



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ «Abbès LAGHROUR» DE KHENCHELA  
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE



Département de sciences de matière

## Mémoire de fin d'études

*Pour l'obtention du diplôme de Master (L.M.D)*

Filière : chimie

Spécialité : chimie analytique

Thème

**Enthnopharmacologie d'origanum vulgare  
L.subsp.glandulosum (Desf) et composition  
chimique et activité anti-oxydantes**

**Réalisé par :** -Zitouni Hanane  
- Guerrab Hakima

*Encadré par : Mme Baaziz Sonia*

**Membres de jury :**

*Présidente : Mme Lamraoui Hanane*

*MAA université de khenchela*

*Encadratrice : Mme Baaziz Sonia*

*MAA université de khenchela*

*Examinatrice : Mme Radjhi Lamia*

*MAA université de khenchela*

*Présenté le : 30/06/2019*

**2018/2019**



# *Remerciement*

*Avant toutes choses, nous remercions dieu qui nous a donné le courage, la santé et la patience pour faire ce travail.*

*Tout d'abord, nous tenons à remercier notre encadratrice **M<sup>me</sup> Baaziz Sonia** de notre profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail et mes remerciements pour sa présence permanente.*

*Nos remerciements vont aussi aux membres de jury Lamraoui Hanane , Radjhi Lamia de nous avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.*

*Nous remercions infiniment tous les membres de laboratoire de chimie de L'Université*

*Abbas Laghrour de Khenchela surtout **M<sup>me</sup> Najwa** et **M<sup>me</sup> sharfi** pour leur aide Précieuse.*

*Enfin, Nous souhaitons remercier toutes personnes qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, leur soutien et avis judicieux de la mener à bien.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modest travail à mon*

*très chère père*

*qui m'a toujours soutenu, et qu'a été*

*toujours présent pour*

*moi*

*A la plus chère au monde*

*ma mère qui a*

*toujours m'encouragé durant*

*mes études*

*A mon frère farid et sa femme*

*A mes sœurs et leur mari*

*A ma Petite famille*

*pour les fils des frères Nour el Houda, Loujain*

*Abdou ,Ala el Rahaman*

*A toues mes amies et camarades*

*Atout personne qui me connait*

*Hakima*



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à mon  
très chère père  
qui m'a toujours soutenu, et qu'a été  
toujours présent pour  
moi*

*A la plus chère au monde  
ma mère qui a  
toujours m'encouragé durant  
mes études*

*A mes frère*

*A mes sœurs*

*A ma Petite famille*

*Aux enfants de mes frères*

*A toutes mes amies et camarades*

*A toute personne qui me connaît*

*Hanane*



## Liste des abréviations

**MeOH:** Méthanol.

**H.E:** Huile essentielle.

**CCM:** Chromatographie sur couche mince.

**UV:** Rayonnement Ultra violet.

Association Française de Normalisation

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

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

**FRAP:** ferric reducing antioxidant power

**IR:** infrarouge

**TEAC :** la capacité antioxydante en équivalent trolox

**ORAC :** capacité d'absorption des radicaux libers

**(V/V) :** Volume/ Volume

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Photographie d'O.glandulosum.	05
<b>Figure 02</b> : Aire de distribution.	06
<b>Figure 03</b> : Les différents stades de développement de l'origan.	07
<b>Figure 04</b> : Structure de base des flavonoïdes.	10
<b>Figure05</b> : Structure de flavonol et flavone.	11
<b>Figure06</b> : Structure de flavanone.	11
<b>Figure 07</b> : Structures des stéroïdes (A) et stérols (B)	12
<b>Figure 08</b> : La structure de tanins hydrolysabl.	13
<b>Figure 09</b> : La structure de tanins condensés.	13
<b>Figure 10</b> : Structure de quelques alcaloïdes.	14
<b>Figure 11</b> : Structure de base des saponines.	16
<b>Figure 12</b> : Squelettes de spirostane stéroïdien (A), furostane stéroïdien (B).	17
<b>Figure13</b> : Squelette de saponine triterpénoïde	17
<b>Figure 14</b> : structure de base des coumarines.	18
<b>Figure 15</b> : Structure de base de l'isoprène.	19
<b>Figure 16</b> : Méthodes d'extraction des huiles essentielle.	23
<b>Figure17</b> : Entraînement à la vapeur d'eau.	24
<b>Figure 18</b> : schémas des étapes de l'hydro-distillation.	25
<b>Figure 19</b> : procédé Enfleurage.	25
<b>Figure20</b> : procédé par CO <sub>2</sub> supercritique.	26
<b>Figure 19</b> : Extraction assisté par micro-onde.	27
<b>Figure 20</b> : L'extraction par solvants volatils.	28
<b>Figure 21</b> : Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM.	30
<b>Figure 22</b> : Forme libre et réduite du DPPH°	36
<b>Figure23</b> : Feuilles des plantes après séchage de Origanum vulgare L. subsp. glandulosum (Desf)	39
<b>Figure 24</b> : broyage d'Origanum vulgare L. subsp. glandulosum (Desf).	40
<b>Figure 25</b> : Dispositif d'hydrodistillation utilisé à l'échelle du laboratoire.	40
<b>Figure 26</b> : distillat et solvant (Dichlorométhane).	41
<b>Figure 27</b> : sodium de sulfate ( Éliminer les traces d'eau)	41
<b>Figure 28</b> : décantation.	41

<b>Figure 29:</b> Filtration de la phase Organique.	41
<b>Figure30 :</b> évaporation le solvant	41
<b>Figure31:</b> Huile essentielle d'Origanumvulgare L. subsp. glandulosum (Desf).	42
<b>Figure 32 :</b> Protocole expérimental d'extraction des huiles essentielles.	42
<b>Figure33 :</b> chromatographie sur couche mince.	44
<b>Figure34 :</b> Révélation de la plaque de CCM par la lampe UV aux longueurs d'onde 365nm.	45
<b>Figure 35:</b> Le spectro-FTIR	45
<b>Figure36 :</b> filtration de mélange.	46
<b>Figure 37:</b> Evaporation le filtrat.	47
<b>Figure 38:</b> extraction méthanoïque	47
<b>Figure 39 :</b> spectrophotomètre.	50
<b>Figure 40 :</b> Protocole de réduction de radical DPPH	51
<b>Figure 41:</b> Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne.	54
<b>Figure 42 :</b> préparé les disques.	55
<b>Figure 43 :</b> la coulée des boites de pétrie.	55
<b>Figure 44 :</b> boites continu gélose.	55
<b>Figure 45 :</b> les souches utilisées.	55
<b>Figure46 :</b> spectre FTIR d'huile essentielle.	58
<b>Figure 47:</b> Test d'identification des Flavonoïdes	58
<b>Figure 48 :</b> Test d'identification des stéroïdes et triterpénoïdes.	59
<b>Figure 49 :</b> Test d'identification des Tanins.	59
<b>Figure 50:</b> Test d'identification des Alcaloïdes.	59
<b>Figure51:</b> Test d'identification des saponosides.	60
<b>Figure52 :</b> Test d'identification des Coumarines.	60
<b>Figure53:</b> Activité antioxydante sur plaque CCM.	61
<b>Figure 54 :</b> Pourcentage d'activité antioxydante des huiles essentielles d'Origanum glandulosum.	62
<b>Figure 55 :</b> Diamètre des zones d'inhibition.	63
<b>Figure56 :</b> Activité antibactérienne d'huile essentielle d'origanum glandulosum.	64

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Composition chimique de l'huile essentielle d'O.glandulosum.	08
<b>Tableau 02:</b> Différentes structures chimiques des coumarines.	18
<b>Tableau 03 :</b> Quelques tests d'évaluation de l'activité antioxydante .	35
<b>Tableau04 :</b> Caractérisation d'HE d'O .glandulosum .	56
<b>Tableau 05:</b> Rendement d'HE d'O .glandulosum	56
<b>Tableau 06 :</b> les résultats de chromatographiques sur plaque CCM.	57
<b>Tableau 07 :</b> spectre FTIR d'huiles essentielle d'O .glandulosum .	58
<b>Tableau 08:</b> Analyse phytochimique préliminaires d'O .glandulosum .	60
<b>Tableau 09:</b> Activité antioxydante des huiles essentielles d'Origanum glandulosum.	62
<b>Tableau10 :</b> zone inhibition (mm) pour les huiles essentielles d'Origanum glandulosum.	63

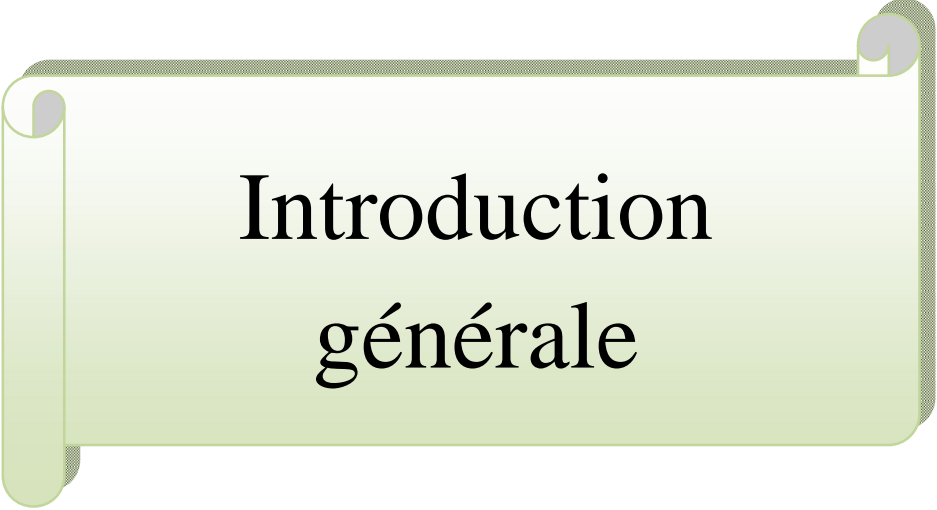
## Sommaire

Liste des Abréviations .....	i
Liste des figures .....	ii
Liste des tableaux .....	iv
Introduction générale .....	01
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
Chapitre I : Aperçu bibliographique de plante étudiée	
Introduction .....	03
I. Famille Lamiaceae .....	03
I .1.Origanum vulgare L. subsp. glandulosum (Desf.) Ietswaart .....	04
I .2.Classification botanique .....	05
I.3.Région de l'existence.....	06
I.4. Description de l'espèce Origanum glandulosum Desf .....	06
I.5. Propriétés et usages .....	07
I.6. Composition chimique .....	08
I.7. Utilisation en médecine traditionnelle .....	08
II .Les métabolites secondaires .....	08
II .1.Les flavonoïdes .....	09
II.1.2. Définition .....	09
II .1.3. Structure des flavonoïdes .....	09
II.1.2.Classification des flavonoïdes .....	10
II .2. Les stéroïdes et les stérols .....	11
II .3. Les tanins .....	12
II .3.1 . Les tanins hydrolysables .....	12
II .3.2. Les tanins condensés .....	13
II .4 .Alcaloïdes .....	14
II .4 .1. Fonctions et propriétés .....	1
II .5. LES SAPONINES .....	15
II .5.1 Définition .....	15
II .5. 2 Classification des saponines .....	16
II .5. 2 .1 Saponines stéroïdes (ou stéroïdiques) .....	16

II .5. 2 .2 Saponines triterpènes .....	17
II .6. Les coumarines .....	18
II .6.1. Différentes classes de coumarines selon leurs structures .....	18
II .7 Les terpenoïdes .....	19
II .7 .1.Classification des terpènes .....	20
II .7 .1. 1. Hémiterpènes .....	20
II .7 .1.2. Diterpènes .....	20
II .7 .1.3. Monoterpènes .....	20
Chapitre II: les Huiles essentielles	
Introduction .....	21
I. Les huiles essentielles .....	21
I.1.Définition des huiles essentielles .....	21
I.2. Répartition et localisation .....	22
I.3. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles .....	22
I. 4. Propriétés biologiques des huiles essentielles .....	22
I. 5.Toxicité des huiles essentielles .....	23
II. Méthodes d'extraction des huiles essentielles .....	23
II.1.Distillation .....	24
II.2. Entraînement à la vapeur d'eau .....	24
II.3. L'hydro-distillation .....	24
II.4. Enfleurage .....	25
II.5. Extraction par ultrasons .....	26
II.6. Extraction par CO <sub>2</sub> super critique .....	26
II.7. Extraction assistée par micro-onde .....	27
II.8.L'extraction par solvants volatils .....	27
II.9. L'expression .....	28
II.10. Incision .....	29
III. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles .....	29
III.1. Chromatographie sur couche mince .....	29
III.2. Chromatographie en phase gazeuse .....	30
III.3Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM) .....	30
III.4. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....	31

