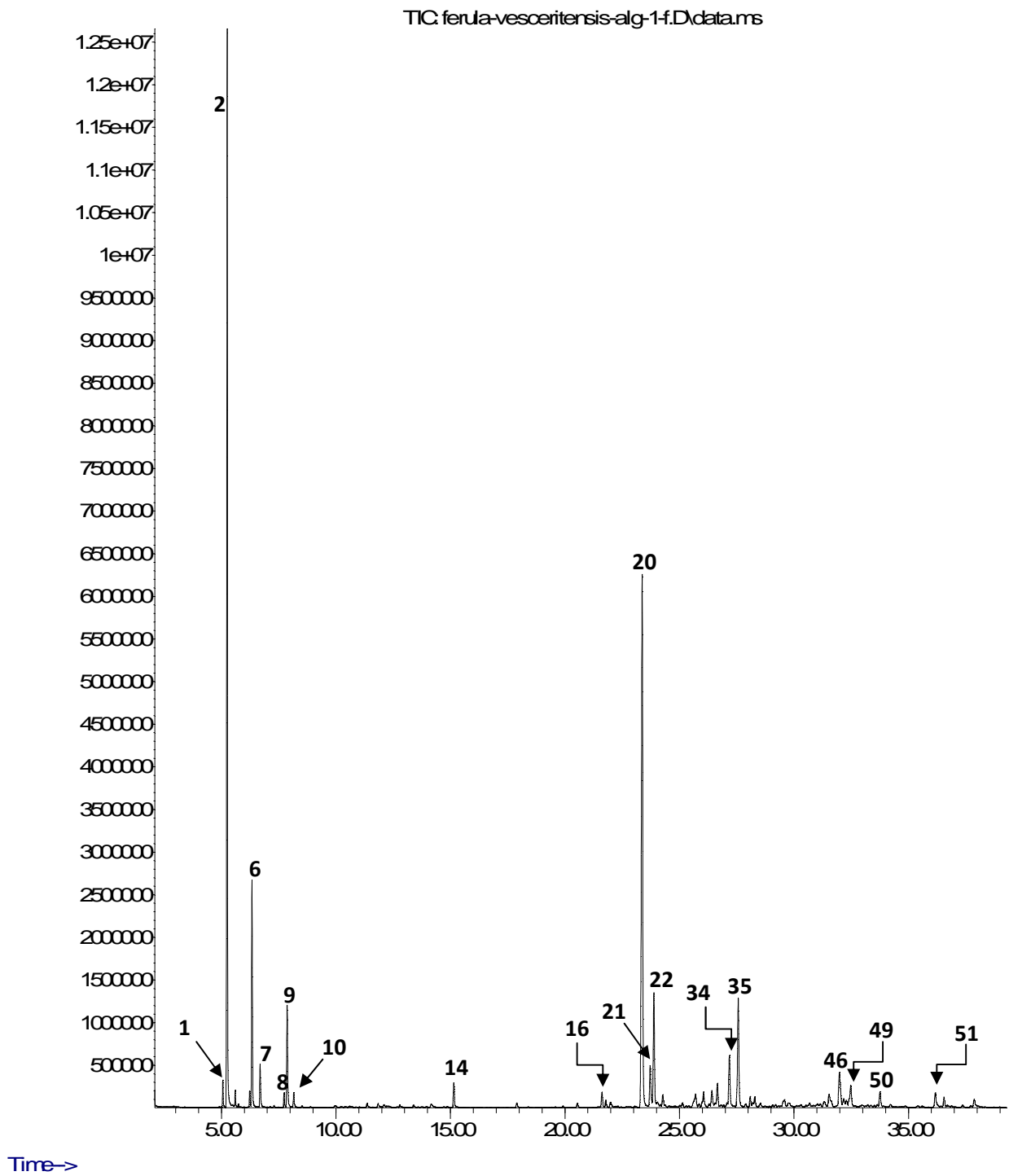


Figure 23 : Chromatogramme de l'HE de *F. vesceritensis*

L'analyse de l'huile essentielle de *B. glaberrima* (tableau 04) a révélé la présence de 21 composés dont 3 sont majoritaires : valencene (36,65%), l'apiole (34,87%) et γ -murolène (9,83%). Il faut noter cependant que l'apiole est complètement absent dans l'huile essentielle de *F. vesceritensis*, par contre Javidnia et al. (2005) ont signalé la présence de 57,3% de dill apiole dans l'huile essentielle de *F. persica*.

Tableau 04 : Composition chimique de *Balansea glaberrima*

PIC	RI _{covats}	TR _(min)	Composés	Air %
1	1369	21,423	alpha-ylangene	1,320
2	1417	23,368	beta-caryophyllene	0,395
3	1451	24,736	alpha-humulène	0,463
4	1479	25,86	γ-murolène	9,832
5	1481	25,947	valencene	36,658
6	1508	27,031	sabinene 9	0,258
7	1520	27,503	myristicin	2,052
8	1531	27,897	acétate de linalyle	0,185
9	1574	29,571	ledene	0,538
10	1590	30,192	NI	0,36
11	1605	30,743	caryophyllene oxide	0,427
12	1629	31,639	thujopsene	0,285
13	1639	31,997	alpha-longipinen-7beta-ol	0,679
14	1644	32,172	E-neroliol	0,745
15	1650	32,4	quaiacol	9,423
16	1679	33,49	apiole	34,879
17	1690	33,882	NI	0,058
18	1703	34,341	(+) -mayurone	0,301
19	1732	35,355	alpha-Bulnesene	0,847
20	1758	36,264	NI	0,192
21	1780	37,038	NI	0,093
Total identifié				99.288

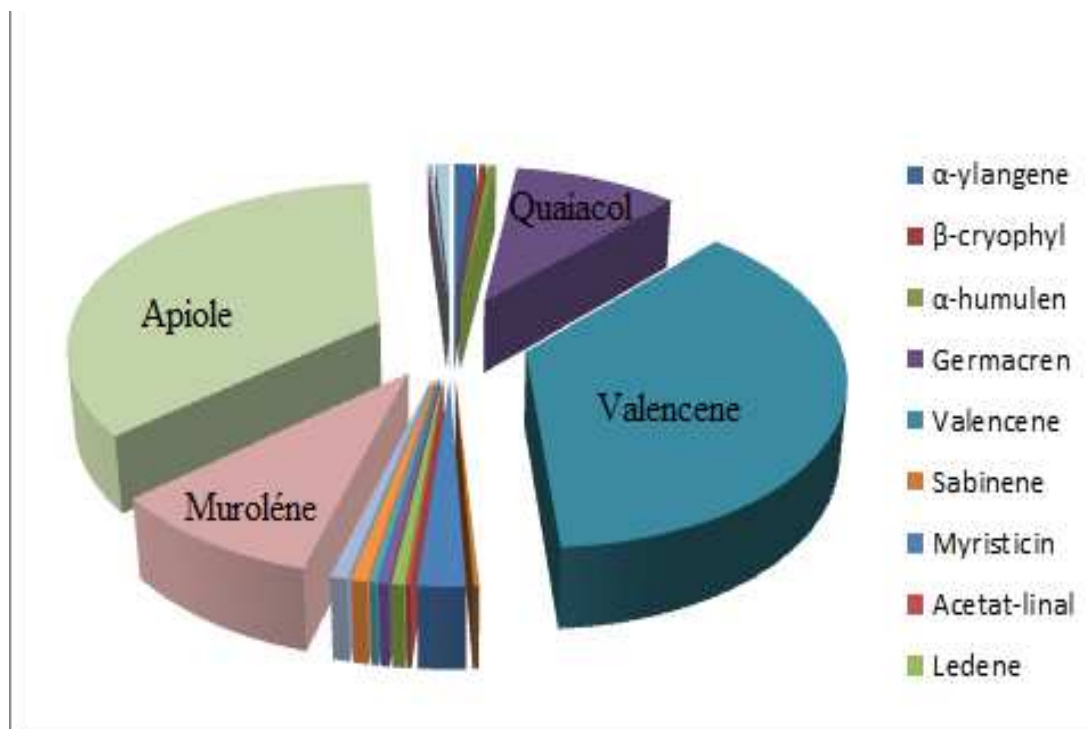


Figure 24 : Pourcentage des composés chimiques de l'HE de *Balansea glaberrima*

VI.4. Pouvoir antimicrobien

L'activité antibactérienne de nos huiles essentielles a été estimée par le diamètre de la zone d'inhibition en millimètre. D'après les résultats présentés dans le tableau 05, l'huile essentielle des fruits de *F. vesceritensis* n'a pas montré une activité vis-à-vis les bactéries à Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *L. inocula* CIP 74915), le diamètre de la zone d'inhibition est égale à 6 mm pour les trois dilutions (1/2, 1/5, 1/10 v/v). Par contre, les antibiotiques se sont révélés très actifs avec des diamètres d'inhibition variant de 20 à 30 mm (tableau 08). *S. aureus* résistant à la methicilline (SARM) ATCC 43300 s'est montrée faiblement sensible à l'huile ainsi les diamètres des zones d'inhibition sont respectivement 10, 8, et 7 mm aux trois dilutions (1/2, 1/5, 1/10 v/v) mais résistante à la plupart des antibiotiques testés sauf à l'ofloxacine, la gentamycine et la vancomycine dont les diamètres des zones d'inhibition sont respectivement 20, 27, 28 mm (Tableau 07). Les bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 se sont montrées sensibles à l'huile, les diamètres des zones d'inhibitions sont respectivement 22-19 mm à la dilution 1/2 v/v.

File : C:\DOCUMENTS AND SETTINGS\HOCINE LAOUER\MES DOCUMENTS\BALANCEA\BALANCEA-F-ALG
 Operator : Danilo
 Acquired : 19 Jun 2013 19:33 using AcqMethod MARONGIU-FRONT-ESAN
 Instrument : Instrumen
 Sample Name: balancea-f-alg-hd-5-f
 Misc Info : balancea-f-alg-hd-5-f
 Vial Number: 1