III.5. La spectroscopie infrarouge .....	31
III.6. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN .....	31
Chapitre III: Activités biologiques étudiées	
Introduction .....	32
I .Activité antioxydante .....	32
I.1. Radicaux libres et stress oxydatif .....	32
I.2. Activité antioxydant et les antioxydants .....	33
I.3.Types d'antioxydants .....	34
I .4.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante .....	35
I.5. test DPPH .....	36
II. Activité antimicrobienne .....	37
II.1.Evaluation de l'activité antibactérienne .....	37
II.2.Souches bactériennes utilisé .....	37
Partie Expérimentale	
Chapitre IV : Matériel et méthodes	
I.L'objectif de l'étude .....	39
II.1. Matériels .....	39
II.1.1 Matériels végétal .....	39
II.2. extraction les Huiles essentielles.....	40
II.2.1. l'hydrodistillation.....	40
II.2.2. Caractères d'huile essentielle.....	43
II.2 .3.Calcul de rendement .....	43
III.1. Analyses des huiles essentielles .....	43
III.1.1.Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	43
III.1.2. Matériel .....	44
III.2. Spectroscopie Infrarouge (IR) .....	45
IV.1.Tests phytochimiques.....	46
IV.1.2. Détection des flavonoïdes .....	48
IV.1.3.Détection des stéroïdes et triterpénoïdes.....	48
IV.1.4. Détection Des Tanins.....	48
IV.1.5. Détection des alcaloïdes .....	48
IV.1.6. Détection des saponosides.....	48
IV.1.7. Détection des coumarines.....	49

V. l'activité biologique .....	49
V.1 .l'activité antioxydante.....	49
V.1.2.Evaluation de l'activité antioxydante .....	49
V.1.3.Dépistage de l'activité antioxydant sur CCM à l'aide du DPPH.....	49
V.1.4.Test de piégeage du radical libre DPPH .....	50
V .1.4.1.Mode opératoire .....	50
V .1.4.2.Expression des résultats.....	52
V.2. L'activité antibactérienne .....	53
V. 2.1 Mode opératoire.....	53
Chapitre V: Résultat et discussion	
I.1. EXTRACTON DES HUILES ESSENTIELLES .....	56
I.1.1. Caractérisation d'huiles essentielles.....	56
I.2.2.Le rendement de l'HE .....	56
II.1Analyses des huiles essentielles .....	57
II.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	57
II.1.2. Interprétation des analyses infra rouge des huiles essentielles .....	57
III.1.Tests phytochimiques.....	58
III.1.1. Flavonoïdes .....	58
III.1.2. stéroïdes et triterpénoïdes .....	58
III.1.3. Tanins .....	59
III.1.4. Alcaloïdes .....	59
III.1.5. saponosides .....	60
III.1.6. Coumarines .....	61
IV.ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES.....	61
IV. 1. Evaluation de l'activité antioxydante .....	61
IV .1.1.Test DPPH sur plaque CCM.....	61
IV.1.2. Test DPPH mesuré au spectrophotomètre.....	61
IV.2.Evaluation de l'activité antibactérienne.....	63
Conclusion Générale.....	65



# Introduction générale

*Si vous n'échouez jamais ... vous échoué  
aussi longtemps que vous essayez de vous  
relever.*

**L**e concept d'ethnopharmacologie n'a jamais quitté la découverte de nouveaux médicaments, car c'est une source inépuisable. C'est une discipline qui s'intéresse aux médecines traditionnelles et aux remèdes constituant les pharmacopées traditionnelles. Elle a comme objectifs de recenser partout dans le monde les savoirs traditionnels, notamment là où la tradition est orale, car la transmission de la connaissance est entravée à la fois par la perte d'intérêt du métier de guérisseur et par la non reconnaissance du métier, voire son interdiction pour exercice illégal de la médecine.

Guidées par les usages empiriques des plantes, les études ethnopharmacologiques ont apporté à l'humanité plus de 60% de ses médicaments. Située à la croisée des sciences de l'homme et de la nature, l'ethnopharmacologie a su développer des méthodologies originales, alliant tradition et modernité qui lui ouvrent des perspectives prometteuses. Comme l'idée d'associer l'ethnopharmacologie à la chimie verte, une des sciences innovantes qui donne l'impression d'un retour au naturel<sup>1</sup>.

Les plantes aromatiques ont l'aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires en réponse aux stress biotique et abiotique qu'elles peuvent subir. Ces métabolites secondaires possèdent diverses propriétés biologiques. Les huiles essentielles et les polyphénols font partie de ce groupe de métabolites.

Au cours de ces dernières années, nous assistons à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus de procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale<sup>2</sup>.

Dans ce but, l'utilisation des plantes représente un potentiel inestimable pour la recherche de nouvelles substances à pouvoir antimicrobien et antioxydant. Ainsi les huiles essentielles et les extraits organiques, notamment les polyphénols, suscitent un intérêt croissant comme source potentielle de molécules naturelles bioactives pouvant être employées comme alternatives à certaines substances synthétiques.

---

<sup>1</sup> Fleurentin J. (2012) L'Ethnopharmacologie au Service de la Thérapeutique: Sources et Méthodes, Hegel, 2, 12-18.

<sup>2</sup> Wang W., Wu N., Zu Y.G. & Fu Y.J., 2008. Antioxydative activity of *Rosemarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. Food chem. 108: 1019-1022.

L'Algérie est considérée comme un pays riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes. Ces plantes aromatiques sont à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...) qui se présentent presque souvent comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation<sup>3</sup>.

L'extraction des huiles essentielles et leurs caractérisations ainsi que l'évaluation des activités biologiques (antibactérienne et antioxydante) ont été réalisés au laboratoire de l'université Abbes Laghrour khenchela.

Ces travaux sont décrits dans le présent manuscrit qui est composé de deux parties. La première partie, consacrée à l'étude bibliographique, comprend trois chapitres :

- Le premier est une description botanique générale des espèces étudiées (*Origanum vulgare* L.subsp. *glandulosum* (Desf)), leurs répartitions géographiques, composition chimique, utilisation en médecine traditionnelle et métabolite secondaire.
- Le deuxième chapitre donne un aperçu sur les huiles essentielles, Caractères physico-chimiques, localisation, répartition, procédés d'extraction et les méthodes d'analyse.
- Et le troisième chapitre est un rappel sur les activités biologiques étudiées.

La partie expérimentale est axée sur :

- L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation et leurs analyses par CCM, IR respectivement.
- Les tests phytochimique de plantes étudiée,
- la mise en évidence in vitro du potentiel antioxydant des huiles essentielles par le test du piégeage du radical libre DPPH.
- Et enfin, Une étude biologique in vitro visant à évaluer le pouvoir antibactériens des huiles essentielles. Les tests antibactériens sont réalisés sur 4 souches bactériennes responsables d'infections nosocomiales et d'intoxications alimentaires

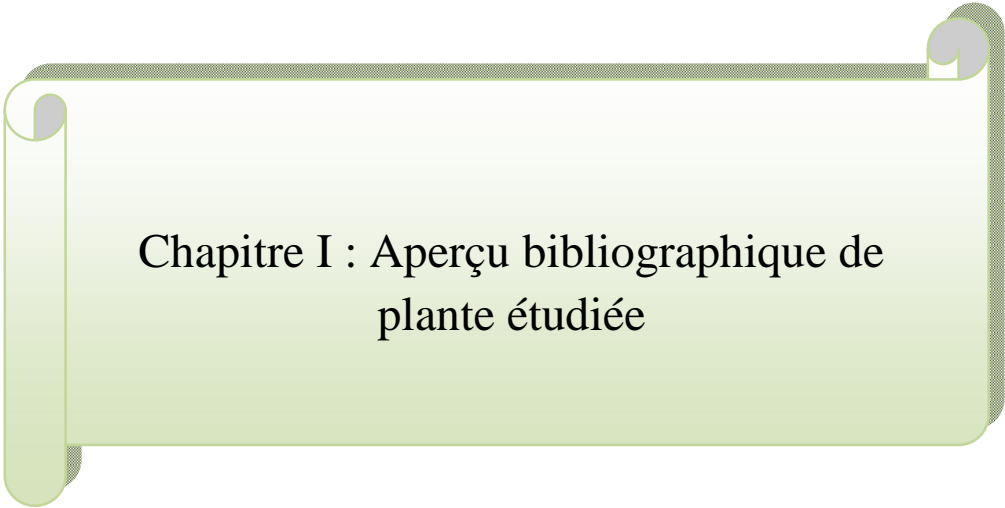
Les résultats obtenus sont ensuite amplement discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion présentant une synthèse des résultats obtenus avec les perspectives envisagées, la liste des références bibliographiques.

---

<sup>3</sup> Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

# Parti bibliographe

*Aucun mot n'est impossible ...seulement  
dans le dictionnaire des faibles.*



## Chapitre I : Aperçu bibliographique de plante étudiée

*La vie est pleine de pierres, ne tombez  
donc pas dessus, ramassez-la construisez une  
échelle ou vous pourrez monter au sommet.*

**Introduction :**

**L**a région méditerranéenne, d'une manière générale, et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales.

La production des huiles essentielles à partir de ces plantes pourrait constituer à ce titre une source économique importante pour notre pays.

Les plantes médicinales Algériennes méritent une attention particulière. Il existerait en effet 3139 espèces décrites par Quézel et Santa (1962) dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Zeraia (1983) dénombre 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques<sup>1</sup>.

Les métabolites secondaires végétaux constituent une classe extrêmement large de substance naturelle qui intervient de façon déterminante dans l'adaptation des plantes à leur environnement. Outre leurs implications dans le fonctionnement des végétaux, ces molécules représentent une source importante de substances intéressantes pour l'Homme tel que les huiles essentielles, les terpenoïdes, les composés phénoliques et les flavonoïdes. Leurs applications concernent des domaines aussi variés tels que les principes actifs pharmaceutiques, les produits cosmétiques et les additifs alimentaires<sup>2</sup>.

**I .La famille des Lamiacées :**

Il s'agit de l'une des principales familles de plantes dicotylédones, qui comprend environ 258 genres et 6900 espèces plus ou moins cosmopolites, mais particulièrement répandues depuis le Bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale . Les Lamiacées sont le plus souvent des plantes herbacées, annuelles ou vivaces aromatiques, des sous-arbrisseaux et rarement des arbres ou des lianes. La section des tiges est carrée et les feuilles opposées parfois verticillées. Les fleurs sont généralement bilabiées, à corolle irrégulière, possédant quatre étamines dont deux sont longues et deux sont courtes. De plus, les Lamiacées comptent beaucoup d'espèces cultivées comme condiments (ex. sauge, thym, basilic, menthe etc.). Par ailleurs, cette famille est une source importante d'huiles essentielles pour l'aromathérapie, la

<sup>1</sup> Botineau M., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp: 1021-1043.

<sup>2</sup> Croteau .R. Kutchan ;T .M and Norman .G. L., (2000 ).Natural products ( seconderymetabolits ).American society of plant physiologists 24 :1250 -1318.

parfumerie et l'industrie des cosmétiques. Enfin, de nombreuses espèces sont utilisées en horticulture, notamment parmi les genres *Phlomis*, *Perovskia* et *Salvia*<sup>3</sup>.

### **I.1. *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart :**

Le terme français apparaît au XIII<sup>ème</sup> siècle. En le décomposant étymologiquement, on trouve *oros*, la montagne et *ganos*, éclat, aspect riant, d'où la signification « qui se plaît sur la montagne ». En effet, l'origan ornait les montagnes méditerranéennes en abondance et assurait leur beauté.

Le genre *Origanum* comprend environ 70 espèces, sous-espèces, variétés et hybrides, caractérisés par une extrême variabilité dans leurs caractères morphologiques (longueur de la tige, arrangement, nombre et longueur des branches, formes des feuilles,...).

Les membres du genre sont principalement distribués le long de la région de la Méditerranée. Tandis que 75 % d'entre eux sont limités à la Méditerranée orientale, seulement quelques espèces existent dans la partie occidentale de la Méditerranée.

*Origanum vulgare* L. (origan) étant l'espèce la plus répandue et la plus connue de la famille des Lamiacées l'une de ses sous espèces *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart, synonyme d'*O. glandulosum* Desf. Fera l'objet de notre étude.<sup>4</sup>

En Algérie, il existe 3 espèces :

*Origanum majorana* L.,

*Origanum glandulosum* Desf.,

*Origanum floribundum* Munby.

*Origanum glandulosum* Desf. (Origan).

Nom botanique : *Origanum glandulosum* Desf.

- Noms locaux en Arabe et en Kabyle : زعتر *Zaâter*
- En Français : origan
- En Anglais : oregano<sup>5</sup>

<sup>3</sup> Botineau M., 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. pp: 1021-1043.

<sup>4</sup> Spada P. & Perrino P., 1996. Conservation of Oregano species in national and international collections: an assessment. In: Oregano: proceedings of the IPGRI International workshop on Oregano, 8-12 May. Valenzano, Italy. pp: 14-23.

<sup>5</sup> Quezel, P. et Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp. 571-1170.

## I.2. Classification botanique :

La classification d'*Origanum glandulosum* Desf. Est donnée comme suit :

- Règne : Végétal
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédonae
- Sous classe : Astéridae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Lamiacée
- Genre : *Origanum*
- Espèce : *Origanum glandulosum* Desf<sup>6</sup>.



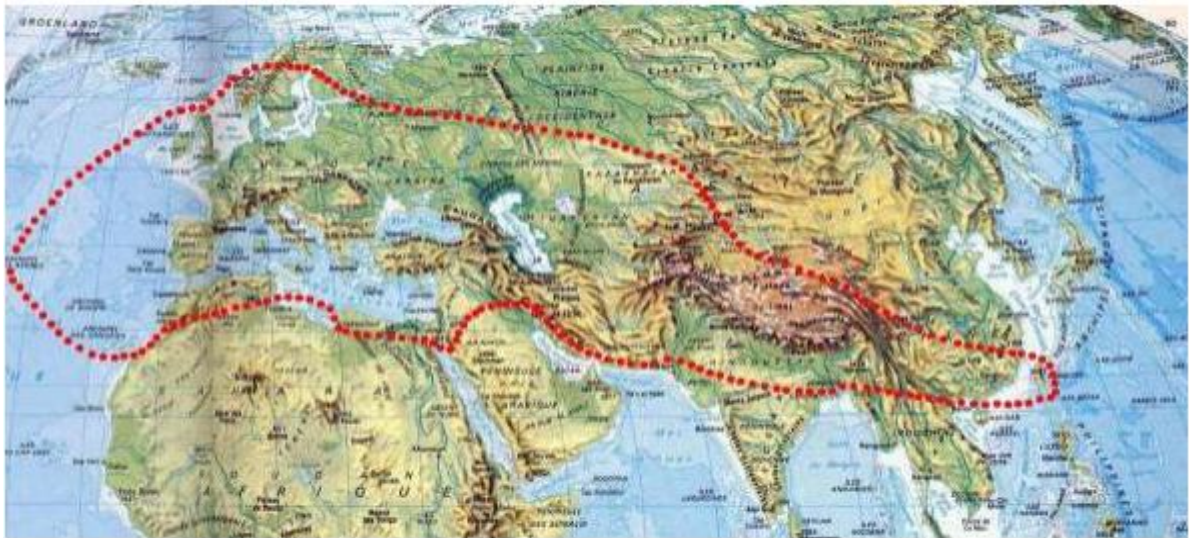
**Figure 01 :** Photographie d'*O.gladulosum*.

---

<sup>6</sup>Dubois J., Mitterand H., & Dauzat A., 2005. Grand dictionnaire étymologique et historique du français, Larousse, Paris.

### I.3. Région de l'existence:

*Origanum glandulosum*, est une plante spontanée endémique qui pousse au nord de l'Afrique (Algérie et Tunisie). Très commune dans les endroits secs et ensoleillés tel que le Tell, elle pousse depuis le niveau de la mer jusqu'à 4000 m d'altitude, principalement sur les substrats calcaires<sup>7</sup>.



❖ Limite de distribution

**Figure 02:** Aire de distribution.

### I -4. Description de l'espèce *Origanum glandulosum* (Desf) :

L'espèce *Origanum glandulosum* (Origan) est une plante à tiges toutes dressées (figure 03 à, b1, b2). L'inflorescence est en épis denses, à fleurs restant contiguës après la floraison.

La corolle a une lèvre inférieure bien plus longue que la lèvre supérieure (figure 2 ; C1, C2, C3).

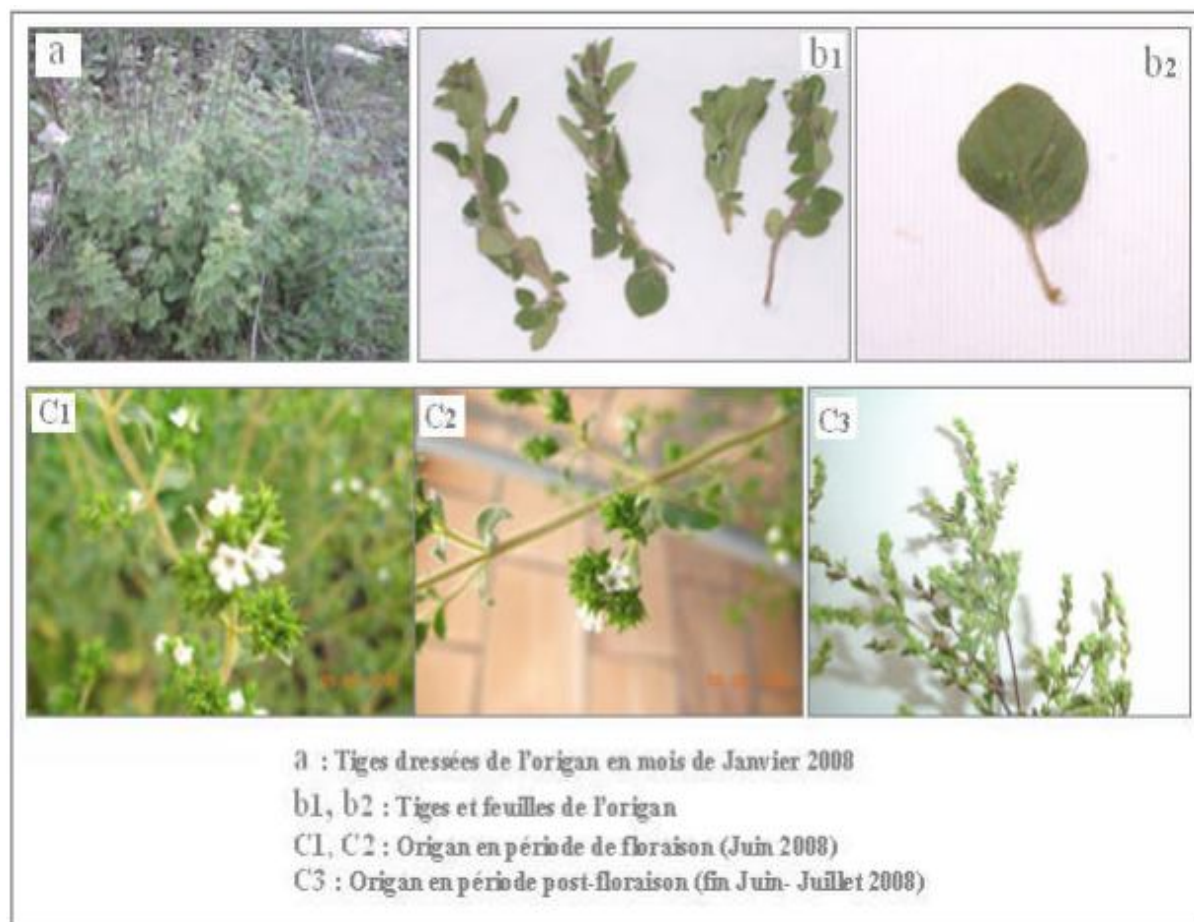
Habitat

Broussailles, garrigues.

Aire de distribution de l'organ

<sup>7</sup> Baba Aissa F., 1991. Les plantes médicinales d'Algérie: identification, description, principes actifs, propriétés et usage traditionnel des plantes communes en Algérie. Ed. Bouchène et Ad. Diwan, Alger. p: 121.

Commun dans tout le Tell<sup>8</sup>.



**Figure 03 :** Les différents stades de développement de l'origan.

### I.5. Propriétés et usage :

Action sédatrice, apéritive, antispasmodique, stomachique, carminative, expectorant, antiseptique. L'origan est recommandé en cas de manque d'appétit, d'aérophagie, de bronchite chronique, de toux d'irritation, d'asthme, d'absence de règles, action antalgique, et parasiticide; utile contre la pédiculose, les rhumatismes et la cellulite.

Les espèces d'*Origanum* sont largement connues comme herbe culinaire, pour assaisonner les produits alimentaires et les boissons alcooliques<sup>9</sup>.

<sup>8</sup> Delille L., 2007. Les plantes médicinales d'Algérie. Berti Editions, Alger. 240 p.

<sup>9</sup> Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F. et Abdelouahid, D. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*. 6 : 153-159.

## I.6. Composition chimique :

Composition chimique de l'huile essentielle Plusieurs études ont démontré que les plantes du genre *Origanum*, renferment des huiles essentielles, des acides phénoliques et des flavonoides. Thymol, carvacrol, p-cymene et  $\gamma$ -terpinène sont les principaux composants des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* (Tableau1)<sup>10</sup>.

Constituants	Pourcentage (%)
<b>Thymol</b>	43,7 %
<b>Caravacrol</b>	2,9 %
<b>p- cymene</b>	12,7%
<b><math>\gamma</math>-terpinène</b>	27,1 %
<b><math>\beta</math>-myrcene</b>	2,5 %
<b><math>\alpha</math>-terpinène</b>	3,2 %
<b><math>\alpha</math>- thujene</b>	1,1 %

**Tableau 1:** Composition chimique de l'huile essentielle d'*O.glandulosum*.

## I.7.Utilisation en médecine traditionnelle :

En Algérie, communément appelé « zaâter », l'origan est une plante essentiellement médicinale qui jouit d'une grande ferveur populaire. La sous-espèce *glandulosum* est utilisée comme tisane par la population locale pour guérir plusieurs maladies telles que : rhumatismes, toux, rhume et troubles digestifs<sup>11</sup>.

## II-LES METABOLITES SECONDAIRES :

Les métabolites secondaires végétaux sont des molécules essentielles à la vie des plantes et leur interaction avec l'environnement, ils sont également des sources importantes pour les produits pharmaceutiques, les additifs alimentaires et les arômes. Les métabolites

<sup>10</sup> Agnihotri V.K., Agarwal S.G., Dhar P.L.,Thappa Baleshwar R.K., Kapahi B.K., Saxena R.K. & Qazi G.N., 2005. Essential oil composition of *Mentha pulegium* L. growing wild in the north-western Himalayas India. *Flavour Frag. J.* 20: 607–610.

<sup>11</sup> Belhatab R., Larous L., Figueiredo C.A., Santos P.A.G., Barroso J.C. & Pedro L.G., 2005. *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Frag. J.* 20: 209-212.

secondaires se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre<sup>12</sup>

## II. les flavonoïdes :

### II.1. Définition :

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Et jouent un rôle important dans la protection des plantes.

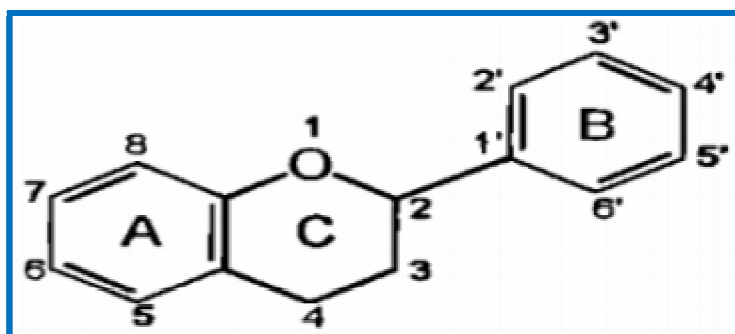
Les flavonoïdes se trouvent également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant ces composés sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde entier<sup>13</sup>.

#### II.1.1. Structure des flavonoïdes :

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone qui fait de deux cycles phényles C<sub>6</sub>, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Ce dernier est situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle centrale). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (Figure ci-dessous). La Distinction des sous-classes se fait sur la conformation de la structure centrale (cycle C).

<sup>12</sup> Ramakrishna A and Ravishankar G A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 6(11), 1-12.

<sup>13</sup> Bouakaz, I., (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna.



**Figure 04 :** Structure de base des flavonoïdes.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C<sup>14</sup>.

### II.1.2. Classification des flavonoïdes :

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques, selon la nature des structures et les positions des groupes hydroxyles et la structure des différents types des flavonoïdes varie par la nature de l'hétérocycle oxygéné, ces composés sont distribués en différents types : flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavanes, chalcones, anthocyanidines, catechines, ptérocarpanes, et aurones.

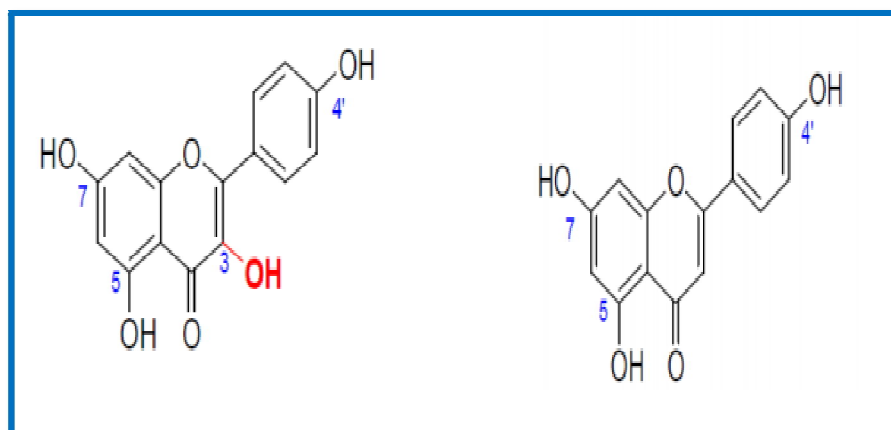
Les plus connus de cette famille sont les flavonols, flavones et les anthocyanes sont très nombreux, par contre les chalcones et aurones.

Les flavones comme tous les flavonoïdes ont une structure C6-C3-C6 avec l'apparition d'un hétérocycle porteur d'un groupement carbonyle et d'une insaturation en C3.