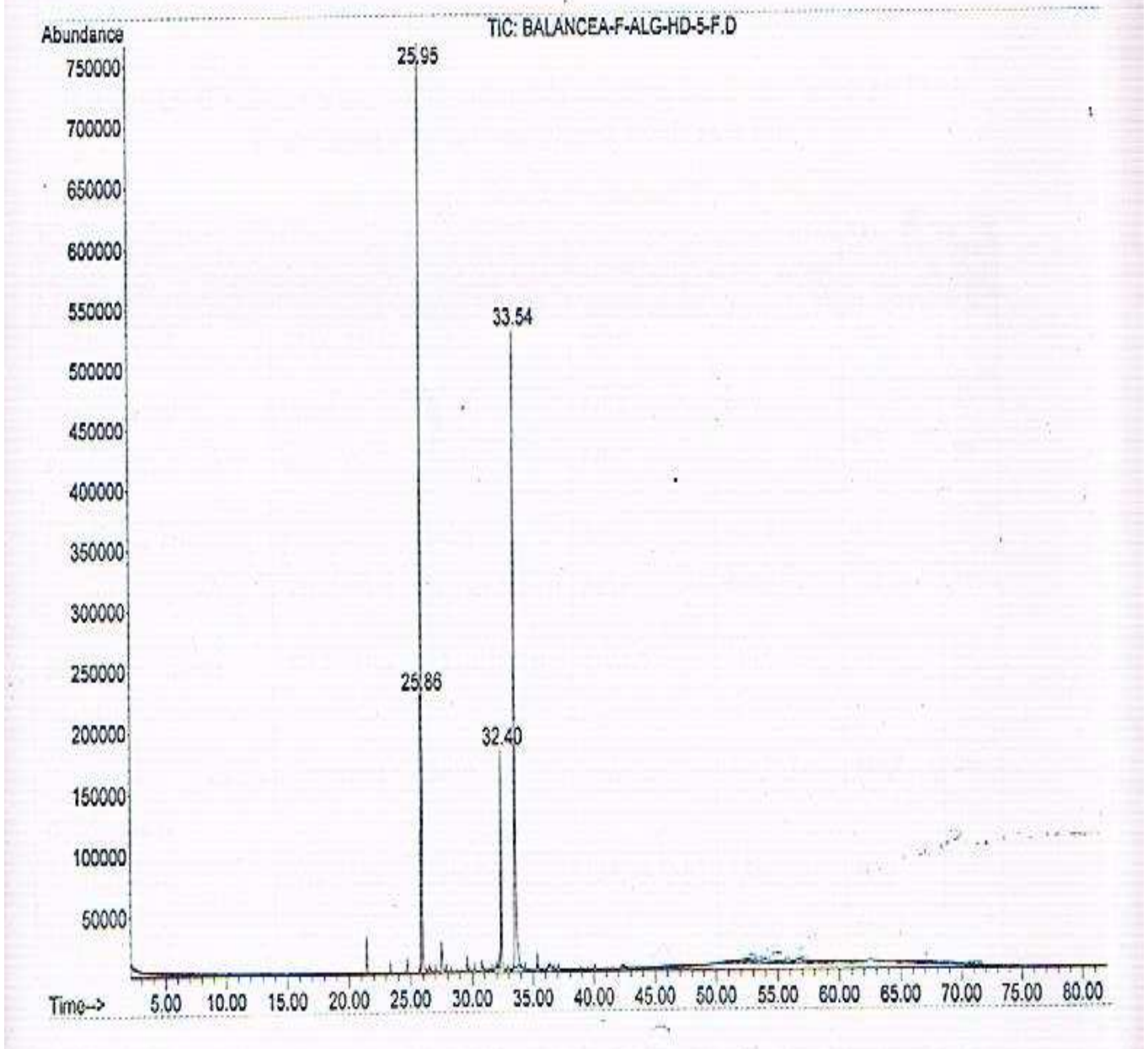


Figure 25 : Chromatogramme de l'HE de *Balansea glaberrima*

La sensibilité de *S. aureus* ATCC 25923 a été aussi constatée par Zellagui et *al.*, (2012) qui ont étudié l'effet de l'huile essentielle des feuilles de la même espèce collectée dans la même région (Ghardaïa) sur plusieurs souches bactériennes. Le grand diamètre de la zone d'inhibition a été observé chez *S. aureus* ATCC 25923 qui est de 27 mm à la concentration de 8 mg/ml. Ces résultats sont non seulement en accord avec ceux obtenus par Ghasemiy et *al.* (2005) sur *Ferula gumosa* et *Ferula latisecta* collectées en Iran mais aussi avec ceux obtenus par Bouchouka et *al* (2012) où l'extrait à l'hexane des fruits de *F. vesceritensis* a montré une bonne activité vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923, le diamètre de la zone d'inhibition varie de 12 à 15 mm. Il est à signaler que plusieurs études sont déroulées sur les extraits de *F. vesceritensis* et ses métabolites II^{ères}.

Tableau 05: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induite par l'huile essentielle des fruits de *F.vesceritensis* exprimés en mm.

Souches bactériennes	Origine	1/2 (v/v)	1/5 (v/v)	1/10 (v/v)	éthanol	Gen
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	30
<i>Escherichia coli</i>	Urines	6±0,0	6±0,0	6±,0	6±0,0	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pus	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	22,33±1,258 (c)	6±0,0	6±0,0	6±0,0	30
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	ATCC 43300	9,83±0,763 (s)	8±0,866	7±0,0	6±0,0	27
<i>Staphylococcus aureus</i> (Multiresistant)	hémoculture	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	28
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	19±0,5 (c)	10,83±0,76 (c)	7,83±0,76 c)	6±0,0	29
<i>Listeria inocula</i>	CIP 74915	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	24

Légende : (S): effet bactériostatique ; (C): effet bactéricide ; le diamètre de la zone d'inhibition est une moyenne de trois valeurs ± SD

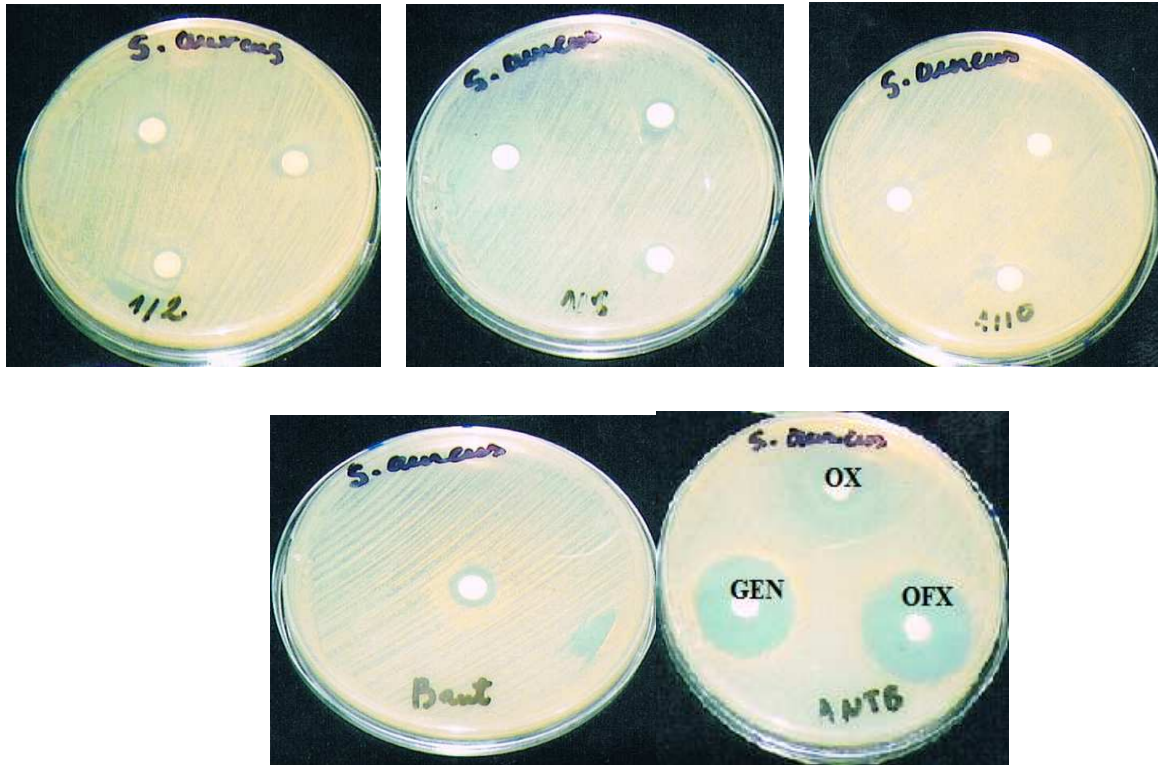


Figure 26: Les zones d'inhibition de *S. aureus* ATCC 25922 induites par l'HE de *F. vesicertensis* et par les antibiotiques standards

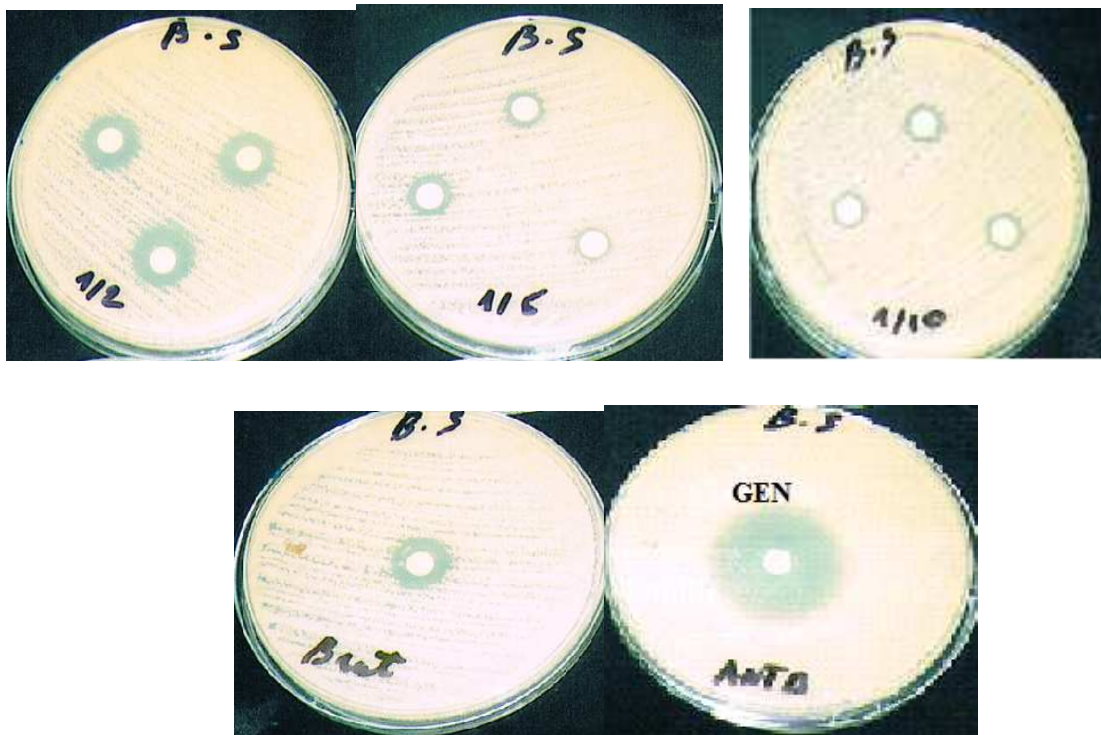


Figure 27 : Les zones d'inhibition de *B. subtilis* ATCC 6633 induites par l'HE de *F. vesicertensis* et par la Gentamicine

anticancéreux, en agissant sur la pompe d'efflux de la glycoprotéine p. Des esters daucanes de *F. communis* et *F. arrigonii* ont montré une activité antiproliférative des lignées cancéreuses du colon chez l'homme (Poli et al., 2005). Contrairement à *F. vesceritensis*, l'huile essentielle de *B. glaberrima* s'est montrée active vis-à-vis *E. coli* ATCC 25922, les diamètres des zones d'inhibition sont respectivement 26,67–20,33–18,33 mm aux trois dilutions (1/2, 1/5, 1/10 v/v) (Tableau 06).

Tableau 06: Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induite par l'huile essentielle de la partie aérienne de *B. glaberrima*. exprimés en mm.

Souches bactériennes	Origine	1/2 (v/v)	1/5 (v/v)	1/10 (v/v)	éthanol	Gen
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	26,67±1,05(C)	20,33±0,72(C)	18,33±0,88 (C)	6±0,0	25
<i>Escherichia coli</i>	Urines	7,66±0,57 (S)	6±0,0 (S)	6±0,0 (S)	6±0,0	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	8±0,0 (S)	7,33±0,57 (S)	6±0,0	6±0,0	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pus	7±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	16,67±1,8 (S)	10±1,00 (S)	8±0,0 (S)	6±0,0	25
<i>Staphylococcus aureus</i> SARM	ATCC 43300	9±0,0	7,33±0,58	7±0,0	6±0,0	22
<i>Staphylococcus aureus</i> MR	hémoculture	8,33±0,57	7,33±0,57	7±0,0	6±0,0	22
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	14,66±1,05(S)	12,33±0,51(S)	9,33±0,57 (S)	6±0,0	26
<i>Listeria inocula</i>	CIP 74915	6±0,0	6±0,0	6±0,0	6±0,0	17

Légende :

(s): effet bactériostatique ; (c): effet bactéricide ; MR : multiresistant

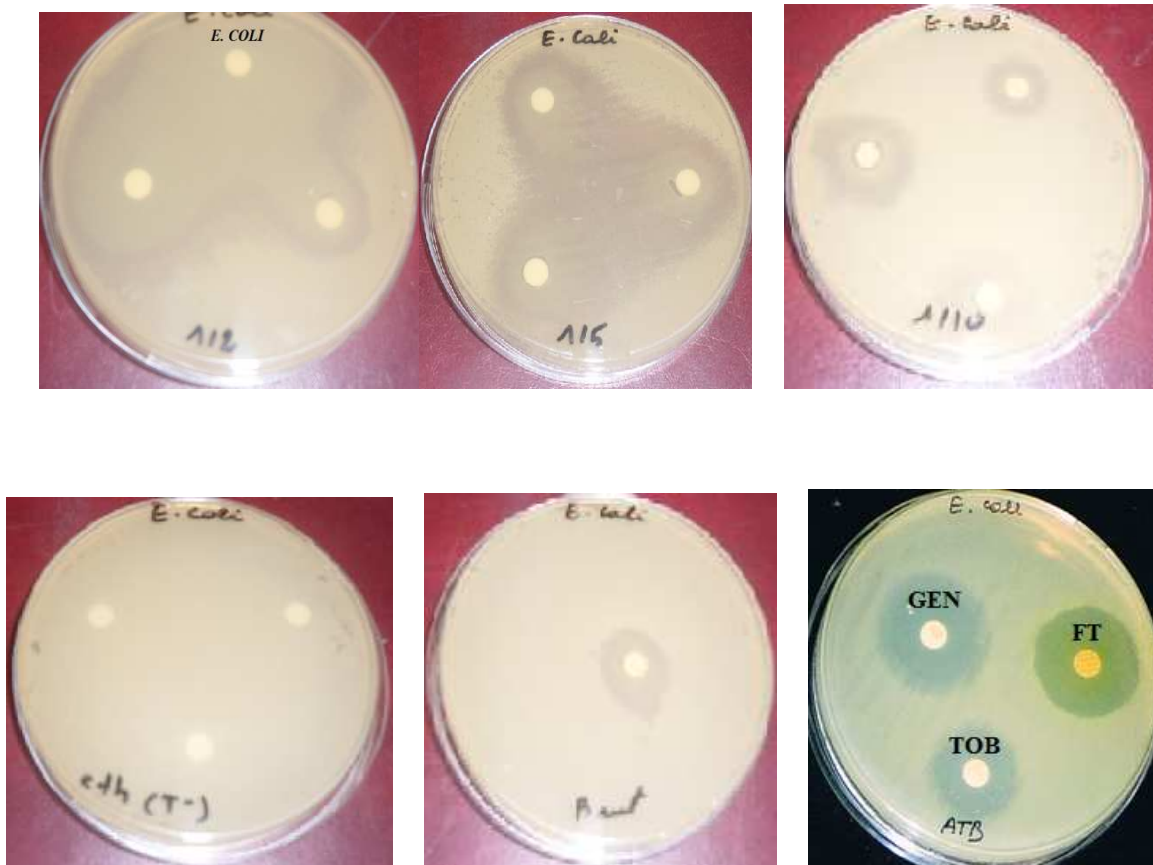


Figure 28: Les zones d'inhibition *E. coli* ATCC 25922 induites par l'HE de *B. glaberrima* et par les antibiotiques standards.



Figure 29 : Les zones d'inhibition de *S. aureus* (SARM) induites par l'HE de *B. glaberrima*.

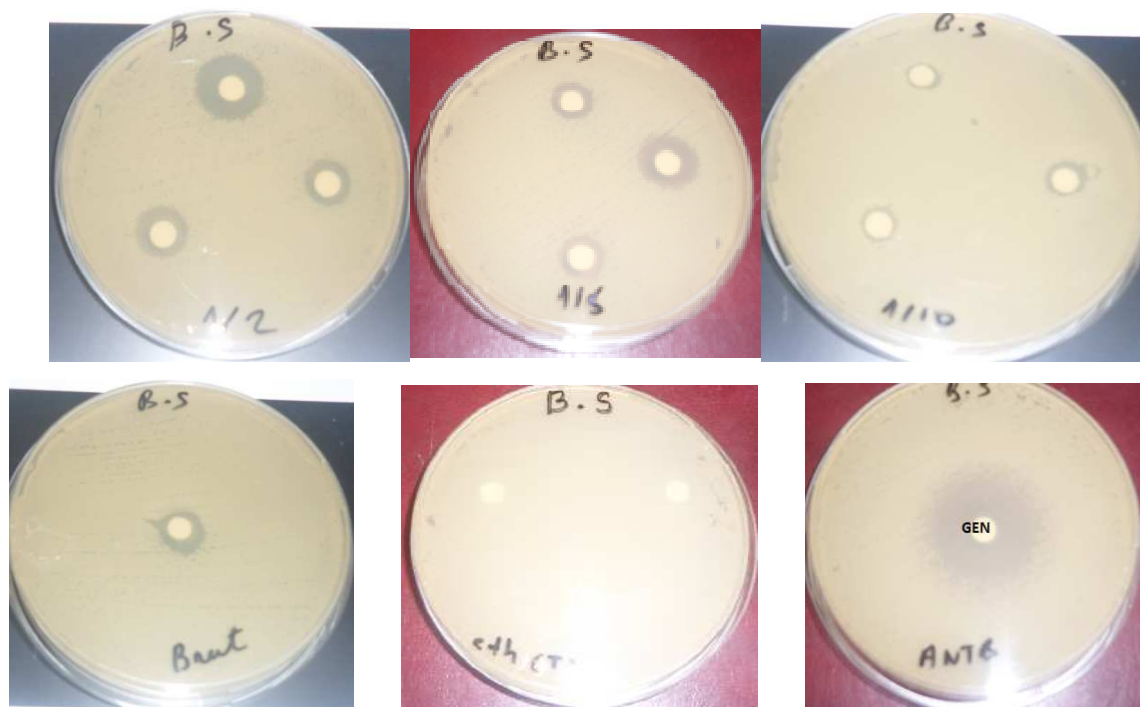


Figure 30 : Les zones d'inhibition de *B. subtilis* ATCC 6633 induites par l'HE de *B. glaberrima*.

Il est à signaler que *S. aureus* ATCC 25923 et *B. subtilis* ATCC 6633 se sont montrés sensibles non seulement à l'huile essentielle de *B. glaberrima* mais aussi à celle de *F. vesicertensis*. Les diamètres des zones d'inhibition de ces dernières à la dilution 1/2 sont respectivement 16,67, 14,66 mm. Par contre à la dilution 1/5 ils sont de l'ordre 10,1 et 12,33 mm. D'autre disque imbibé par l'éthanol (témoin négatif) est appliqué simultanément avec celui imbibé par l'huile, n'a montré aucun effet. Le diamètre de la zone d'inhibition est de 6 mm. Toutes les souches bactériennes testées même celles qui présentent une résistance naturelle ou acquise se sont montrées sensibles au témoin positif qui est la gentamicine, le diamètre de la zone d'inhibition varie de 20 à 30 mm (tableau 07).

Tableau 07 : Inhibition de la croissance bactérienne (exprimée en mm) induite par les antibiotiques de synthèse

Antibiotiques	Souches									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Penicilline(P)	/	/	32	10	13	/	/	/	/	
Ampicilline(AM)	20	6	/	/	/	/	/	/	/	
Amoxicilline+ac clavulanique(AMC)	25	12	/	/	/	30	/	/	/	
Ticarcilline(Ta)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Piperacilline (pip)	/	/	/	/	/	30	6	/	/	
Oxacilline (ox)	/	/	31	12	6	30	/	/	/	

Cefazoline (CZ)	25	/	/	/	/	/	/	/	/
Ceftazidine (CAZ)	25	/	/	/	/	/	/	/	/
Aztréonam (ATM)	/	/	/	/	/	/	13	/	/
Kanamycine (K)	/	/	28	14	27	/	/	/	/
Tobramycine (TM)	20	/	26	6	/	/	21	/	/
Gentamycine (GN)	30	25	30	27	30	30	20	29	24
Erythromycine (E)	/	/	32	6	10	/	/	/	/
Lincomycine (L)	/	/	30	/	/	/	/	/	/
Doxycycline (DO)	/	/	30	/	/	/	/	/	/
Furanes (FT)	27	28	/	/	/	/	/	/	/
Ofloxacin (OFX)	32	30	26	28	/	/	25	/	/
Rifampicine (RA)	/	/	34	/	/	/	/	/	/
Ac fusidique (FA)	/	/	/	/	/	38	6	/	/
Vancomycine (VA)	/	/	20	20	/	20	/	/	/

Il est à noter que la nature de l'effet de l'huile essentielle de *F. vesceritensis* vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 est bactéricide contrairement à leur effet sur *S. aureus* résistant à la méthicilline ATCC 43300 dont la croissance est seulement inhibée (effet bactériostatique). Par contre, l'huile essentielle de *B. glaberrima* a montré un effet bactéricide uniquement vis-à-vis *E. coli* ATCC 25922. Tandis que, les autres souches bactériennes comme *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* résistant à la méthicilline ATCC 43300 et *B. subtilis* ATCC 6633 ont été seulement inhibées (effet bactériostatique).

B. subtilis est un germe non pathogène «saprophyte» sensible à un nombre très important d'essences aromatiques (Belaiche, 1979). Il est à signaler que plusieurs études ont démontrées que les huiles essentielles de plusieurs espèces de la famille d'Apiacées comme celles du genre *Daucus*, présentent une bonne activité antibactérienne. Staniszewaska et al., (2005) ont trouvé que l'huile essentielle de *D. carota* subsp *sativus* (carotte sauvage) a présenté une forte activité sur les bactéries Gram positif (*B. subtilis* et *S. aureus*). Glisic et al., (2007) ont aussi démontré l'activité de l'huile de *D. carota* L. sur toutes les souches Gram positif (*S. aureus*, *L. monocytogene*, *B. subtilis*, *B. cereus* et *Enterococcus faecalis*) et les souches Gram négatif (*E. coli* et *Salmonella enteridis*). D'une manière générale, les bactéries Gram positif sont plus sensibles que les bactéries Gram négatif (Holley et Patel, 2005), car les Gram positif leur paroi est lipophile et constituée d'une seule membrane et une couche fine de peptidoglycane. Par contre les Gram négatif leur paroi est épaisse et elle est constituée de deux membranes plasmiques séparées d'une couche de peptidoglycane. La membrane plasmique externe (lipopolysaccharides) empêche la perméabilité des particules hydrophobes et spécialement les huiles essentielles. D'après Duarte et al, (2005), Kabouche et al, (2005). *S. aureus* ATCC 25923 semble être la plus sensible et n'a développé de résistance qu'envers quelques huiles essentielles (Hammer et al., 1999). L'absence de l'activité

antibactérienne s'explique par la résistance des souches bactériennes vis-à-vis des huiles essentielles. Parmi les souches résistantes, *P. aeruginosa*. Ce comportement n'est pas surprenant car les souches de pseudomonas possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides, associées à la nature de sa membrane externe. Cette barrière «hydrophilic permeability barrier» protège des agents toxiques, composée de liposaccharides, l'huile essentielle peut être franchie plus facilement en présence de certains composés polycationiques qui augmentent la perméabilité des bactéries Gram négatif (Mann et al 2000). La résistance de *P. aeruginosa* est en accord avec la littérature qui montre que cette espèce est généralement peu sensible aux huiles essentielles (Hammer et al., 1999). Cette résistance a été aussi rapportée par Chalchat et al., (1997), 1^{ère} souche qui s'est montrée insensible aux 13 huiles essentielles testées. Mais Dahia et al., (2007) ont signalé la sensibilité de *P. aeruginosa* à l'égard de l'huile essentielle de *Pituranthos chloranthus*. De même l'huile essentielle de *F. hexapetala* étudiée par Radulovic et al. (2007) qui a montré une forte activité vis-à-vis de *P. aeruginosa*, le diamètre de la zone d'inhibition est de 33 mm. *E. coli* ATCC 25922 développe ainsi une résistance vis-à-vis d'un certain nombre d'huiles essentielles (Sartoratto et al., 2004; Delamare et al., 2007). D'autre part, cette bactérie est très sensible vis-à-vis d'autres huiles essentielles (Burt et Reinders, 2003; Bouhadid, 2005).

Pour certaines souches bactérienne comme *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Listeria inocula* CIP7 74915 la technique de l'antibiogramme selon les normes NCCLS n'est pas standardisée, et puisque les molécules antibiotiques sont en majorité d'origine française pour cela les valeurs critiques des zones d'inhibition sont définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Les différences de résultats pourraient être aussi attribuées à la nature même de la composition chimique de l'huile essentielle. Selon Oussallah et al., (2006), les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, aldéhydes) et les effets synergiques entre les composants. Ainsi les composés chimiques les plus efficaces et qui possèdent un large spectre d'action antimicrobienne sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools (alpha-terpinéol, terpinen-4-ol, menthol, géraniol, linalol), les aldéhydes (géraniol, citrol et nérol) les cétones (carvone, pulégone et camphre). Shapiro et al., 1994 ont montré que le thymol inhibe la voie de génération de L'ATP. Ultée et al., (2002) ont montré que le carvacrol provoque également un effet inhibiteur chez *Bacillus cereus* de l'ATP intracellulaire qui endommage la membrane cytoplasmique.

Dans une étude de corrélation entre structure chimique des terpènes et leur pouvoir antimicrobien, Griffin et *al.*, (1991) ont conclu que les composés peu hydrosolubles, essentiellement les hydrocarbures et les acétates, sont associés à leur inactivité relative, alors que le reste des autres groupes de composés, tous contenant des terpènes oxygénés montraient des activités caractéristique mais destinées vis-à-vis des microorganismes testés.

Pseudomonas, germe réputé par sa résistance aux agents antimicrobiens montre sa sensibilité envers la pulégone, piéritone, à l'isopulégole et aussi bien qu'aux huiles riches par ces composés. Panizzi et *al.*, (1993) ; Sivropoulou et *al.*, (1995); Nakatsu et *al.*, (2000) ont démontré dans l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *thymus zygis*, qu'un mélange constitué de six principaux composants en proportions égales possédait une activité peu faible que celle de l'huile entière indiquant ainsi, le rôle significatif joué par les composants minoritaires

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude qui puisse nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des huiles possédait son propre mécanisme d'action. La perturbation de la membrane plasmique, la rupture de la force ionique, la coagulation du contenu cytoplasmique sont quelques mécanismes impliqués dans les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles (Carson et *al.*, 2002). Par contre, dans l'analyse de la variance les effets principaux souches et dilutions ont été testés par rapport à l'interaction souche x dilutions (SxD) et l'interaction souche x dilution (SxD) a été testée par rapport à la résiduelle de modèle additif. Le facteur dilution avec 3 variantes (D1, D2, D3) et le facteur souche avec 9 variantes (S1, S2, S3,S9), l'analyse de la variance est celle d'un dispositif factoriel qui permet de tester l'effet dilution, l'effet souche et l'interaction des deux facteurs sur l'inhibition bactérienne (Voir tableaux 08, 09, 10, 11).