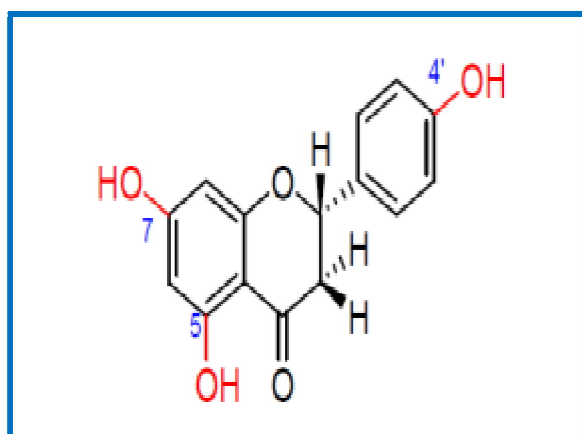
Les flavonols se différencient des flavones par l'existence d'un OH en position 3 de l'hétérocycle. Cet OH est le seul qui ne soit pas phénolique. Ils sont le plus connus, parmi eux le quercétine qui est un des principaux composés phénoliques de végétaux<sup>15</sup>.

<sup>14</sup> Erlund. (2004). Nut. Res. p24, 851-74.

<sup>15</sup> H. Brahim. Valorisation et identification structurales des principes actifs de la plante de la famille asteraceae: Scorzonera Undulata, université de Mentouri Constantine, 17 janvier 2011.



**Figure05:** Structure de flavonol et flavone.

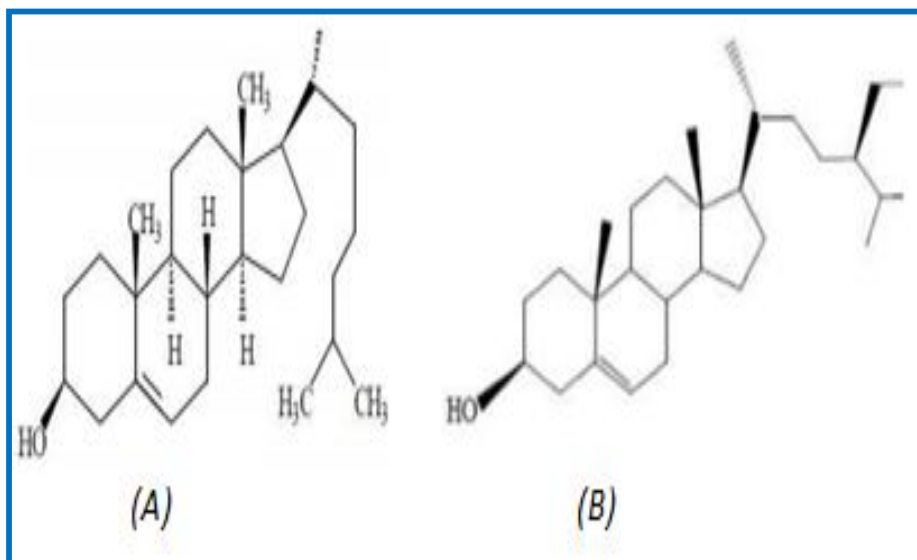


**Figure06:** Structure de flavanone.

## II .2. Les stéroïdes et les stérols:

Les stéroïdes et les stérols et constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux. Les stérols jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles. Ils se présentent sous forme d'alcool libre (sitostérol), ou sous forme des esters associés par le glucose (glucoside stérols)<sup>16</sup>.

<sup>16</sup> Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris



**Figure 07:** Structures des stéroïdes (A) et stérols (B)

### II .3. Les tanins :

Ce sont des produits naturels polyphénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leur solution aqueuses. Leur structure est formée par des unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation. Nous distinguons habituellement deux groupes de tanins différents par leur structure et par leur origine biogénétiques, les tanins hydrolysables et les tanins condensés<sup>17</sup>.

#### II .3.1 . Les tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables sont composés de deux types d'unités de base, à savoir un glucide (la plupart du temps le D-glucose) et des acides phénoliques. Il s'agit des gallotanins pour les quelles le glucide est estérifié par l'acide gallique et des ellagitanins où le glucide est estérifié par l'acide ellagique (fig.08)

<sup>17</sup> Dacosta, E. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317 p

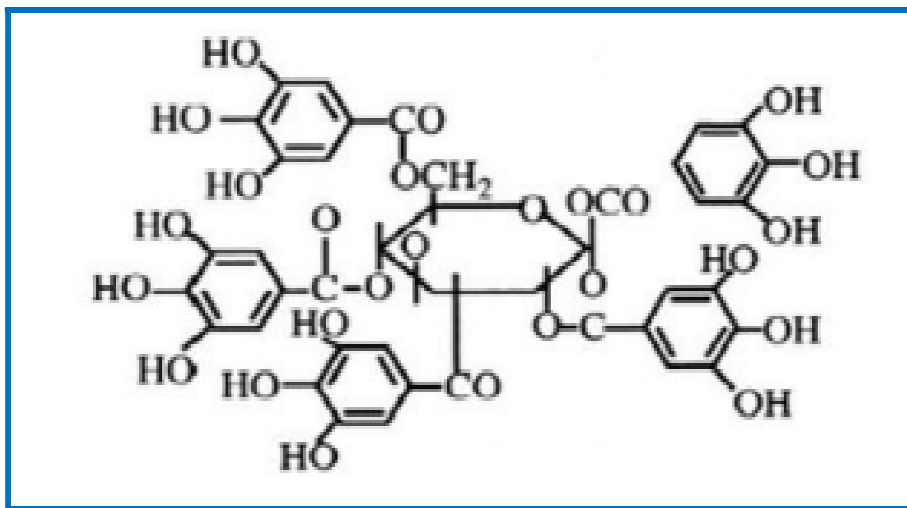


Figure 08: La structure de tanins hydrolysabl.

### II .3.2. Les tanins condensés :

Les tanins condensés sont des polymères de polyhydroxyflavan-3-ol, liés la plus part du temps par des liaisons entre C4 et C8 et sporadiquement entre C4 et C6. (fig. 09)<sup>18</sup>.

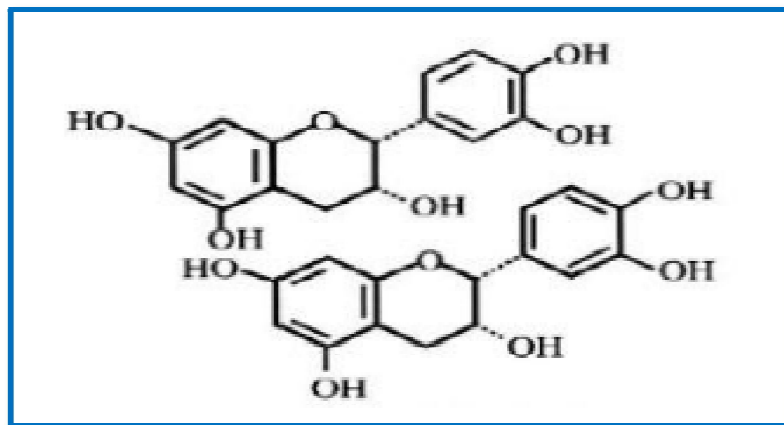
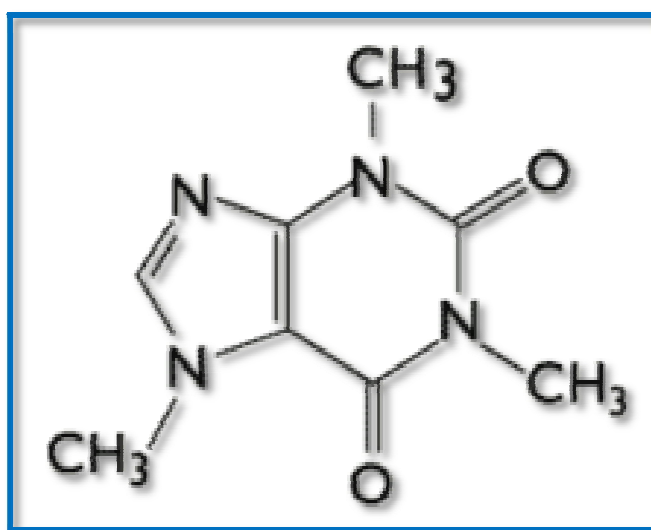


Figure 09 : La structure de tanins condensés.

<sup>18</sup> Cuvelier C, Cabraux J.F, Dufresne I, Hornick J.L, and Istasse L, "Acides gras: Nomenclatures et sources alimentaires," de Liège, Belgique, 2004.

## II .4 .Alcaloïdes :

Les alcaloïdes constituent avec les hétérosides, la majorité des principes actifs des plantes médicinales. Les alcaloïdes sont des substances organiques, le plus souvent d'origine végétale. La présence d'azote confère à la molécule un caractère basique plus au moins prononcé, de distribution restreinte et douée d'activité biologique, à faibles doses. Ils sont de poids moléculaires extrêmement variables et certains peuvent atteindre un poids de 1000g/mol<sup>19</sup>.



**Figure 10:** Structure de quelques alcaloïdes.

Les alcaloïdes existent sous forme de sels et sous forme d'une combinaison avec les tanins. On distingue trois classes d'alcaloïdes:

- **Alcaloïdes vrais** : Ils sont issus seulement du règne végétal, ils existent à l'état de sels et sont biosynthétiquement formés à partir des acides aminés.
- **Pseudo-alcaloïdes** : Il s'agit dans la majorité des alcaloïdes terpéniques. Ils présentent le plus souvent, toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des Plantes et principes actifs 14 acides aminés.
- **Proto-alcaloïdes** : Ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique.<sup>19</sup>

<sup>19</sup> Silanikove N, Perevolotsky A, Provenza FD. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal feed Science and Technology*. 91(1): 69-81.

## II .4 .1. Fonctions et propriétés :

Les alcaloïdes sont des molécules très intéressantes au point de vue biologique car certaines sont le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicaments, comme poisons ou encore comme psychotropes. Insolubles ou fort peu solubles dans l'eau; ils sont solubles dans l'alcool plus à chaud qu'à froid, l'éther, les acides et dans l'ammoniaque<sup>20</sup>.

## II .5. LES SAPONINES :

### II .5.1 Définition :

Les saponines appelées aussi saponosides sont une classe spécifique de métabolites secondaires, produits naturels abondamment retrouvés dans le règne végétal.

Leur nom provient du latin « sapo » signifiant « savon » en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau. Les saponines agissent comme une barrière chimique contre les agents pathogènes et les herbivores<sup>21</sup>.

Les saponines se trouvent dans les tissus végétaux qui sont les plus vulnérables aux attaques fongiques, bactériennes et des insectes. Structuralement parlant, les saponines sont constituées d'un squelette stéroïdique ou triterpénique porteur d'une (monodesmoside) ou de plusieurs (bidesmoside, tridesmoside) sections sucres. La nature des sections osidiques retrouvées à l'intérieur des saponines est très variée. Les monosaccharides les plus courants sont le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, le L-arabinose, le D-xylose, le D-fucose , l'acide D-glucuronique et l'acide D-galacturonique<sup>22</sup>.

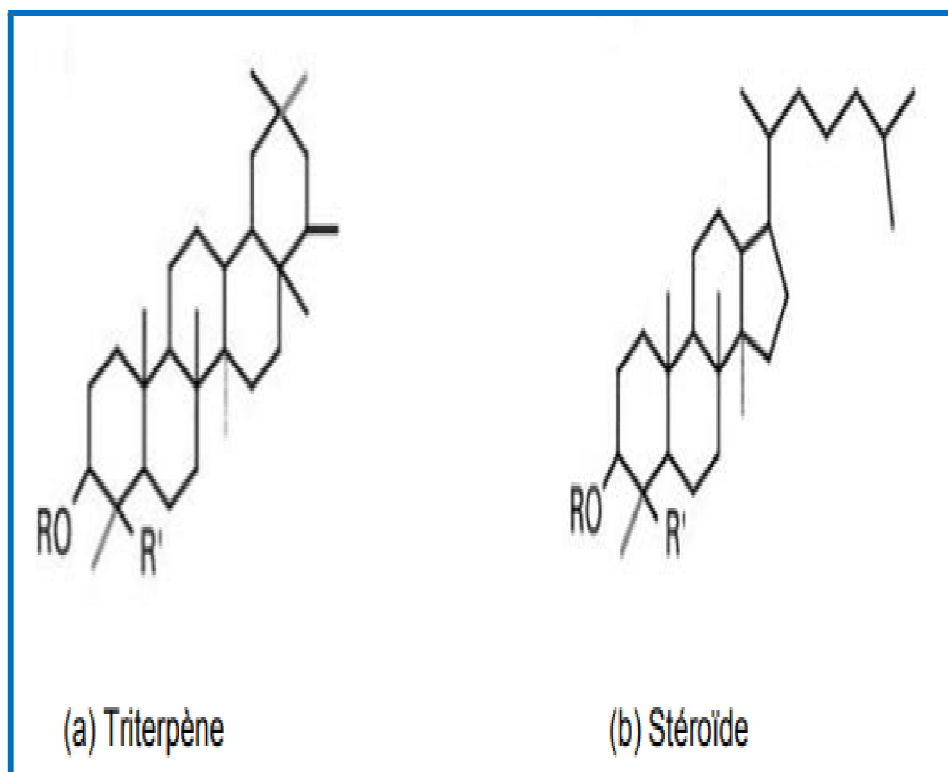
---

<sup>19</sup> Silanikove N, Perevolotsky A, Provenza FD. 2001. Use of tannin- binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal feed Science and Technology*. 91(1): 69-81

<sup>20</sup> Bruneton J. 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4<sup>ème</sup> Edition, lavoisier. Paris.