Tableau 08 : Carrés moyens de l'analyse de la variance de l'HE de *F. vesceritensis* et *B. glaberrima*.

Sources de variation	ddl	Carrés moyens
Souches	8	39,97***
Dilutions	2	71,9***
Souches x dilution	16	31,2***
Résiduelle	54	2,46

*** : très hautement significatif au seuil de 0,1%

Tableau 09: Valeurs moyennes des zones d'inhibition (mm) enregistrées sur les souches bactériennes sous l'effet de différentes dilutions des HE.

plantes	<i>F. vesceritenis</i>			<i>B. glaberrima</i>		
Souches	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3	Dilution 1	Dilution 2	Dilution 3
S1	6 c	6 b	6 b	26,66 a	20,33 a	18,33 a
S2	6 c	6 b	6 b	8,33 c	7,33 c d	6,25 d
S3	23,33 a	6 b	6 b	15 b	10 b c	8 b c
S4	9,83 c	8 a	7 a b	8,66 b c	7 c d	7 c d
S5	6 c	6 b	6 b	6 c	6 d	6 d
S6	14,66 b	7,76 a	7,66 a	10,33 b	12,33 b	6,25 d
S7	6 c	6 b	6 b	7,66 c	6 d	6 d
S8	6 c	6 b	6 b	8,33 c	7,33 c d	7 c d
S9	6 c	6 b	6 b	7 c	6 d	6 d
Ppds 5%	4,38	1	1,51	6,61	3,14	2,1

a : moyennes suivies par la même lettre par colonne ne sont pas significativement différentes

Légende : Ppds : la plus petite différence significative ; S1 : *E. coli* ATCC 25922 ; S2 : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ; S3 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ; S4 : *Staphylococcus aureus* (SARM) ; S5 *Listeria inocula* CIP 74915 ; S6 : *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ; S7 : *E. coli* ; S8 : *Staphylococcus aureus* ; S9 : *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 10 : Carrés moyens de l'analyse de la variance des zones d'inhibition bactérienne sous l'effet de l'HE de *B. glaberrima*.

Sources de variation	ddl	Carrés moyens
Souches	8	222,21***
Dilutions	2	49,26**
Souches x dilutions	16	8 ns
Résiduelle	54	6,42

ns, **, *** : effet non significatif, significatif au seuil de 1% et 0,1% respectivement.

Tableau 11 : Carrés moyens de l'analyse de variance des zones d'inhibition bactériennes sous l'effet de l'HE de *F. vesceritensis* et *B. glaberrima*

Plantes	Dilutions	Carrés moyens			Dilutions	Carrés moyens	
<i>F. vesceritensis</i>	D1	souches	99,07***	<i>B. glaberrima</i>	D1	souches	125,08***
		Erreur	6,52			Erreur	14,88
	D2	souches	2,07***		D2	souches	66,34***
		Erreur	0,34			Erreur	3,37
	D3	souches	1,02 ns		D3	souches	47,24***
		Erreur	0,52			Erreur	1

ns, **, *** : effet non significatif, significatif au seuil de 1% et 0,1% respectivement.

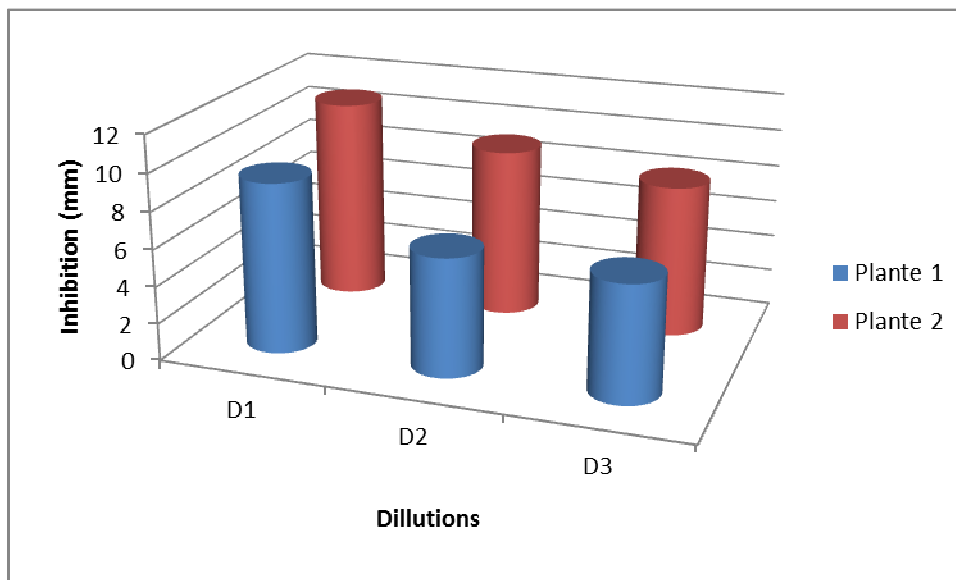


Figure 31 : Moyennes générales des zones d'inhibition de neuf souches bactériennes sous l'effet de différentes dilutions de l'HE de *F. vesceritensis* (plante1) et *B. glaberrima* (plante2).

VI.5. Pouvoir antifongique

Les résultats de l'activité antifongique mentionnés dans le tableau 12 laissent apparaître l'inefficacité de l'huile essentielle de *F. vesceritensis* sur *Aspergillus niger* 2CA 936 et *Aspergillus flavus* NRRL 391 aux trois dilutions (1/2, 1/5, 1/10 v/v). *Candida albicans* ATCC 1024 s'est révélé peu sensible, sa croissance a été faiblement inhibée à la dilution 1/2, le diamètre de la zone d'inhibition est de 9 mm.

Tableau 12: Pouvoir antifongique de l'huile essentielle des fruits de *F. vesceritensis* exprimé par les diamètres des zones d'inhibition en mm

Champignons	Origine	1/2 (v/v)	1/5(v/v)	1/10(v/v)	Etha	CTR	AB	NY
<i>Candida albicans</i>	ATCC 1024	9	6	6	6	33	19	21
<i>Aspergillus niger</i>	2 CA 936	6	6	6	6	20	9	11
<i>A. flavus</i>	NRRL	6	6	6	6	24	8	7

Au contraire, l'huile essentielle de *B. glaberrima* a montré un effet positif uniquement sur *Aspergillus Flavus* le diamètre de la zone d'inhibition de la sporulation à la dilution 1 / 2 est de 14,18 mm (tableau 13)

Tableau 13: Pouvoir antifongique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *B. glaberrima* exprimé par les diamètres des zones d'inhibition en mm

Champignons	Origine	1/2 (v/v)	1/5(v/v)	1/10(v/v)	Etha.	CTR	AB	NY
<i>Candida albicans</i>	ATCC 1024	/	/	/	/	33	19	21
<i>Aspergillus niger</i>	2 CA 936	/	/	/	/	20	9	11
<i>Aspergillus.flavus</i>	NRRL 391	14,18	/	/	/	24	8	7

Les antifongiques standards se sont montrés actifs, le clotrimazol est très actif vis-à-vis de tous les champignons testés, le diamètre de la zone d'inhibition de *Candida albicans*, *A. niger* et *A. flavus* sont respectivement 33, 20, 24 mm. *A. flavus* et *A. niger* ont été faiblement inhibés par l'Amphotéricine B et la Nystatine. Les diamètres de la zone d'inhibition induite par

l'Amphotéricine B sont respectivement 9 et 8 mm. Par contre, ceux des zones d'inhibition induites par la Nystatine sont de l'ordre: 11 et 7 mm. On constate qu'*A. flavus* est presque résistant à la Nystatine contrairement au *Candida albicans* qui s'est montré sensible non seulement au Clotrimazol mais aussi à l'Amphotéricine B et à la Nystatine, ces deux derniers ont induit une inhibition dont les valeurs sont respectivement 19 et 21mm.

Le pouvoir antifongique de l'huile essentielle est lié à l' α -pinène, β -pinène, p-cymène, 1,8 cinéole. L' α -pinene est présent en proportion importante dans l'huiles essentielle de *F. vesceritensis* (28,57%). La sensibilité des Aspergillus a été constatée par un certain nombre de recherche. Il faut noter que l'huile essentielle agit non seulement sur la croissance du mycélium mais aussi sur l'inhibition de la sporulation. La figure 32 élucide clairement l'activité de l'HE de *Balansea glaberrima* à la dilution 1/2 sur l'inhibition de la sporulation d'*A. flavus*.

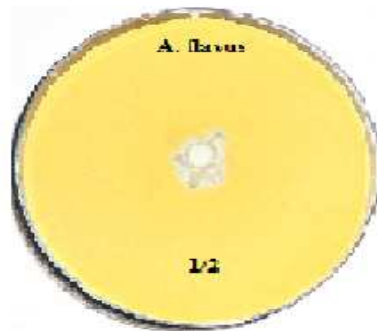


Figure 32: La zone d'inhibition de la sporulation d'*A. flavus* induite par l'HE de *B. glaberrima* à la dilution 1/2.

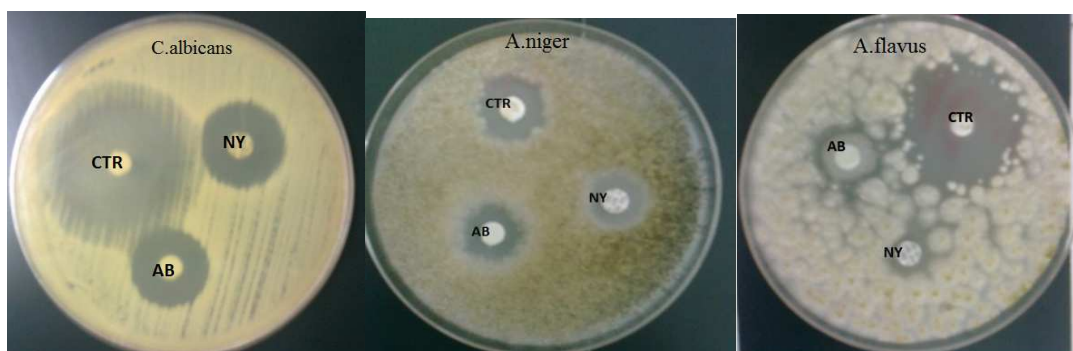


Figure 33: Les zones d'inhibition induites par les antifongiques standards sur *C. albicans*, *A. niger* et *A. flavus*.

Il semble que certains extraits favorisent la prolifération du mycelium. Le pouvoir antifongique pourrait être attribué à la présence de composants antifongiques cités par Duke (2009) tel que: le myristicine, le curcumène, le caryophyllène, l'élémicine, le pinène, le terpinène et le terpinolène à différentes proportions. L'activité antifongique des huiles essentielles, peut être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés de l'huile essentielle. En effet, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antimicrobienne de cette huile (Giordani et al., 2008; Regnier et al., 2008). L'activité antifongique des huiles essentielles vis-à-vis *C. albicans* est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox et al., 2000).

VI.6. Pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *F. vesceritensis* et celle de *B. glaberrima* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par leur capacités de piéger les radicaux libres (DPPH), à des fins comparatives le BHT est utilisé comme référence.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus dans les figures 34, 35 et 36 révèlent que l'huile essentielle de *F. vesceritensis* et celle de *B. glaberrima* ainsi que le BHT possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante. Le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration, ce pourcentage est comparé à celui du contrôle.

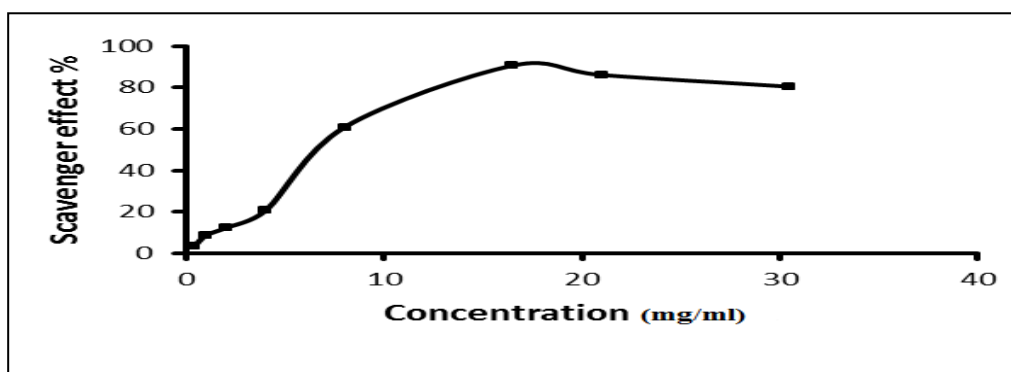


Figure 34 : Activité anti radicalaire de l'huile essentielle de *B. glaberrima*

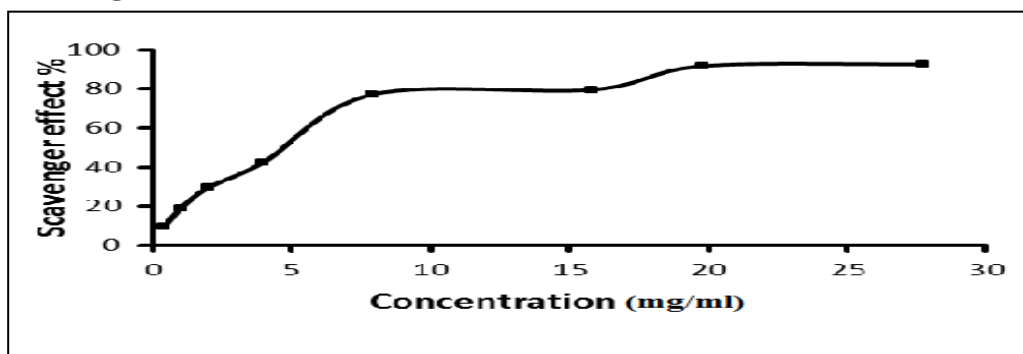


Figure 35 : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *F. vesceritensis*

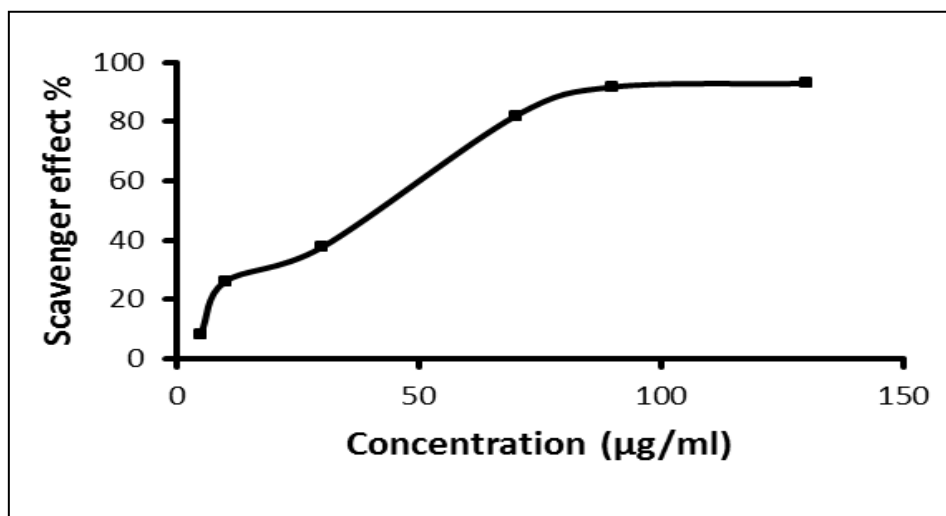


Figure 36: Activité antiradicalaire du BHT manifestée dans le test DPPH•.

La quantité de substance (μg d'huile essentielle ou de standard) présente dans 1 ml de milieu réactionnel qui réduit l'absorbance de 50% (IC_{50}) est déterminée. La IC_{50} de l'huile de *B. glaberrima* est de $9136,93\mu\text{g/ml}$ et celle de *F. vesceritensis* est de $7440,68\mu\text{g/ml}$. Par contre le BHT a montré une activité antiradicalaire puissante avec une IC_{50} de l'ordre de $41,358\mu\text{g/ml}$. D'après les résultats mentionnés dans le tableau 14, il semble que l'huile essentielle de *F. vesceritensis* a une activité antioxydante un peu plus élevée que celle de *B. glaberrima* mais toutefois les deux huiles sont moins efficaces que le BHT.

Tableau 14 : IC_{50} de l'HE de *F. vesceritensis*, *B. glaberrima* et du BHT.

Echantillons	IC_{50}	SD
HE <i>F. vesceritensis</i> $\mu\text{g/ml}$	7440,9	0,800
HE <i>B. glaberrima</i> $\mu\text{g/ml}$	9136,6	0,351
BHT $\mu\text{g/ml}$	41,3	0,397

NB. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD

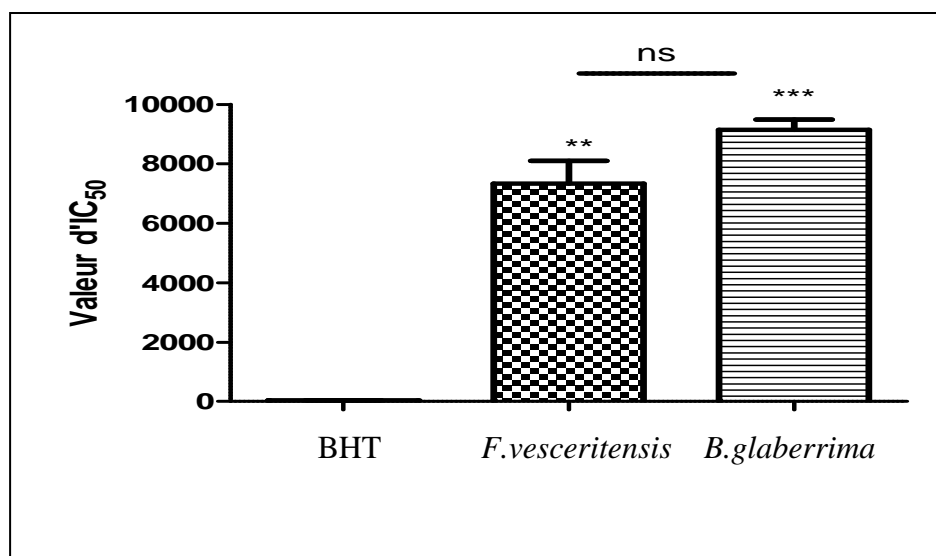


Figure 37: Activités antiradicalaires de l'huile essentielle de *Ferula vesceritensis*, *Balansea glaberrima* et du BHT.

Les résultats des tests *in vitro* de l'activité antioxydante sont exprimés en moyennes \pm SD. Les comparaisons entre les différentes HE et entre les huiles et le témoin positif et la détermination des taux de signification sont faites par le test Anova univarié suivi du test de Student. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

L'activité antioxydante peut être expliquée par la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH l'atome d'hydrogène est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène.

Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports (Villano et *al.*, 2007). Selon Bourgou et *al.* (2008) les composés des huiles essentielles les plus efficaces dans l'activité antioxydante sont les monoterpènes oxygénés, en particulier les phénols et les alcools. L' α -pinène est un composé majoritaire de l'huile essentielle de *F. vesceritensis* ce qui peut expliquer son activité antioxydante. En revanche d'après Djenane et *al.* (2012) les huiles essentielles qui sont riches en composés non phénoliques ont également un pouvoir antioxydant. Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des

radicaux libres (Lu et Foo, 2001; Singh et Barret, 2006). Le camphor possède une forte activité antioxydante (Svoboda et Hampsen, 1999). La présence du carvacrol même à faible concentration peut expliquer l'activité de piégeage du radical DPPH. Il faut noter que les résultats contradictoires dans l'activité antioxydante des huiles essentielles sont dus probablement à la différence de leurs compositions chimiques (Lis Balchin, 2002).

Conclusion Générale

L'inefficacité du traitement par les antibiotiques due à l'apparition des phénomènes de résistances multiples et les effets négatifs des antioxydants synthétiques encouragent à leur substitution par des agents naturels. Les huiles essentielles aux propriétés antimicrobiennes et antioxydantes peuvent constituer une alternative très efficace. De cet effet, notre étude s'est intéressée à une famille réputée par ses vertus thérapeutiques en particuliers vis-à-vis les troubles digestifs fonctionnels, il s'agit de la famille des Apiacées. Dans le présent travail nous avons étudié l'activité antimicrobienne et antioxydante *in vitro* de deux huiles essentielles de deux plantes de la famille des Apiacées à savoir *F. vesceritensis* et *B. glaberrima*. Le taux d'humidité de deux plantes a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve, presque les 2/3 de *B. glaberrima* sont formés par l'eau, le taux d'humidité est de 71,52%, par contre *F. vesceritensis* comprend approximativement des proportions équivalentes de matière fraîche et d'eau, son taux d'humidité est de 50,84%. Les huiles essentielles de la partie aérienne de *B. glaberrima* et des fruits de *F. vesceritensis* ont été extraites par hydro distillation. Le rendement en huile essentielle de *B. glaberrima* est de 0,260% et celui de *F. vesceritensis* est de 0,138%. La densité de l'huile de *F. vesceritensis* est de $0,779 \pm 0,007$ et celle de *B. glaberrima* est de $0,883 \pm 0,037$.

Quarantes composés ont été identifiés dans l'huile essentielle de *F.vesceritensis* ce qui correspond à 96,00% de la totalité de l'HE. La fraction importante de l'HE est attribuée aux mono et sesquiterpènes avec des pourcentages 43,45%, 49,68% respectivement. L' α -pinène est le monoterpène majoritaire avec 28,57 %, l'aristolène est le sesquiterpène majoritaire (24,63%). La composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *B. glaberrima* a révélé la présence 21 constituant dont trois majoritaires à savoir valencène (36,65%), l'apiolène (34,87%) et γ -muroloène (9,83%). Au cours de cette étude nous avons réalisé deux tests *in vitro*. Un test antimicrobien vis-à-vis neuf souches bactériennes et trois champignons et également un test de l'activité antioxydante. L'huile essentielle de *F. vesceritensis* a montré une activité vis-à-vis de deux souches Gram positif : *S. aureus* ATCC 25922 et *B. subtilis* ATCC 6633, les zones d'inhibition à la dilution $\frac{1}{2}$ sont respectivement 22 mm, 19 mm, par contre la Gentamicine a induit une zone d'inhibition très importante avec un diamètre de 30 et 29 mm respectivement. *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est faiblement sensible à l'HE de *F. vesceritensis*, le diamètre de la zone d'inhibition à la dilution $\frac{1}{2}$ est de 10 mm. L'huile essentielle de *B. glaberrima* a montré une bonne activité vis-à-vis d'un germe Gram négatif, *E. coli* ATCC 25922, les diamètres des zones d'inhibition

aux trois dilutions (1/2, 1/5, 1/10 v/v) sont respectivement 26, 20, 18 mm. La Gentamicine a induit une inhibition de 25 mm. Egalement l'HE de *B. glaberrima* a induit une inhibition vis-à-vis de trois germes Gram positif: le diamètre de la zone d'inhibition de *S. Aureus* ATCC 25923 est de 16 mm, à la dilution 1/2, les diamètres des zones d'inhibition de *B. subtilis* ATCC 6633 aux deux dilutions sont 14, 12 mm respectivement. Enfin *S. aureus* (SARM) a été faiblement inhibé à la dilution 1/2, le diamètre de la zone d'inhibition est de 9 mm. L'effet de l'HE de *F. vesceritensis* vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 et *B. subtilis* ATCC 6633 est bactéricide et elle est bactériostatique vis-à-vis de *S. aureus* (SARM). L'HE de *B. glaberrima* est bactéricide vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 et bactériostatique vis-à-vis des trois souches Gram positif : *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* (SARM) et *B. subtilis* ATCC 6633. Le test *in vitro* de l'activité antifongique montre l'inefficacité de l'HE de *F. vesceritensis* contre les Aspergillus (*A. flavus* NRRL 391 et *A. niger* 2 CA), *C. albicans* ATCC 1024 a été faiblement inhibé à la dilution 1/2 le diamètre d'inhibition est de 9 mm. L'huile essentielle de *B. glaberrima* a inhibé la sporulation d'*A. flavus* à la dilution 1/2, *A. flavus* et *C. albicans* se sont montrés insensibles. Il faut noter cependant que les antifongiques standards ont montré une bonne activité envers les trois champignons surtout le Clotrimazol qui a induit une forte inhibition vis-à-vis de *C. albicans*, *A. flavus* et *A. niger*, les diamètres des zones d'inhibition sont respectivement : 33, 24, 20 mm, par contre l'Amphotericine B et la Nystatine ont été actives uniquement sur *C. albicans*, les diamètres des zones d'inhibition sont respectivement : 19, 21 mm. Par ailleurs le test *in vitro* de l'activité antioxydante a montré que les deux huiles possèdent une activité antiradicalaire relativement faible par rapport à celle du BHT. L'HE de *F. vesceritensis* a une activité anti radicalaire un peu plus élevée que celle de *B. glaberrima* mais toutes fois les deux huiles sont moins efficaces que le BHT. l'IC₅₀ de *F. vesceritensis*, *B. glaberrima* et du BHT sont respectivement : 7440,9, 9136 et 41,3587 µg/ml. En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de sources naturelle biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir examiner de près les autres activités biologiques (activité anticancéreuse, cytotoxicité, antivirale, estrogénique et anticoagulante...). Le champ de recherche est donc particulièrement étendu et promoteur.