<sup>21</sup> Ghestem A, Seguin E, Paris M, Orecchioni AM. 2001. Le préparateur en pharmacie dossier 2<sup>ème</sup> Ed Techniques et documentation. Paris, p. 275.

<sup>22</sup> Kansole, M.M.R. Etude ethnobotanique, phytochimie et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso. 2009



**Figure 11:** Structure de base des saponines.

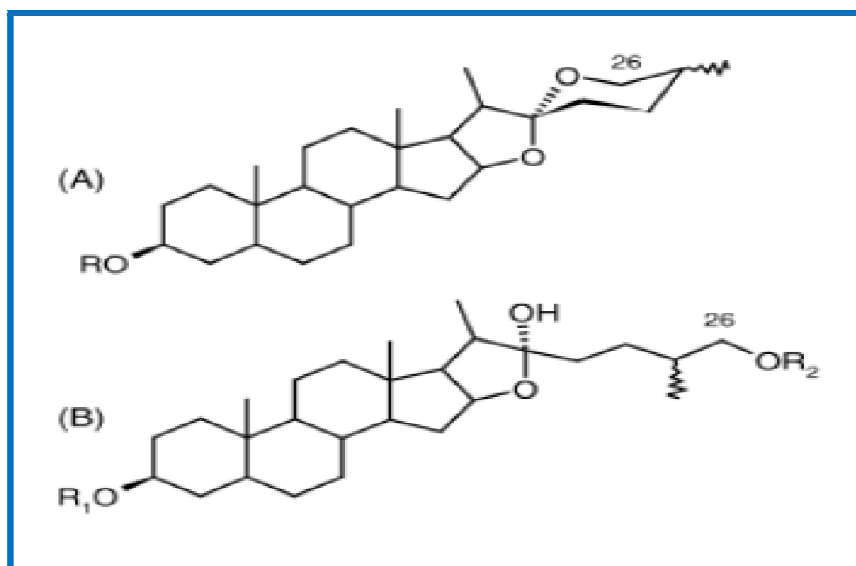
## II .5. 2 Classification des saponines :

Selon la nature de l'aglycone, les saponines sont classées en deux groupes :

### II .5. 2 .1 Saponines stéroïdes (ou stéroïdiques):

Elles sont presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de spirostane (figure 23 A) avec 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles. Dans certains cas, le groupe hydroxyle en position 26 est engagé dans une liaison glycosidique pour donner un squelette de furostane (figure 12 B)<sup>23</sup>.

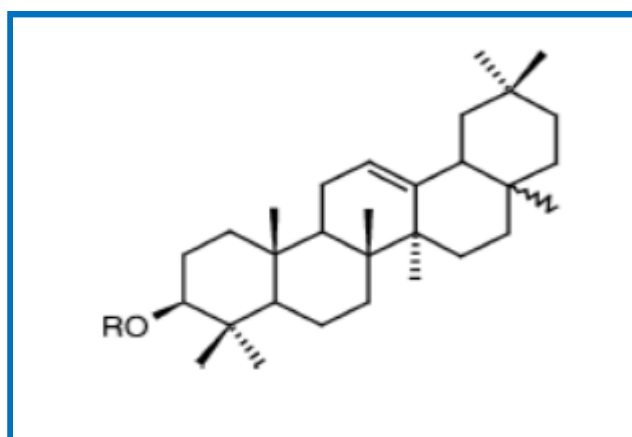
<sup>23</sup> Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid Biosynthesis : Metabolism and Trafficking. Annu Rev Plant Biol. 2008, Vol. 59; pp 735 – 769



**Figure 12 :** Squelettes de spirostane stéroïdien (A), furostane stéroïdien (B).

### II .5. 2 .2 Saponines triterpènes :

Elles sont les plus abondantes et se trouvent principalement dans les angiospermes dicotylédones. Les saponines triterpènes sont constituées d'un aglycone triterpénoïde (figure13) formé d'un squelette de 30 atomes de carbone. Elles sont des dérivés du noyau  $\alpha$  ou  $\beta$ - amyryne<sup>24</sup>.

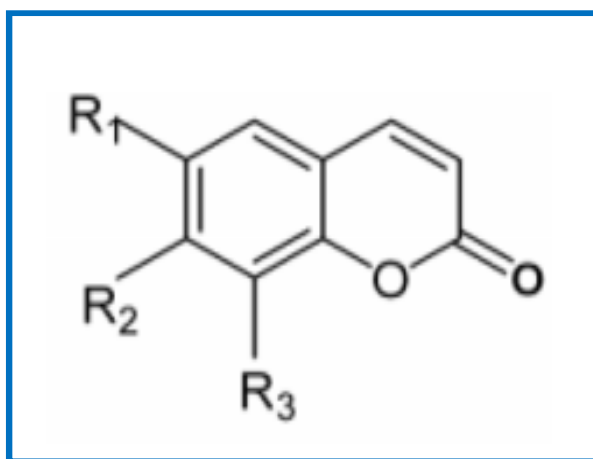


**Figure13:** Squelette de saponine triterpénoïde.

<sup>24</sup> COWAN N. M., 1999- Plant products as anti microbial agents. Clinical microbiology Reviews. Vol. 12(4): 564-582.

## II .6. Les coumarines :

Coumarines sont des substances phénoliques hétérocycliques oxygénées de la structure C6- C3. Elles sont isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le coumarona odorat .Ces dernières se trouvent dans les familles d’asteracées, apiacées, fabiacées et d’autres familles. Ils sont trouvés dans les feuilles et les racines de la plantes<sup>25</sup>.



**Figure 14:** structure de base des coumarines.

### II .6.1. Différentes classes de coumarines selon leurs structures :

On peut considérer que différentes coumarines dérivent des acides cinnamiques, les plus connus de cette famille sont le skimmine et le scopolin<sup>26</sup>.

Composés	R1	R2
Skimmine	H	H
Scopoline	OCH <sub>3</sub>	H
Aesculétine	OH	H
Fraxétine	OCH <sub>3</sub>	H
Daphnetine	H	OH

**Tableau 02:** Différentes structures chimiques des coumarines.

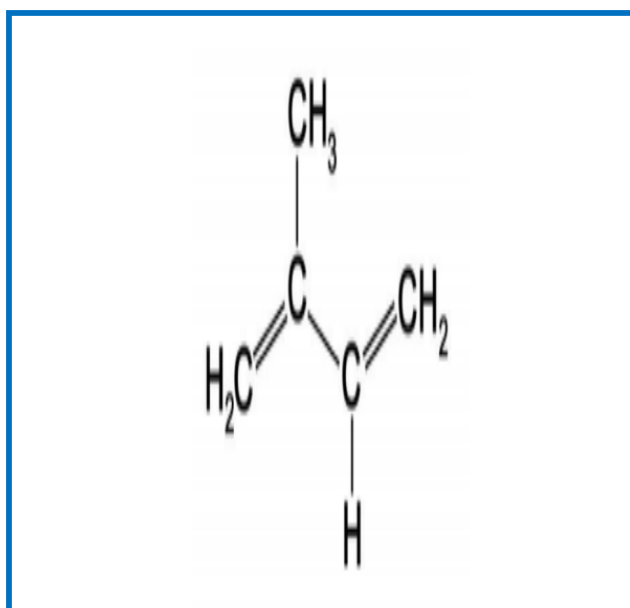
<sup>25</sup> K. Donatien. Enquête Ethnobotanique de six plantes médicinales Maliennesextraction, identification, d’alcaloïdes caractérisations, quantification de polyphénols : Etude de leur activité anti oxidante, 2009.

<sup>26</sup> COWAN N. M., 1999- Plant products as anti microbial agents. Clinical microbiology Reviews. Vol. 12(4): 564-582.

## II .7 Les terpenoïdes :

Les terpènes Les isoprénoides sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes. De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoides regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées.

Les terpenoïdes sont responsables de la couleur et l'odeur des plantes et des épices (piments, curies) et ont des propriétés biologiques et pharmacologiques variées : cytostatiques, antiviraux, anti-inflammatoires, anti-œdémateuses, cytoprotectives, immunomodulatrices, analgésiques, antibactériennes et antifongiques<sup>27</sup>.



**Figure 15:** Structure de base de l'isoprène.

<sup>27</sup> DEORE, S., KHADABADI, S., CHITTAM, K., BHUJADE, P., WANE, T., NAGPURKAR, Y., CHANEKAR, P. & JAIN, R. 2009. Properties AD pharmacological applications of saponins. Pharmacologyonline, 2, 61-84.

## **II .7 .1. Classification des terpènes :**

### **II .7 .1. 1. Hémiterpènes :**

Dans la nature, il existe peu de composés naturels ayant une formule de C<sub>5</sub> ramifiée; parmi certains composés naturels trouvés chez les plantes qui peuvent être considérés comme hémiterpène, seul l'isoprène à toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes<sup>28</sup>

### **II .7 .1.2. Diterpènes :**

Les diterpènes sont des substances avec 20 atomes de carbone (C<sub>20</sub>) présentant une très grande variété structurale. Ces composés sont principalement présents dans les plantes supérieures dans les résines, ainsi que dans les champignons. Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cycliques. Parmi les diterpènes cycliques, Le rétinol et le rétinol, deux formes de la vitamine A sont les plus connues dans cette famille<sup>29</sup>.

### **II .7 .1.3. Monoterpènes :**

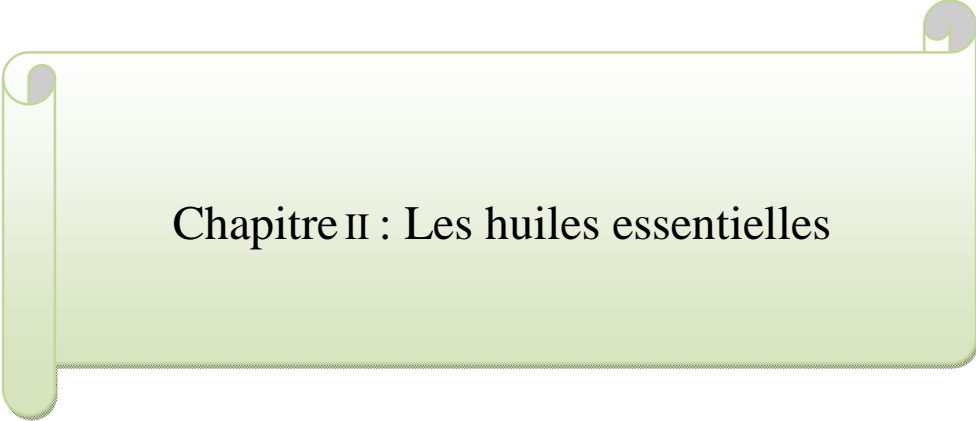
Les monoterpènes contiennent plus de 900 composés connus se trouvent principalement dans 3 catégories structurales: les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène<sup>30</sup>.

---

<sup>28</sup> Loomis, D., and R. Croteau. (1980): Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds.) the Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function No. 4. p 364-410. Academic Press, San Francisco

<sup>29</sup> Dey, P.M., Harborne, J.B. (1991): Methods in plant biochemistry. Volume 7, Terpenoids. Academic press.

<sup>30</sup> Allen, K. G., Banthorpe, D. V., and Charlwood B. V. (1977): Metabolic pools associated with monoterpene biosynthesis in higher plants. Phytochemistry 16, 79-83.



## Chapitre II : Les huiles essentielles

*Il y a toujours quelqu'un qui est pire que toi,  
Alors il a souri.*

**Introduction :**

**L**es saveurs caractéristiques de plusieurs plantes, viennent de produits chimiques présents, variant en quantité, de partie par billion à partie par million. Dans la nature, quelques espèces de plantes évoluent avec de hauts niveaux de composants odorants que d'autres. Telles herbes et épices ont été utilisées depuis très longtemps pour aromatiser d'autres aliments, et même pour le traitement de certaines maladies. Avec la découverte de la distillation, il est devenu possible de séparer le mélange de produits chimiques odorants du matériel végétal, ainsi, les huiles essentielles sont nées. Ce sont les produits odorants, volatils du métabolisme secondaire des plantes supérieures. Les huiles essentielles se trouvent dans certaines cellules spécialisées des fleurs, feuilles, graines et des racines, ainsi que dans l'écorce, la résine et le bois des arbres. La fonction des huiles essentielles est largement communicative, permettant aux plantes d'utiliser ces huiles pour influencer leur environnement. Elles fournissent aux 35 plantes une protection antiseptique, leur saveur et une partie de leurs vertus médicinales. De nos jours, plus de 400 essences ont été identifiées<sup>1</sup>.