Références bibliographiques

- Abd El-Razek M. H., Ohta S., Ahmed A. A., Hirata T. (2001) - Sesquiterpenes coumarins from the roots of *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry*, 58: 1289-1295
- Adams R. P. (2007) - Identification of Essential oil components by gas chromatography/ mass Spectroscopy, 4th ed. allured publishing corporation, Carol Stream, Illinois, USA.
- AFNOR. (1992) - Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles. Editeur Paris-la-Défense, France.
- Akgul A. (1989) – Antimicrobial activity of blank cumin (*Nigella sativa* L.) essential oils. *Journal of Faculty of Pharmacy of Gazi University*, 6 (1): 63-68.
- Alkhatib R. (2010) - Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss (Apiacées). Thèse de Doctorat Sciences du médicament, école doctorale biologie santé, université Lille Nord de France.
- Alvaez-Castellanos P. P. and Pascal-Villabos M. J. (2003) - Effect of fertilizer on yield and composition of flower head essential oil of *Chrysanthemum caronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. *Industrial Crops and Products*, 17, 77-81.
- Appendino G., Spagliardi P., Cravotto G., Pocock V. and Milligan S. (2002) - Daucane phytoestrogens: a structure-activity study. *Journal of Natural Products*, 65: 1612-1615.
- Assad y O., Torto B., Hassanali A., Njagi P. G. N., Bashir N. H. H., Mahamat H. (1997) - Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Phytochemistry*, 44 : 833-841.
- Audigie C. L., Dupon G. et Zongain F. (1995) - Principes des méthodes d'analyses biochimiques. T1, 2^{ème} Ed. Doin, Paris, p. 44.
- Bego Ph. (2001) - Connaitre l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale. Ed. MDB Paris, pp. 2-3.
- Belaiche P. (1979) - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'Aromathérapie. Editions Maloine S A. Paris.
- Béliveau R. et Gingras D. (2005) - Les aliments contre le cancer. Edition du trécaré. Outremont, 213 p.
- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., Bernardinij F. and Costa J. (2007) - Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106: 132-139.

- Blois M. S. (1958) - Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181: 1999-1200.
- Bouchouka EL., Djilani A. and Bekkouche A. (2012) - Antibacterial and antioxidant activities of three endemic plants from Algerian Sahara. *ACTA Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 1(11): 61-65.
- Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Senhajiski N., Abrini J. (2005) - L'effet antibactérien *in vitro* de l'huile essentielle d'*Origanum compactum* vis-à-vis de souches d'origines cliniques. *Nouvelles tendances dans l'Ingénierie Biomédicale*. 11 :142-149.
- Boulos L. (1983) - Médicinal plants of North Africa. Editiond. Algonac, Michigan, p. 183
- Bounias M. (1990) - Analyse biochimique quantitative par nanochromatographie en couche mince. Edition Masson, Paris, 198 p.
- Bourgou S., Ksouri R., Skandrani I., Chekir-Ghedira L., Marzouk B. (2008) - Antioxidant and antimutagenic activities of the essential oil and methanol extraction from Tunisian *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Italian journal of food science*, 20 (2):191-201.
- Braga P. C., Dal Sasson M., Culici M., Galastri L., Marceca M. T. and Guffanti E. E. (2006) - Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems. *Pharmacology*, 76: 61-68.
- Brands Williams W., Cuvelier M. and E. Berset C. (1995) - Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-wissenschaft und technologie*, 28 25-30.
- Bruneton J. (1999)-Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} éd. Edition Tec & Doc Lavoisier, Paris, 1120 p.
- Bruneton J. (2009)-Pharmacognosie:phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier.
- Buchbauer G. W., Jgera W., Jirovetz. L., Imberger J. and Dietrich H. (1993) - Therapeutic properties of essential oils and fragrances. In *Bioactive volatile compounds from plants (R teramishu R G Buttery and sugisawa, eds)*. America chemical society symposium series 525 Washington District de Columbia: American Chemical Society, 159-165.
- Burt SA. and Reinders R. (2003) - Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36: 162-167.
- Butterfield D. and Louder Back C. (2002) - Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 32: 1050-1060.
- Caldefie-Chézat F., Guerry M., chalchat J. C., Fusillier C., Vasson M. P. and Guillot J. (2004) - Anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. *Free Radical Research*, 38: 805-811.

- Caldefie-Chézat F., Fusillier C., Jarde T., Laroye H., Damez M. and Vasson M. P. (2006) -Potential anti-inflammatory effects of *Malaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phytotherapy Research*, 20: 364-370.
- Cao G. and Prior R. L. (1998)-Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44:1309-1315
- Caree. (1953)- Précis de technologie et de chimie industrielle. T.3, Les Industries des produits organiques. Édition Jean.-Baptiste. Baillière et Fils, Paris
- Carneseccchi S., Langle Y. K., Exinger F., Gossée F., Roul F. (2002) - Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 301, 625-630.
- Carneseccchi S., Bras-Gonçalves R., Bradaia A., Zeisel M., Gossé F., Poupon M. F. and Roul F. (2004) - Geraniol a component of plant essential oils modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon. *Cancer Letters*, 215: 53-59.
- Carson C. F. and Riley T.V. (1995) - Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Méthodes chromatographiques. Dossier P 1445. Base documentaire: Techniques d'analyses. Vol; papier T A2.*
- Carson C. F., Mee B. J., Rilley T. V. (2002) - Mechanism of action of *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined par time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: 46:1914-1929.
- Cavaliere E., Mariotto S., Fabrizi C., Carcereri de prati A., Gottardo R., Leone S., Berra L.V., Louro G. M., Ciampa A. R. and Suzuki H.(2004) - α -bisabolol a non-toxic natural compound strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315: 589-594.
- Cavalli J. F. (2002) - Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat. Université de Corse Pascal Paoli. 274p
- Chahma A. (2006)-Catalogue des plantes spontanées dans le Sahara Septentrional, 148p.
- Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R and Chopinau J. (1997) - Correlation between oils. *Journal of essential oils research*, 9: 67-75.
- Chan C. H. and Loudon k. w. (1998) - Activity of tea Tree oil on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Hospital Infection*, 39: 244-245.
- Chemat F., Lucchesi M. E.; Smadja j., Favretto L., Colnaghi G. and Visinoni F. (2006) -Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, 555: 157-160.

- Coste H. et Flahoult CH. (1998) - Flore Descriptive et illustrée de la France de la Corse et des Contrées limitrophes. Tome II. Librairie scientifique et technique, Paris.
- Cox S. D., Mann C. M., Markaham J. L., Bell H. C. Gustafson J. E., Warmington J. R. and Wyllie S. G. (2000) - The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88: 170-175.
- Dahia M., Laouer H., Chaker A.N., Prado S., Meierhenrich U.J. and Baldovini N. (2007)-Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Pituranthos chlorantus* Volatile Oil. *Natural Product Communication*, 2 (11):1159-1162.
- Dean S. G. and Svopoda P. (1990) - The antimicrobial properties of Majoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 5: 187-190.
- Delamare A. P. L, Luciana A. S. and Sergio E. (2007)-Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. Cultivated in south Brazil. *Food chemistry*, 100:603-608.
- Denny E. F. K. (1991) - Field distillation for herbaceous oils 2^{èmes} éd. Denny-Mc Kenzie Associates, Lilydole.
- Djenane D., Aïder M., Yangüela J., Idir L., Gónez D., Roncalés P. (2012) - Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Menthe essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* 0 157: H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Natural science* 92:667-674.
- Duan H., Takaishi Y., Tori M., Takaoka S., Honda G., Ito M., Takeda Y., Kodzhimatov O.K., Kodzhimatov K., Ashurmetov O. (2002) - Polysulfide derivatives from *Ferula foetida*. *Journal of Natural Products*, 65: 1667-1669.
- Duart M. C. T., Figuei G. M., Sartoratto A., Rehder V. L. G. Delarmelina C. (2005) - Anti-Candida activity of Brazillian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 305-311.
- Dubey V. S., Bhalla R. and Luthra R. (2003) - An Overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biosciences*, 28 (5): 637-646.
- Duke J. (2009) - phytochemical and ethnobotanical database. USDA- ARS- NGRI, Beltsville agricultural research center (<http://www.Ars.gov/duke/>) (consulted 20/05/2013).
- Duraffourd C., d'Hervicourt L. et Lapraz J. C. (1990) - Cahier de phytothérapie clinique, examen de laboratoire galénique, éléments thérapeutique synergiques. T1, 2^{ème} édition, Ed. Masson, Paris, 89 p.
- Dryden M. S., Dailly S. and Crouch M. (2004) - A randomized controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimes for the clearance of MRSA colonization. *Journal of Hospital Infection*, 58: 86-87.

- Edris A. E., Shalaby A., Fadel H. (2003) - Evaluation of a chemotype of spearmint (*Mentha spicata* L.) growing in Siwa, Egypt. *European Food Research and Technology*. 218: 74-78
- Edris A. E. (2007) - Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research* 21: 308-323.
- El-Razeh MH., Ohta S. and Hirata T (2003) - Terpenoid coumarins of the genus *Ferula*. *Heterocycles*, 60: 689-716
- El Zakhem M. (2003) - Effets antifongiques des huiles essentielles extraites de l'*Origanum syriacum* L. et de *Salvia libanotica* Boiss et Gaill contre les *Candida: albicans* holmii et *efamata*. Mémoire de diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en agroalimentaire et assurance Qualité. Institut Agronomique, Paris Grignon (INA-PG).
- Fabian D, Sabol M, Domaracká K and Bujnáková D. (2006) - Essential oils-their antimicrobial activity against *Escharichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in vitro* 20: 1435-1445
- Fathy A. F. A., Abdelbaki M. M.; El Warraki A. G. and Abbas S. (1965) - Studies on the essential oil of Rosemary, 1-isolation of Rosemary oil. *Annals of Agricultural Science. Sciences, Faculty of Agriculture. University of Cairo*, 137-153.
- Filliat Paloma. (2012) - Les plantes de la famille des Apiacées dans les troubles digestifs, thèse de docteur en pharmacie diplôme d'état. Université Joseph Fouries, Faculté de pharmacie de Grenoble.
- Flamini G., Tebano M., Cioni, p. L., Ceccarini L., Ricci A. S. and Longo I.(2007) -Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied *in situ*, without Resorting to an oven. *Journal of Chromatography A*, 1143: 36-40
- Flaxman D., Griffith P. (2005) - Is tea tree oil effective at eradicating MRSA Colonization. A Review. *British Journal of Community Nursing*, 10: 123-126
- Fluck H. (1942) - Nos plantes médicinales. Traduit par Weitzel R. librairie Payot, Lausanne, pp. 8-14.
- Fournier G., Habib J., Reguigui A., Safta F., Guetari S., et Chemli R. (1989) - étude de divers échantillon d'huile essentielle de *Rosmarinus* de Tunisie. *Plantes médicinales et phytothérapie*, XXIII (3) :180-185.
- France-Ida J. (1996) - Bref survol de diverses méthodes d'extraction d'huiles essentielles essences. *Bulletin sur les huiles essentielles*, 3: 5-6.
- Franchomme P. et Péroël D. (1990) - L'aromathérapie exactement. *Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445p.

- Garden P. (1997) - Superoxide-driven aconitase FE-S-Center-cycling. *Bioscience Reports*. 17 : 33-42.
- Garneau F. X. (2004) - Le matériel végétal et les huiles essentielles. Manuel pratique. Huiles essentielles: de la plante à la commercialisation. pp. 1-16.
- Garnero J. (1996) - Huiles essentielles, Dossier : K345. Base documentaire: Constantes physico-chimiques, vol. Papier n°: K2.
- Ghasemiy., Faridi P., Mehregan I. and Mohagheghzadeh A (2005) - *Ferula gummosa* fruits and aromatic antimicrobial agent. *Chemistry of Natural Compounds*, 41: 3.
- Ghestem A., Seguin E, Paris M. et Orecchioni A. M. (2001) - Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie. Ed. TEC et DOC, Paris.
- Giordani R., Hadeif Y. and Kloustian J. (2008) - Composition and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79: 199-203.
- Glisic S.B., Misic D.R., Stamenic M.D., Zizovic I.T., Asanin R.M., Skala D.U. (2007) - Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 105 (1), 346-352,
- Gonzalez AG. and Barrera JB. (1995)-Chemistry and the sources of mono and bicyclic. *Progress Chemistry of Natural Products* 64: 1-92
- Granger M. M. R., Passet J. et Arbousset G. (1973) – L'essence de *Rosmarinus officinalis*, influence du mode de traitement du matériel végétal. *Parfumerie, Cosmétique, Savons*. France 3(3): 133-137.
- Griffin S.G., Wyllie G., Markham J.L, and Leach D.N. (1991) - The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 14: 322-332.
- Guba R. (2001)-Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy*, 11 : 76-83.
- Guenther E. (1972) - in Bekhechi B. C., Analyse de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (Noukha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien, Mémoire de Magister en Biologie moléculaire et cellulaire, université de Tlemcen (UT), (2002), 98p+annexes
- Guignard J. L. (2000) - Biochimie végétale. 2^{ème} Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp. 177-185.
- Habersang S., Leuschner F., Isaac O. and Thieme K. (1979) - Pharmacological Studies with compounds of chamomile. Iv. Studies on toxicity of (-)- α -bisabolol. *Planta Medica*, 37: 115-123.

- Hammer K. A., Carson C.F. and Riley T.V. (1999) - Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86:985-900
- Hart P. H.; Brand C.; Carson C. F.; Riley T.V., Proger R. H. and Finlay-Jones J.J. (2000) -terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses p inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Resolution*, 49: 619-626.
- Heywood V. H. (1971) - The biology and chemistry of the Umbelliferae. Academic press London.
- Holley R. A., Patel D. (2005) - Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22 (4): 273-292.
- Homburger F and Boge E. (1968)-The carcinogenicity of essential oils flavors and Spices: A Review. *Cancer Research*, 28: 2372-2374.
- Ikeda K., Arao Y., Otsuka H., Nomoto S., Horiguchi H., Kato S., Kayama F. (2002) -Terpenoids found in the Umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER (alpha) and ER (beta). *Biochemical Biophysical Research Communications*, 291: 354-360;
- Iranshahi M., Hossein S. T., Shahverdi A. R., Molazade K., Khan S. S., Ahmad V. U. (2008) - Diversolides A-G guaianolides from the roots of *Ferula diversivittata*. *Phytochemistry*, 69: 2753.
- Jakovlev V., Isaac O., Thieme K and Kunde R. (1979) - Pharmacological investigation on the components of chamomile. II. New investigations on the anti-inflammatory effects of (-)- α -bisabolol and bisabolol oxides. *Planta Medica*, 35: 125-140.
- Javidnia K., Mirri R., Kamalinejad M. and Edraki N. (2005) - Chemical composition of *Ferula persica* wild essential oil from Iran. *Flavor and fragrance journal*, 20 (6):605-606
- Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z. and benlabed K. (2005) - Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The international journal of Aromatherapy*, 15:129-133.
- Kalembe D. and kunicka A. (2003) - Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
- Kansole M. M. R. (2009) - Etude ethnobotanique phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* Royale ex Benth. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études approfondies (D. E. A) en sciences biologiques appliquées. Université d'Ouagadougou

- Khajeh M., Yamini.,Sefidkom F. and Bahramifar N. (2004) - Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chemistry, 86:587-591.
- Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkom F., Pirmoradei M. R. (2005) - Comparison of essential oil composition of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chemistry, 91:639-644.
- Kilani S., Ben Ammar R., Bouhlel I., Abdelwahed A., Hayder N., Mahmoud A. Ghedira K. and Chekir Ghedira L. (2005) - Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers. Environmental Toxicology and Pharmacology, 20: 478-484.
- Kim S. G., Liem A, Stewart B. C. and Miller J. A. (1999) - New studies on trans-anethole oxide and trans-asaromeoxide. Carcinogenesis, 20: 1303-1307.
- Kongure K., Yamauchi I., Tokumura A., Kondou N., Tanaka N., Takaishi Y., Fukuzawa K. (2004) - Novel antioxidants isolated from plants of the genera *Ferula*, *Inula*, *Prangos*, and *Rheum* collected in Uzbekistan. Phytomedicine, 11: 645-651.
- Koh k. J., Pearce A. L., Marshman G.; Finlay Jones J.J. and Hart P. H. (2002) - Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. British Journal Dermatology, 147: 1212-1217.
- Lafont O. et Duval D. (2001) - Le préparateur en pharmacie. Dossier 1, chimie-biochimie. Edition Tec et Doc., Paris, pp. 126-146.
- Lee C., Chiang L., Cheng L., Liaw C., Abd El-razek M. H. Chang F., Wu Y. (2009) -Influenza A HINI antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. Journal of Natural Products,72: 1568-1572.
- Lee J. H. Choi S., Lee Y. Lee H. J., kim, K. H. Ahn k. S., Bea H., Lee H. J. Lee E. O., Ahn k.S. Rya S. Y., Lü J. and Kim S. H. (2010) - Herbal compound farnesiferol C exerts antiangiogenic and antitumor activity and targets multiple aspects of VEGFR1 (flt1) or (flk1) signaling cascade. Molecular Cancer Therapeutics, 9: 389-399.
- Lhuilier A. ; Fabre N. ; Cheble E. ; Oueida F. ; Maurel S. ; Valentin A. ; Fourasté I. ; Moulis C. (2005)-Daucane sesquiterpènes from *Ferula hermonis*. Journal of Natural Products 68, 468-471.
- Lis-Balchin M. (2002)-Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London. pp. 37-200.
- Lopes N. P., Kat, M. J., Aguiar Andrade H., Soares Maia J. G. and Yoshida M. (1997) -Circadien and Seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. Phytochemistry, 46: 689-693.

- Lu F. and Foo L. Y. (2001) - Antioxidant activity of polyphenols from sauge (*Salvia officinalis*). Food Chemistry, 75: 197-202.
- Lucchesi M. E.; Chemat F. and Smadja J. (2004) - Solvent free microwave extraction of Essential oil from aromatic herbs: Comparison with conventional hydrodistillation. Journal of Chromatography 1043: 323-327.
- Lucchesi M. E. (2005) - Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Docteur en sciences. Discipline - Chimie, Université de la Reunion.
- Lucchesi M. E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W. and Chemat F. (2007) - Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. Journal of Food Engineering, 79: 1079-1086.
- Luicita L. R. (2006) - Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- Madsen H. L., Sorensen B., Skibsted L. H. and Bertelsen, G. (1998)-The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) in dressing Stored exposed to light or in darkness. Food Chemistry, 63:173-180.
- Maggi F., Cecchini C., Cresci A., Coman M. M., Tirillini B., Sagratini G., papa F. (2009) -Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis*) growing in Marche (Central Italy). Fitoterapia, 80: 68-72
- Mann C. M, Cox S.D. and Markham JL. (2000) - The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC. 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Tea tree oil Letters in Applied Microbiology, 30 (4): 294-297.
- Maruyama N., Sekimoto N. and Ishibashi H. (2005) - Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of Geranium essential oil. Inflammatory, 2 : 1-11
- Mengel p., Beh Bellido G.M. and Monpon B. (1993) - VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. Parfums cosmétiques arôme, 114: 66-67.
- Miski M., Ulubeln A., Mabry T. J. (1983) - Six sesquiterpens alcohol esters from *Ferula elaeochytris*. Phytochemistry, 22: 2231-2232.
- Miski M., Mabry T. J., Saya O. (1987) - New Daucane and Germacrene Esters from *Ferula orientalis* Var. Orientalis. Journal of Natural Products, 50: 829-834.
- Mockute D, Bernotiene G. and Judzentiene A. (2001) - The essential oil of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). Phytochemistry, 57: 65-69.

- Mohammedi Z. (2006) - étude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Mémoire de Magister en biologie, Université Aboubaker belkaid de Tlemcen, 155p + annexes.
- Naganuma M., Hirose S., Nakayama V., Nakajima K. and Someya T. (1985) - A study of the phototoxicity of lemon oil. *Archives Dermatology Research*, 278: 31-36.
- Nagatsu A., Iska, K., Kojima, K., Ondognii, P., Zevgeegiin, O., Gombosurengyin, P., Davgii, K., Irfan, B., Iqbal, C. M. and Ogihava Y. (2002) - New sesquiterpene from *Ferula ferulaeoides* (Stend.) Korovin. VI. Isolation and identification of three new dihydrofuro 1 [2, 3-b] chromones. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 50: 675-677.
- Nakatsu T., Lupo A., Chinn J. and Kang R. (2000) - Biological activity of essential oils and their constituents. *Studies in natural products chemistry*, 21:571-631.
- Ohloff G. (1994) - Scent and Fragrances. Springer-verlag. Berlin. 238p.
- Oughlissi-Dehak K., Lawton P., Michalet CB., Darbour SN., Hadji-Mahammed M., Badjah-Hadj A., Dijoux Franca MG. and Guilet D. (2008) - Sesquiterpenes from aerial parts of *Ferula vesceritensis*, phytochemistry 69: 1933-1938 on human colon cancer cell lines. *Phytotherapy Research*, 19: 152-157.
- Oussallah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. (2006) - Antimicrobial activity of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from Meat Science 73:236-244.
- Paena A. T., D'Aquila P. S., Panin F., Pippia P. and Moretti M. D. L. (2002) - Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils, *Phytomedicine*, 9: 721-726.
- Panizzi L., Flamini G., Cioni P. L. and Morelli I. (1993) - Composition and antimicrobial properties of essential oils of four mediterranean Lamiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 39: 169-170.
- Paolini J. (2005)-Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux astéracées endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. Corsicum et *doronicum corsicum*. Thèse de doctorat : Chimie organique et analytique Université de Corse Pascal Paoli. 342p.
- Pauli A. (2001) - Antimicrobial properties of essential oil constituents. *International Journal of Aromatherapy*, 11 : 126-133.
- Paris M and Hurabielle M. (1981) - Abrégé de matière médicale, pharmacognosie. Tome 1, généralités, monographie, édition Masson, Paris, pp. 177-237.

- Pellerin P. (1991) - Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavour and perfume industry. *Perfum. Flavor*, 16, 14, 37-39.
- Pibiri. M. C. (2006) - Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen des huiles essentielles. Thèse en sciences Lausanne, EPEL. 177p.
- Pimenov, M. G., Leonov, M. V., Pfeiffer, L., Mabberley, D. J., Drude, O. (1993) - The genera of the Umbelliferae: a nomenclator. Royal Botanical Garden, Kew.
- Poli F., Appendino G., Sachetti G., Ballero M., Maggiano N. and Ranalletti FO (2005) - Anti proliferative effects of daucane esters from *Ferula communis* and *Ferula arrigonii* on human colon cancer cell lines. *Phytotherapy Research*, 19(2):152-7.
- Porter N. (2001) - Essential oils and their production. *Crop & Food Research*. Number 39.
- Que S., Lunchun M. and Xin P. (2006) - Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds, *Foods Research International*, 39: 581-587.
- Quezel P. et Santa S (1962)-Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS, Paris, p. 672.
- Quezel P. et Santa S. (1963)-nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome II. Ed. C.N.R.S. Paris.
- Radulovic N. M., Misic M., Aleksi j., Dokovic D., Palic R. and Stojanovic G. (2007) -Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* Essential oil. *Fitoterapia*, 78: 565-570.
- Rai M.K., Acharya D. and Wadegaonkar P. (2003) - Plant derived antimycotics: potential of asteraceous plants, In *plant-derived antimycotics: Current Trends and Future Prospects*, Haworth press, N-York, London, Oxford. pp. 165-185.
- Regnier T., Plooy W. D., Combrinck S. and Botha B. (2008) - Fungitoxicity of *Lippia scaberrimma* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 48: 254-258.
- Richard H. (1992) - Epices et Aromates. Technologie et documentation Lavoisier. Paris. p. 339.
- Robert G. (2000) - Les sens du parfum. Osman Eroyller Multimedia. Paris. 224p.
- Rossi P G., Bao L., Luciani A., Panighi J., Desjobert J M., Costa J., Casanova J., Bolla JM. and Bertil. (2007) - (E) - Methylisoeugenol and elemici: antibacterial components of *Daucus carota* L. Essential oil against *Campylobacter jejenu*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7332-7336.
- Rosua J. L. et Granados A. G. (1987) - Analyse des huiles essentielles d'espèces du genre *Rosmarinus* L. et leur intérêt en tant que caractère taxonomique. *Plantes Médicinales et phytothérapie*, XXI (2) : 138-143.