**I. LES HUILES ESSENTIELLES :****I.1.Définition des huiles essentielles :**

Ce sont des substances huileuses, volatiles, d'odeur et de saveurs généralement fortes, extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques, par les méthodes de distillation, par enfleurage, par expression, par solvant ou par d'autres méthodes.

Pour Bruneton (1999), les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont «des produits de compositions généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation». La norme française AFNOR NF T75-006 définit l'huile essentielle comme: «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, et qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques »<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Support de cours sur le métabolisme secondaire d'antoine gravot (équipe pédagogique physiologie végétale, umr 118 apbv), université de rennes 1 – L2 ue phr, année universitaire 2008/2009.

<sup>2</sup> Ayad, R. (2008). recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce zygodium cornutum, Mémoire magister En Chimie Organique, université Mentouri Constantine. p 35-39, 40, 47

## **I. 2. Répartition et localisation :**

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Leur composition chimique est d'une grande complexité, ce qui les rend spécifiques car chaque huile essentielle regroupe en réalité plusieurs substances aromatiques très élaborées et très différentes. Les huiles essentielles peuvent être stockées dans toutes les parties de la plante (fleurs, feuilles, fruits, graines, écorces, tiges, etc.) avec une quantité plus importante au niveau des parties supérieures (fleurs et feuilles).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. L'accumulation de ces métabolites secondaires, se fait généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante telle que les poils sécréteurs, les poches sécrétrices et les canaux sécréteurs pour les Astéracées<sup>3</sup>.

## **I. 3. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaient à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau. Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau. Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée. Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15)<sup>4</sup>.

## **I. 4. Propriétés biologiques des huiles essentielles :**

### **❖ Chez les végétaux :**

Les plantes aromatiques produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste inconnu. Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques et conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques. Certaines huiles essentielles servent à la défense des plantes contre les herbivores, insectes et micro-organismes.

<sup>3</sup> Belaiche P. (1979) - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.

<sup>4</sup> Lagunez Rivera L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ,2006, pp 31-42.

### ❖ Chez l'homme :

La diversité moléculaire des métabolites que les huiles essentielles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés<sup>5</sup>.

### I. 5. Toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines d'entre elles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacoumarines), d'autres ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' $\alpha$ -thujone). La toxicité des huiles essentielles est assez mal connue. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi<sup>6</sup>.

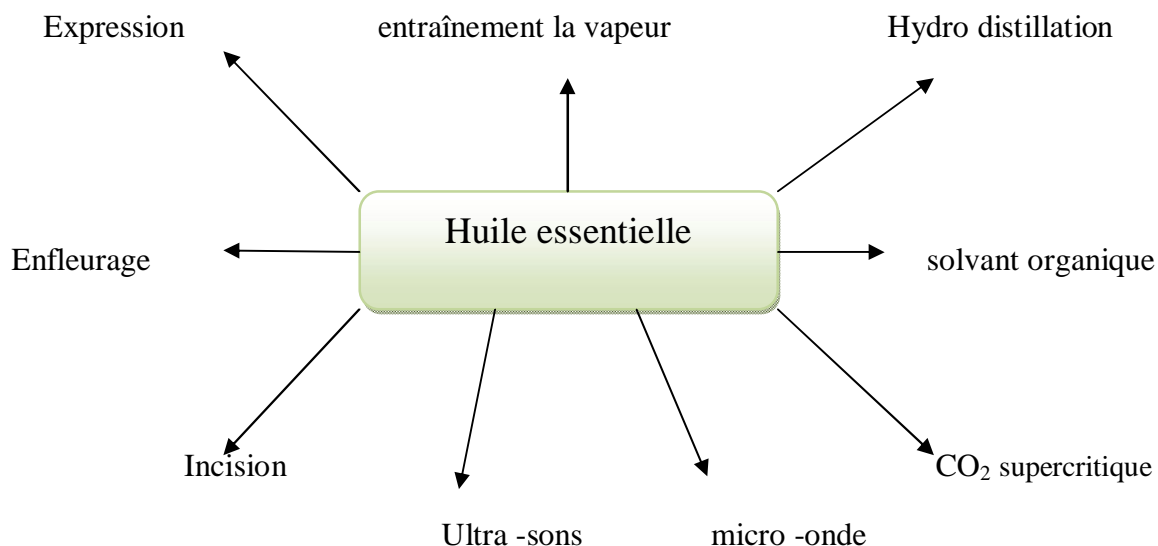
### II .Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée au moyen de nombreux divers procédés, basés sur des techniques anciennes :

Distillation, expression, enflourage ou Incision ou plus récentes : extraction sous irradiation micro-ondes ou par ultra-sons.

La distillation reste la méthode la plus prisée du fait qu'elle est facile à mettre en œuvre.

La figure (16) regroupe les différentes voies d'extraction des huiles essentielles.



**Figure 16 :** Méthodes d'extraction des huiles essentielle.

<sup>5</sup> Guba R., 2001. Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. Int. J. Aromather. 11: 76-83.

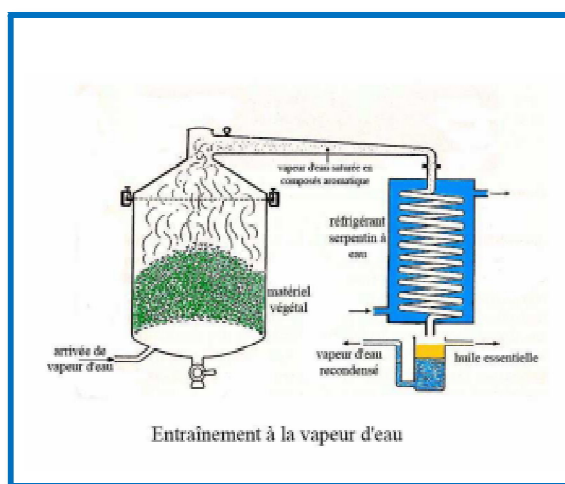
<sup>6</sup> Rai M. K., Acharya D. & Wadegaonkar P., 2003. Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, in: Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects. Haworth press , New York. p: 51.

## II.1 Distillation :

### II.1.1 Entraînement à la vapeur d'eau :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ».

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : " l'huile essentielle". L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile<sup>7</sup>.



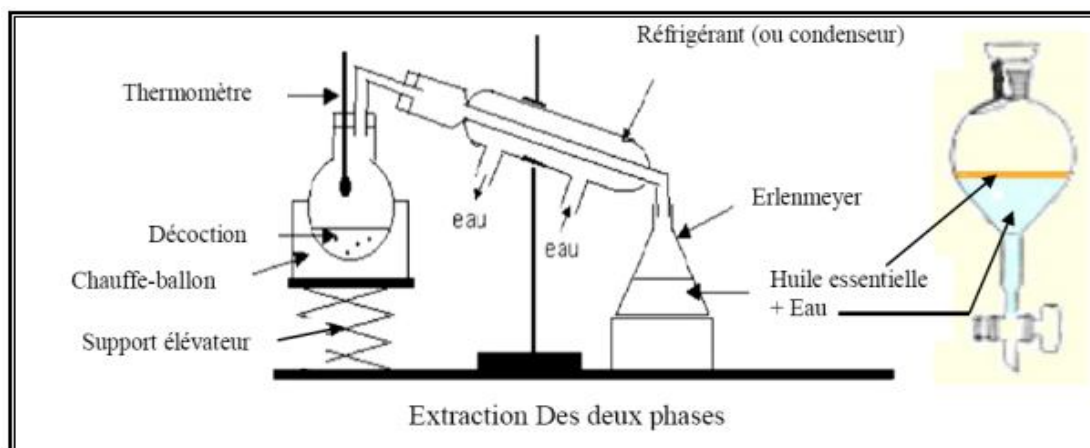
**Figure17:** Entraînement à la vapeur d'eau.

### II.1.2 L'hydro-distillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau surnage au dessus de l'hydrolat (figure18). Cependant, l'hydro-distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques<sup>8</sup>.

<sup>7</sup> Aboughe Angone, S., Aworet Samseny, R.R.R., et Eyele Mve Mba, C. (2015). Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon. *Phytothérapie*, 13: 283–287

<sup>8</sup> Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Mai 2008.



**Figure 18 :** schémas des étapes de l'hydro-distillation.

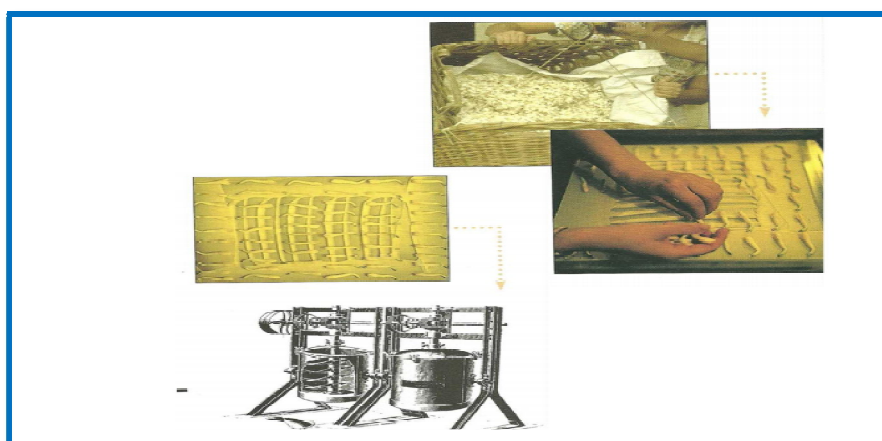
## II.2. Enfleurage :

L'enfleurage est l'un des anciens procédés. Il est basé sur des l'affinité parfums pour les graisses et concerne les plantes qui conservent leur parfum après avoir été cueillies (comme le jasmin).

Les fleurs sont étalées sur des châssis enduits de graisses inodores ou le parfum des fleurs est absorbé par les graisses jusqu'à saturation. Les fleurs sont renouvelées régulièrement.

Est terminée quand un kilo de matière grasse est saturée par deux à trois kilos de fleurs. Elle peut durer environ un mois. On fait alors fondre la pommade qui sera décantée et elle sera ensuite traitée à l'alcool et à froid (voir Fig.19).

Cette technique d'extraction est pratiquement en voie de disparition en raison de son coût élevé. Elle nécessite un effort important<sup>9</sup>.



**Figure 19 :** procédé Enfleurage.

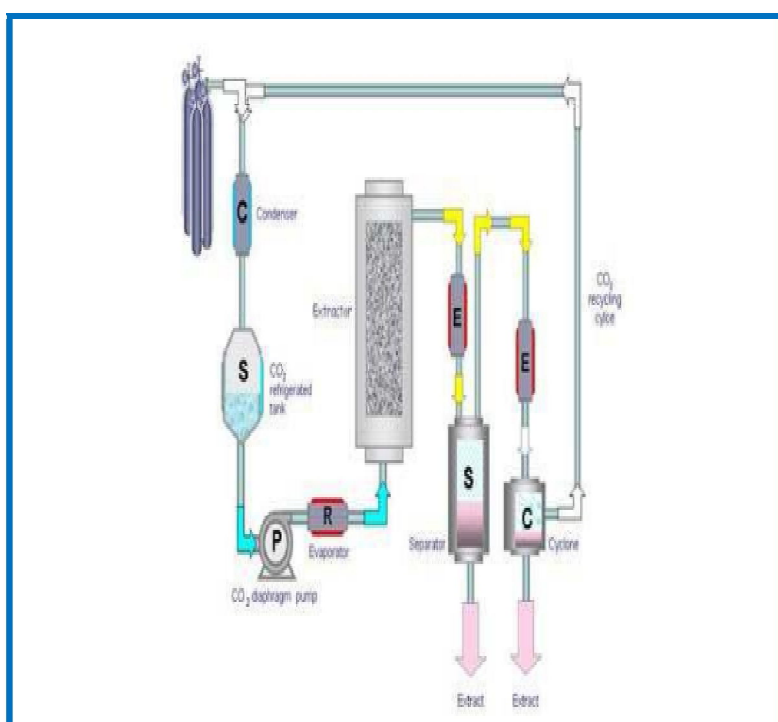
<sup>9</sup> Luque de castro ,M .D ;jiménez- carmona,M.M .et Feràndez –pérez,V.Trends Anal,chem ,1999 ,18 ,708 .

### II .3. Extraction par ultrasons :

Les micro-cavitations, générées par ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, notamment les zones cristallines celluloses. Les ultrasons favorisent la diffusion et peuvent modifier l'ordre de distillation, des constituants des huiles essentielles. L'extraction par les ultrasons est une technique de choix, pour les solvants de faible point d'ébullition, à des températures d'extraction inférieures au point d'ébullition. L'avantage essentiel de ce procédé est de réduire considérablement la durée d'extraction, d'augmenter le rendement en extrait et de faciliter l'extraction de molécules thermosensibles<sup>10</sup>.

### II .4. Extraction par CO<sub>2</sub> super critique :

La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO<sub>2</sub> et de son état physique. Grâce à cette propriété, il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux. Le CO<sub>2</sub> est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, ensuite il est injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, après le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant<sup>11</sup>.



**Figure20** : procédé par CO<sub>2</sub> supercritique.

<sup>10</sup> Marie Elisabeth Lucc, thèse sur : Extraction sans solvant assistée par Microondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, université de la reunion, 13 juillet 2005, 59-71.

<sup>11</sup> Lagunez Rivera L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ,2006, pp 31-42.

## II .5. Extraction assistée par micro-onde :

L'extraction par micro-onde est une technique qui a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé d'extraction par microondes appelée Vacuum Microwave Hydrodistillation (VMHD) consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants: rapidité, économie du temps d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvant résiduel<sup>12</sup>.

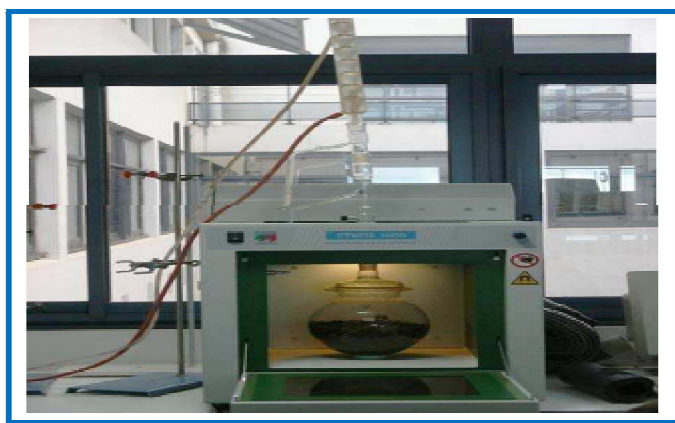


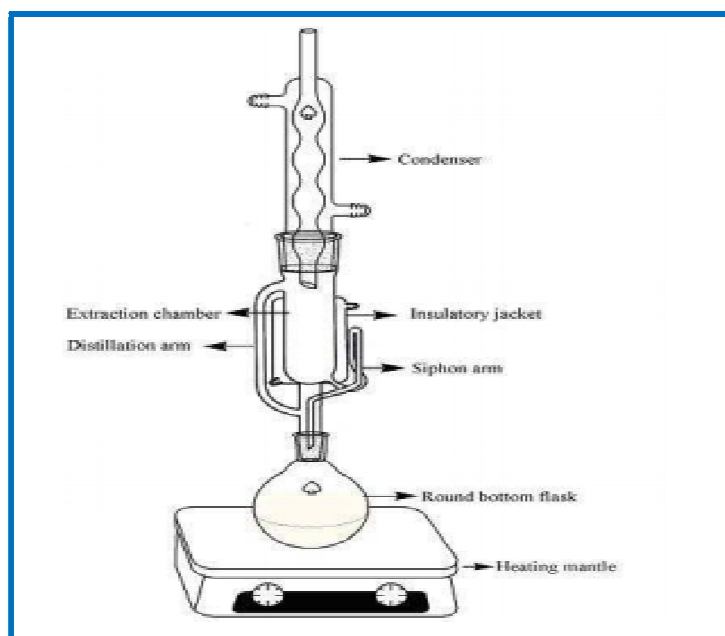
Figure 19 : Extraction assisté par micro-onde.

## II.6 .L'extraction par solvants volatils :

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau. Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter. En effet, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des

<sup>12</sup> Lagunez-Rivera L. (2006) - Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe

impuretés parfois difficile à éliminer. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense: le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'hydrodistillation-extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet sont les principales. L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides, ou de diverses autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux microondes et aux ultra-sons<sup>13</sup>



**Figure 20** : L'extraction par solvants volatils.

## II.7. L'expression :

L'expression ou pression à froid est spécifique à l'extraction des huiles essentielles des agrumes citron, orgumes, mandarines, etc. ... c'est une méthode assez simple qui consiste à briser mécaniquement par abrasion les poches à essence localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour recueillir le contenu<sup>14</sup>.

<sup>13</sup> Luisa.PISTELLI ,comparaison des systèmes d'extraction des huiles essentielles avec une référence particulière aux liquides

<sup>14</sup> Marie Elisabeth Lucc, thèse sur : Extraction sans solvant assistée par Microondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, université de la reunion, 13 juillet 2005, 59-71.

## II.8. Incision :

Ce procédé est utilisé très rarement, IL suffit de fendre l'écorce des arbres pour en recueillir le suc comme par exemple le caoutchouc de l'arbre hévéa<sup>15</sup>.

## III. LES METHODES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES :

L'instrumentation moderne est progressivement confrontée à des analyses de plus en plus complexes, liées au nombre important de constituant présents et aux quantités extrêmement faibles à détecter. En effet l'analyse d'une huile est complexe, de par son très grand nombre de constituants chimiques volatils mais aussi, souvent, de par l'importance des composés à l'état de traces qui font le caractère spécifique de l'huile<sup>16</sup>.

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase Plusieurs méthodes existent :

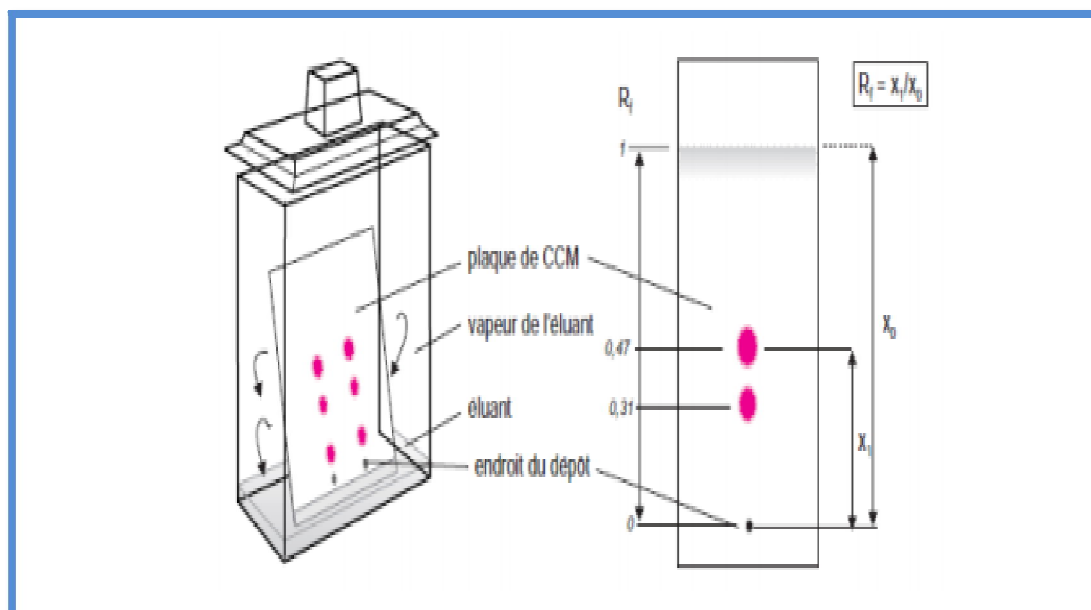
### III.1.Chromatographie sur couche mince :

La CCM (Fig. 21) est utilisée comme technique de routine, pour l'analyse rapide de fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. L'efficacité de la CCM comme technique de séparation est souvent mise à profit dans la phase ultime de purification, au moins sur de faibles quantités, lorsque les autres techniques ont montré leurs limites. La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption: la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant .Après la migration, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode. La distance de migration des composés est ensuite mesurée et comparée à celle du front de la phase mobile, ceci permet de définir la référence frontale  $R_f$  caractéristique de chaque composé précise que la technique du CCM, bien que beaucoup moins performante que la chromatographie en phase gazeuse, peut être utilisée en routine pour le contrôle de qualité des huiles essentielles<sup>17</sup>.

<sup>15</sup> Edrissi A., Thèse de troisième cycle: Etude des huiles essentielles de quelques Espèces Salivia, Lavandula et Mentha du Maroc, Faculté des Sciences de Rabat, Maroc, 1982,18-22.

<sup>16</sup> guignard,J.L.(Biochimie végétale ),Masson ,paris,2000,166

<sup>17</sup> Caude M. et Jardy A. (1996) - Méthodes chromatographiques. Dossier P1445. Base documentaire : Techniques d'analyse. vol ; papier TA2.



**Figure 21 :** Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM.

### III.2. Chromatographie en phase gazeuse :

Chromatographie en phase gazeuse (CPG) C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. Elle permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir).

Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur<sup>18</sup>.

### III.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM) :

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM, après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique. Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leur masse. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (Ir) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres<sup>19</sup>.

<sup>18</sup> Audigie C.L., Dupon G. et Zongain F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, 1995, p. 44.

<sup>19</sup> De Maack F. et Sablier M. Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniques d'analyse. 1994. Référence: P2614.

### III.4. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) :

Cette technique est indiquée pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour effectuer des préfractionnements. Elle peut être couplée également à un analyseur de masse. La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine et une phase mobile liquide circulant sous l'effet d'une haute pression. Après la séparation des différents constituants de l'échantillon, un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données<sup>20</sup>.

### III.5. La spectroscopie infrarouge :

La spectroscopie infrarouge (FTIR) est une méthode d'analyse physico-chimique qui sonde les liaisons entre les noyaux atomiques et leurs arrangements. Cette méthode permet de caractériser de manière qualitative les dépôts effectués par plasma sur un substrat peu absorbant (cas du silicium cristallin intrinsèque ou peu dopé). Elle permet d'accéder directement à l'information moléculaire et à la nature chimique du matériau analysé, et par conséquent, de corréler les propriétés physiques du film déposé aux conditions d'élaboration.

Effectivement c'est dans ce contexte que nous avons opté pour cette technique afin de pouvoir suivre l'évolution des propriétés physiques des couches élaborées avec les variations des conditions de dépôt considérées. Le spectrophotomètre permet d'observer des radiations infrarouges dans la gamme 400-4000cm<sup>-1</sup>.

La technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé et permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Cette méthode d'analyse est simple à mettre en œuvre et non destructive. Elle permet d'analyser aussi bien les matériaux organiques que les matériaux inorganiques. La grande diversité des montages expérimentaux permet la caractérisation de pratiquement tous types d'échantillons, quel que soit leur état physique ou de surface<sup>21</sup>.

### III.6. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN :

Parmi toutes les techniques spectroscopiques, la RMN est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques ; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules. L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de permettre l'identification des connexions entre atomes des diverses entités tout en les situant dans l'espace les uns par rapport aux autres<sup>22</sup>.

<sup>20</sup> Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F. Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore Corse. *Analysis* 1997; 25 (6) : 13- 16.

<sup>21</sup> M.COTTE, J.SUSINI, P.DUMAS « les nouveaux développements en microspectroscopie infrarouge utilisant le rayonnement synchrotron » Colloque SFμ-2007- Grenoble.

<sup>22</sup> Platzner N. Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Référence : P1092, 2002.



## Chapitre III: L'activité biologique

*C'est l'innovation qui différencie les  
leaders des suiveurs.*

**Introduction :**

**L**es substances naturelles sont des composés que l'on retrouve dans les organismes végétaux, l'étude de ces composés et leur isolement a permis des progrès dans plusieurs domaines, particulièrement dans le domaine de la santé humaine et animale. En effet les plantes renferment des composés qui ont la propriété d'agir sur l'organisme humain, favorablement (cas des médicaments) ou défavorablement (cas des toxines). A travers ce chapitre, nous allons présenter deux activités biologiques importantes qui sont<sup>1</sup> :

**I. Activité antioxydante :**

Le terme antioxydant était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. À la fin du XIXe siècle et au début du XXe siècle les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leur utilisation dans les procédés industriels afin de réduire par exemple la corrosion des métaux et la polymérisation des carburants dans les moteurs à explosion.

Ces dernières années de nombreuses études ont apporté des précisions sur les niveaux des consommations des antioxydants, leur devenir dans l'organisme et leurs mécanismes d'action aux niveaux cellulaire et moléculaire. Par ailleurs, de nombreuses molécules antioxydantes d'origine naturelle suscitent actuellement l'intérêt professionnel de l'agroalimentaire et génèrent de nouveaux programmes de recherches<sup>2</sup>.

**I.1. Radicaux libres et stress oxydatif :**

L'oxygène est un élément vital qui joue un rôle indispensable dans l'oxydation des cellules.

Lorsque cette oxydation est incomplète, il se forme des molécules nocives appelées radicaux libres. En grand nombre, les radicaux libres altèrent l'intégrité des cellules et provoquent une mort cellulaire prématurée. La principale production des radicaux libres à l'intérieur de l'organisme est le métabolisme, c'est-à-dire la transformation des aliments en énergie. Les sources externes sont le stress, le tabac, l'alcool, la pollution et les additifs

<sup>1</sup> FAVIER A., 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr . Mémoire de Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. p 64: 390-396.

<sup>2</sup> Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixième Journée de la Recherche Avicole , 2005, p. 554-558.

alimentaires. Si les radicaux libres en viennent à excéder la capacité de l'organisme à les neutraliser, ils peuvent contribuer à l'apparition de plusieurs maladies, dont les maladies cardiovasculaires, certains types de cancers et d'autres maladies associées au vieillissement.

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses antioxydants<sup>3</sup>.