- Rubiolo p., Matteodo, Riccio G., Ballero, M., Christen p., Fleury-Souverain S., Veuthey J. L. and Bicchi C. J. (2006) - Analytical discrimination of poisonous and nonpoisonous chemotypes of giant fennel (*Ferula communis* L) through their biologically active and volatile fraction. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7556-7563
- Salle J. L. et Pelletier J. (1991) - Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Edition Frison-Roche, pp. 19-45.
- Sanchez-Moreno C. (2002) - Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological system. *International Journal of Food Science and technology*, 8: 121-137.
- Sartoratto A. Machado A. L. M. Delarmelina C., Figueira G. M., Cristina M., Duarte T., Rehder V. L. G. (2004) - Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35:275-280.
- Schuller p. (1990)-Natural antioxidants exploited commercially. Ed Hudson, *Bibliography of Brian Journal, Food Antioxidants*: 99-113.
- Sefidkom F., Abbasi K. Jamzad Z. and Ahmadi S. (2007) - The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food chemistry*, 100 (3): 1054-1058.
- Shapiro S., McIver A. and Guggenheim B. (1994) -The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 9: 202-204.
- Sharma S., Sangwan N. S. and Sangwan R. S. (2003) - Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current Science*, 84 (4): 544-550.
- Shatar S. (2005) - Essential oil of *Ferula ferulaoides* from western Mongolia. *Chemistry of Natural Compounds*, 19 :425-428.
- Simpson William T. (1999) - *Drying and control of Moisture Content and Dimensional Changes General. Technical. Reports. FPL-GTR-113. Madison, Forest Products Laboratory 463p.*
- Singh S. B. and Barret J. F. (2006) - Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*, 71:1006-1015.
- Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T. and Arsenakis M. (1995) - Antimicrobial activity mint essential oils. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 43 (9): 2384-2388.
- Smith C. K., Moore C. A., Alahi E. N., Smart A. T. and Hotchokiss S. A. (2000) - Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168: 189-99.

- Stahl E. (1975) - Analyse chromatographique et microscopique des drogues. Manuel pratique pour les pharmacopées européennes. Entreprise moderne d'édition technique et documentation, Paris, pp. 13-36.
- Staniszewska M., Kula J., Wieczorkiewicz M., Kusewicz D. (2005) - Essential Oils of Wild and Cultivated Carrots - the chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research*, 17 (5): 579-583.
- Suzuki, K., Okazaka, M., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., Ashurmetov, O., Sekiya, M. and Ikeshiro Y. (2007) - Sesquiterpenes lactones from the roots of *Ferula varia* and their cytotoxic Activity. *Journal of Natural products*, 70: 1915-1918.
- Svoboda k. P. and Hampton J. B. (1999) - Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities ([http:// www.csl.gov.uv/ienica/seminars](http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars))
- Talebi K E., Naghavi MR., Alayhs M. (2008) - Study of the essential oil of variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 44:1.
- Tamemoto K., Takaishi Y., Kawazoe K., Honda G., Ito M., Kuichi F., Takeda Y., Kodzhimatov O. K., Ashurmetov O., Shimizu K., Nagazawa H., Uta Y., Hori H. (2002)- An Unusual sesquiterpene derivative from *Ferula kihistanica*. *Journal of Natural Product* 65, 1323-1324.
- Thompson J. D., Chalchat J. C., Michet A., Linhart y. B. and Ehlers B. (2003) - Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype. *Journal of Chemical Ecology*, 29: 859-880.
- Twidwel E. K, wagner J. J. and Thiex Nancy J. (2002)-Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. Ex 8077. p2.
- Ultée A., Slump R. A., Steging G., Smid E. J. (2002) - Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, 63:620-624.
- Valnet J. (1984) - Aromathérapie, traitement des maladies par les essences de plantes. 1^{ère} édition, éditeur Maloine S. A, Paris, 544p.
- Vasconcelos Silva M. G, Craveiro A. A., Abreu Matos F. J., Machado M. I. L. and J. W. Alencar (1999) - Chemical variation during daytime of constituents of the essential of *Ocimum gratissimum*. *Fitoterapia*, 70: 32-34.
- Villano D., Fernandez-Pachon M. S., Moya M. L., Troncosa A. M., Garcia-Parrila M. C. (2007) - Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71:230-235.

- Viljoen A.M., Denirci B., Baser K.H.C, C.J. and Edwards T.J. (2006) - Microdistillation and essential oil chemistry- a useful tool of detecting hybridization in *Plectranthus* (Lamiaceae). South Africa Journal of Botany, 72:99-104.
- Wang K., Hiruki et Chem M. H. (1998)-Identification of a phytoplasma causing yellows of Monarda. Plant pathology, 47: 103-106
- Wang S. Y., Wu J. H., Shyur L. F., Kuo Y. H. and Chang S.t. (2002) - Antioxidant Activity of Abietane-type diterpènes from Heartwood of Taiwania Cryptomerioides Hayata. Holzforschung. 65 (5).
- Weening G., Shufen L., Ruixiang y., Shaokun T. and Can Q. (2007) - Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food Chemistry, 1001: 1558-1564
- Wichtl M. et Anton R. (1999) – plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, Sciences et thérapeutique, édition Lavoisier, France.
- Wiseman R. N., Miller, E. C., Liem A. (1987) - Structure-activity Studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrol on administration preweanling male C57BL/6JxC3H/HeJF1 mice. Cancer Research, 47: 2275-2283.
- Yang J., An Z., Li Z., Jing S., and Quina H. (2006) - Sesquiterpenes coumarins from the roots of *Ferula sinkiangensis* and *Ferula teterrima*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 54: 1595.
- Zellagui A., Gherraf N. and Rhouati S. (2012) - Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* Coss. et DR. leaves, endemic in Algeria. Organic and Medicinal Chemistry Letters 2:31.
- Zhou P., Takaishi Y., Duan H., Chen B., Honda G., Itoh M., Takeda Y., Kodzhimatov O.K. and Lee K-H. (2000) - Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. Phytochemistry, 53 (6): 689-697
- Zohreh H., Peyman S., Yousefi M., Hejazi Y., Laleh A., Mozaffarian V., Masoudi S., Rustayan A. (2006) - Chemical composition and Antimicrobial Activity of the essential oils of *Ferula latisecta* and *Mozaffarianio inignis* from Iran. Chemistry of Natural Compounds, 42:6.

المراجع باللغة العربية

- أبو زيد ن. ح. (1988) – النباتات العطرية ومنتجاتها الزراعية والدوائية. الدار العربي للنشر والتوزيع، القاهرة، 472 صفحة.
- أبو زيد ن. ح. (2000) – الزيوت الطيارة. الدار العربي للنشر والتوزيع، القاهرة، 395 صفحة.
- هيكل م ؛ عمر ع. ع. - (1993) – النباتات الطبية والعطرية . كميؤها، انتاجها وفوائدها. منشأة المعارف بالإسكندرية.

Annexes I : Composition des milieux de culture

1) Bouillon nutritif

- Peptone5g
- Extrait de viande1g
- Extrait de levure2g
- Chlore de Sodium5g
- Eau distillée q. s. p.....1000 ml

2) Mueller Hinton Agar

- Infusion de viande de bœuf.....300g
- Hydrolysate de caséine.....17,5g
- Amidon de maïs.....1,5g
- Agar Agar.....1,3g
- Eau distillé.....1000ml

3) Milieu Sabouraud Simple

- Peptone chapoteau.....10g
- Gélose.....20g
- Glucose.....20g
- Eau distillée q. s.p.....1000 ml

4) Milieu Sabouraud+ Chloramphenicol

- Milieu Sabouraud Simple
- Chloramphenicol.....0,5g

5) Milieu Sabouraud + Chloramphénicol+ Actidione

- Milieu Sabouraud.....0,5g
- Actidione.....0, 5g

6) Mueller Hinton additionné de sang (gélose au sang)

- Mueller Hinton Agar
- Sang de cheval lysé.....2 à 5%

Les antibiotiques testés

Familles	Antibiotiques	Sigle	Charge du disque (µg)
Pénicillines	Pénicilline	P	6
	Ampicilline+ Amoxilline	AM	10
	Amoxilline+ac clavulanique	AMC	10
	Ticarcilline	TIC	75
	Pipercilline	PIP	75
	Oxacilline	OX	5
Céphalosporines	Cefazoline	CZ	30
	Ceftazidine	CAZ	30
Monobactame	Kanamycine	ATM	30
Aminosides	Kanamycine	K	30 UI
	Terramycine	TM	10
	Gentamicine	GM	10
	Netimicine	NET	30
Macrolides	Erythromycine	E	15 UI
	Lincomylène	L	15
Tétracycline	Doxyculéne	DO	30 UI
Nitroferanes	Furanes	FT	300
Quinolones	Ofloxacine	OFX	5
Divers	Rifampicine	RA	30
	AC fusidique	FA	10
	Vancomycine	VA	30

Les antifongiques standards testés

Antifongiques	Sigle	Charge du disque (µg)
Amphotéricine B	AB	100
Clotrimazole	CTR	50
Nystatine	NY	100

ملخص

نظرا للزيادة الكبيرة لظاهرة المقاومة ومحدودية المضادات الحيوية التي هي مرحلة لتطور، فإن اكتشاف مضادات جديدة، أصبح أكثر من ضرورة. بالإضافة إلى تقادي تبعيات الكرب التأكسدي، فمن الضروري إعادة التوازن التأكسدي / المضاد التأكسدي. إن الفحص الاختباري (الغزبله) للزيوت الأساسية يسمح باكتشاف مضادات بكتيرية جديدة و مضادات أكسدة التي يمكنها أن تمثل بديل للمضادات الحيوية المستعملة وكذلك لمضادات الأكسدة التقليدية. دراستنا تساهم في معرفة القدرة المضادة للأكسدة والمضادة للبكتريا للزيوت الأساسية العطرية من عائلة Apiacées (الخبمية) والمتمثلة في *Ferula vesceritensis*، *Balansea glaberrima*. تم استخلاص الزيوت الأساسية بتقنية التقطير المائي أما التركيب الكيميائي فتم تحديده بواسطة كروماتوغرافيا الغازية إلى جانب قياس الطيف الكتلي CPG/MS. وتم التعرف على مركبين بنسبة عالية في الزيت الأساسي لـ *Ferula Vesceritensis* وهما α -pinene (28.57%) ؛ *l'aristoléne* (24.63%) . أما بنسبة للزيت الأساسي لنبته *Balansea glaberrima* فتم التعرف على ثلاثة مركبات بنسب عالية. c(36.65%)، Valen، l'apiole(34.87%) و γ -murooléne (9.83%). نتائج النشاط المضاد للبكتيريات المنجز مخبريا بطريقة الانتشار في هلام الجيلوز بين تأثير الزيوت الأساسية لنبته *Ferula Vesceritensis* اتجاه 2 *S.aureus* ATCC و *B. subtilis* ATCC 6633. إن الزيوت الأساسية المستخلصة من نبات *Balansea glaberrima* ليست فقط مثبته اتجاه السلالتين الأخيرتين بل أيضا اتجاه *E. coli* ATCC.25922 إن القدرة المضادة للجذور الحرة للزيوت الأساسية تم تحديدها بمعايرة (DPPH). في الحقيقة الزيتين الأساسيين أظهر تأثير مضاد للجذور ضعيف بالمقارنة مع BHT مع $IC_{50}=9136.93 \mu\text{g/ml}$ لنبته *F. vesceritensis*؛ $IC_{50}=7440.68 \mu\text{g/ml}$ لنبته *B. glaberrima* و $IC_{50}=41.35 \mu\text{g/ml}$ لـ BHT. **كلمات المفاتيح:** *Balansea glaberrima*، *Ferula vesceritensis*، الزيوت الأساسية، النشاطية المضادة للبكتيريا و المضادة للأكسدة (DPPH).

Resumé

Vu la propagation du phénomène de résistance et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Ainsi Pour échapper aux conséquences du stress oxydatif, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant/antioxydant. Le criblage des huiles essentielles permet de découvrir de nouveaux antibactériens et antioxydants qui pourraient constituer une alternative à l'usage des antibiotiques et antioxydants conventionnels. Notre étude contribue à la connaissance des potentiels antioxydants et antibactériens des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la famille des Apiacées à savoir *Ferula vesceritensis* et *Balansea glaberrima*. Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation et leur composition chimique a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CPG/MS. L' α -pinène (28,57%) et l'aristolène (24,63%) sont les composés majoritaires de l'HE de *F. vesceritensis* par contre valencene (36,65%), l'apiole (34,87%) et γ -morolène (9,83%) sont les composés majoritaires de l'HE de *B. glaberrima*. L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée sur neuf souches bactériennes et trois champignons. Les résultats de l'activité antimicrobienne réalisée *in vitro* par la méthode de diffusion sur milieu gélosé montrent l'effet de l'HE de *F. vesceritensis* vis-à-vis de *S. aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633. L'HE de *B. glaberrima* est non seulement active vis-à-vis de ces deux dernières souches mais aussi sur *E. coli* ATCC 25922 de même contre *A. flavus* NRRL 391 qui s'est montrée sensible. Contrairement à *C. albicans* ATCC 1024 qui a été faiblement inhibé par l'HE de *F. vesceritensis*. Le potentiel antiradicalaire des HE a été déterminé par la méthode de DPPH. En effet les deux huiles ont montré un effet antiradicalaire trop faible par rapport à celui du BHT : les IC_{50} de *B. glaberrima*, *F. vesceritensis* et du BHT sont respectivement: $9136,93 \mu\text{g/ml}$, $7440,68 \mu\text{g/ml}$, $41,35 \mu\text{g/ml}$.

Mots clés: *Ferula vesceritensis*, *Balansea glaberrima*, huiles essentielles, CPG/SM, activités antibactérienne et antioxydante.