## I.2. Activité antioxydant et les antioxydants :

L'activité antioxydant d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydants sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\bullet$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^\bullet$ )<sup>4</sup>.

Les antioxydants sont des molécules qui aident le corps à lutter contre les radicaux libres en les neutralisant, afin qu'ils deviennent inoffensifs, ils peuvent être classés en deux groupes selon le niveau de leur action : les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires.

### ❖ Les antioxydants primaires :

Ils sont appelés également les antioxydants vrais ou antioxydants radicalaires, sont des molécules (notées AH) capables d'interrompre la chaîne auto catalytique de l'oxydation en bloquant les radicaux lipidiques  $\text{R}^\bullet$  et  $\text{ROO}^\bullet$  par transfert d'un atome d'hydrogène pour reformer RH et ROOH. De la même manière, ils peuvent transformer les radicaux  $\text{RO}^\bullet$  en ROH, bloquant ainsi la formation des aldéhydes.

### ❖ Les antioxydants secondaires :

Ils sont appelés aussi préventifs qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres.

<sup>3</sup> Diallo A., Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (Myrtacées), Thèse de Doctorat en Pharmacie université de Bamako, 2005, p.11, 13.

<sup>4</sup> Barus C., Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et diphasique - Application aux produits cosmétiques, Thèse de Doctorat université de Toulouse, 2008, p.8

Ce sont des molécules exogènes ; des substances décomposant les hydro-péroxydes en alcools, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou des disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes<sup>5</sup>.

### **I.3. Types d'antioxydants :**

Les tissus végétaux contiennent un réseau de composés qui contrôlent le niveau d'espèces réactives d'oxygène. L'effet oxydatif de ces dernières peut être minimisé par l'utilisation d'antioxydants. Il existe deux sources d'antioxydants :

#### **❖ Sources synthétiques:**

Ils constituent une source importante d'antioxydants comme l'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'hydroxyanisole butylé (BHA).

#### **❖ Sources enzymatiques:**

Les antioxydants d'origine alimentaire sont nombreux, certains sont liposolubles comme le tocophérol;  $\beta$  carotène; lycopène, d'autres sont hydrosolubles comme l'acide ascorbique; et d'autre sont plus hydrosolubles que liposolubles comme les polyphénols.

Les antioxydants synthétiques sont nocifs et cancérogènes ; pour cette raison, l'application d'extraits de plantes naturelles comme antioxydants enzymatiques dans l'industrie alimentaire devient de plus en plus importante.

En outre, il a été rapporté que l'utilisation d'antioxydants naturels peut protéger les effets nocifs des radicaux libres induits chez le corps humain Dans ce contexte, les huiles essentielles et leurs composants ont été intensément criblés pour leurs activités antioxydantes dans les industries alimentaires, en raison de leur état de sécurité relative et de leur large acceptation par les consommateurs<sup>6</sup>.

<sup>5</sup> Dacosta Y., Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques, Ed. Yves Dacosta, Paris, 2003, p. 317

<sup>6</sup> Niki, E. (2012). Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? FEBS Lett. 586: 3767–3770.

### I .4.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Plusieurs méthodes ont été développées pour tester la capacité de piégeage d'un radical libre et l'activité antioxydante totale d'un extrait de plante selon (tableau 03)<sup>7</sup>.

Tests	DPPH	ABTS ou TEAC	FRAP	ORAC
Mécanismes réactionnels	-transfert d'électron majoritaire	-transfert d'électron et de proton	-transfert d'électron	-transfert de proton
Nature des molécules testées	-hydrophiles et lipophiles	-hydrophiles et lipophiles	-hydrophiles	-hydrophiles et lipophiles
Avantages	-très faciles à mettre en œuvre -peu couteux	-très faciles à mettre en œuvre - cinétique de la réaction très rapide -peu couteux	-très faciles à mettre en œuvre - peu couteux	-faciles à mettre en œuvre - couteux (nécessite d'un fluorimètre)
Inconvénients	-encombrement stérique de molécules à haut poids moléculaires - interférences possible à 515 - forte décondense au PH et au solvant -radical inexistant in vivo	-produit de dégradation antioxydant -radical inexistant in vivo	-PH utilisé non physiologique - interférences possibles à 595nm	- mécanismes de génération des ROO° non physiologique - interférences possibles des protéines
Référence	(Brand-William et al. 1995 Pinelo et al. 2004)	(Awika et al., 2003 ;Arts et al.,2004 ;Osman et al.,2006)	(Benzie et Strain, 1996 ;Ou et al,2002)	(Ou et al ,2001 ; Lopez et al, .2003)

**Tableau 03 :** Quelques tests d'évaluation de l'activité antioxydante.

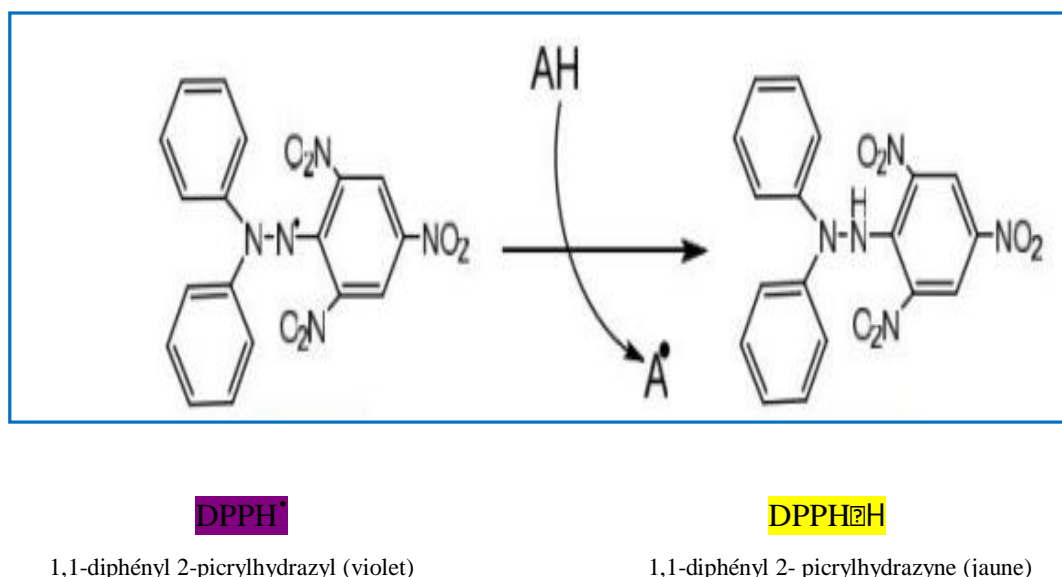
<sup>7</sup> Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-zarawska, E. et Swiader, K. (2007). Antioxydant tannins from Rosaceae plant roots. Food chemistry 100 : 579-583.

### I.5. Test DPPH :

La méthode de DPPH° a d'abord été décrite par Blois en 1958, et a ensuite été largement modifiée par de nombreux chercheurs. Le DPPH° (1,1-diphényl -2-picrylhydrazyle) (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> ; M= 394,33g/mole) est un radical libre stable, de couleur violette (Figure 23) qui réagit avec des composés qui peuvent donner un atome d'hydrogène, mais il est sensible à la lumière, à l'oxygène, au pH et à la nature du solvant utilisé<sup>8</sup>.

#### ❖ Principe :

Cette méthode est basée sur le principe que le DPPH° accepte un atome d'hydrogène (H) à partir d'une molécule scavenger par exemple un antioxydant, résultant une réduction du DPPH° en DPPH<sub>2</sub>, un changement de la couleur (violette) en jaune, avec une diminution concomitante de l'absorbance à 515nm. Le degré de changement de la couleur est proportionnel à la concentration et à la puissance des antioxydants. L'activité antioxydant est ensuite mesurée par la diminution de l'absorbance à 515nm. Une grande diminution de l'absorbance du mélange réactionnel indique une activité significative du balayage du composé à l'essai<sup>9</sup>.



**Figure 22:** Forme libre et réduite du DPPH°

<sup>8</sup> Brand-Williams W., Cuvelier M. & Berset C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Sci. Technol. 28(1): 25-30.

<sup>9</sup> Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH° assay: A critical review and results. Food Chemistry 130: 1036-1043.

## II. Activité antibactérienne :

L'organisme humain, constamment exposé à une multitude de microbes, bactéries, virus, parasites, champignons), possède un système complexe de défense qui lui permet de rencontrer ou d'héberger ces microbes sans leur permettre d'envahir ses tissus. Cependant, dans certaines conditions, l'infection peut entraîner une maladie infectieuse grave.

Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde entier, et causent de lourdes pertes au niveau économique. Aux Etats Unis seuls, ces pertes sont d'environ 20 billions de dollars par an. De nombreux programmes ont été conduits pour découvrir et développer de nombreux agents antimicrobiens d'origine biologique<sup>10</sup>.

### II.1. Evaluation de l'activité antibactérienne :

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon .Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients<sup>11</sup>.

### II.2. Souches bactériennes utilisé :

#### ❖ *Escherichia coli* :

Elle a été isolée pour la première fois par Escherichia en 1885. Elle est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes Elle est actuellement la seule espèce homologuée du genre *Escherichia*. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire.

<sup>10</sup> Rhayour K., Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, Bacillus subtilis et Mycobacterium phlei Mycobacterium fortuitum , Thèse de Doctorat de Biologie Cellulaire université de Fès, 2002, p.2.

<sup>11</sup> Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. Int. J. Food Microbiol. 94, 223-253.

**❖ Staphylococcus aureus :**

Elle a été identifiée de l'aube de l'ère pasteurienne par Pasteur en 1820. Les bactéries de l'espèce *S. aureus* sont des coques à gram positif de 0.5 à 1.5 µm de diamètre, les toxico-infections alimentaires à *S. aureus* sont en réalité des intoxications dues à l'ingestion d'aliments, et responsable d'un très grand nombre d'infection chez l'homme et animale, le plus souvent impliqués dans les infections cutanées muqueuses et digestives.

**❖ Pseudomonas aeruginosa :**

*Pseudomonas aeruginosa*, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, bacille du pus bleu, est une bactérie gram-négative du genre *Pseudomonas*. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles. Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés)<sup>12</sup>.

**❖ Listeria :**

*Listeria* est un genre bactérien, qui compte 20 espèces, dont *Listeria monocytogenes*, seul pathogène pour les humains où il provoque la listériose (l'une des zoonoses les plus graves). Les autres espèces comprennent, entre autres, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii*, *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis*, *Listeria grayi*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria costaricensis*, *Listeria goensis* et *Listeria thailandensis*.

Les *Listeria*, nommées d'après Joseph Lister, qui les a découvertes, sont des bacilles de petite taille, mobiles à 20 °C (grâce à des flagelles), gram positif. Toutes les espèces sont catalases positives, non sporulées, et anaérobies facultatifs. Ce sont des bactéries ubiquistes qu'on trouve presque partout ; dans le sol, en épiphyte sur les végétaux, l'eau, etc. Très résistantes, elles peuvent survivre aux traitements de nettoyage-désinfection et ainsi persister dans les ateliers de production de l'industrie agroalimentaire<sup>13</sup>.

<sup>12</sup> Monteil. H, Avril. J (1992) : Bactériologie chimique. 4<sup>ème</sup> Ed. MarKeting. Paris

<sup>13</sup> Renato H. Orsi et Martin Wiedmann, « Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009 », *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no 12, 1<sup>er</sup> juin 2016, p. 5273-5287 (ISSN 0175-7598 et 1432-0614, PMID 27129530, PMCID PMC4875933, DOI 10.1007/s00253-016-7552-2, lire en ligne [archive], consulté le 18 avril 2017)

# Parti expérimentale

*On n'est pas vieux tant qu'on  
cherche.*



## Chapitre IV : Matériel et méthode

*Fais de ta vie un rêve, et  
d'un rêve, une réalité.*

### I.1. L'objectif de l'étude :

L'objectif de ce travail est la détermination des compositions chimiques et l'activité antioxydant de l'extrait d'huile essentiel d'*Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf).

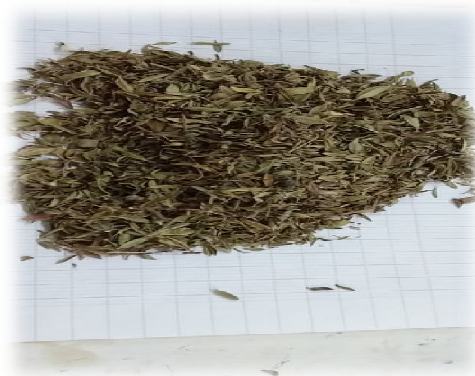
Ce travail est réalisé dans laboratoire de l'universitaire Abbes Laghrour de kenchela.

Les tests de composition chimique et l'activité antioxydant ont été effectués au niveau du laboratoire de recherche.

## II. Matériels :

### II.1. Matériels végétal :

Le matériel végétal utilisé comme source des extraits naturels est la partie aérienne *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.). Ce dernier est provient du marché local, ensuite séché à l'ombre à température ambiante. L'échantillon est broyé à l'aide d'un Mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, conservés dans des bocaux à labri de lumière jusqu'à son utilisation.



**Figure23:** Feuilles des plantes après séchage d'*Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf).

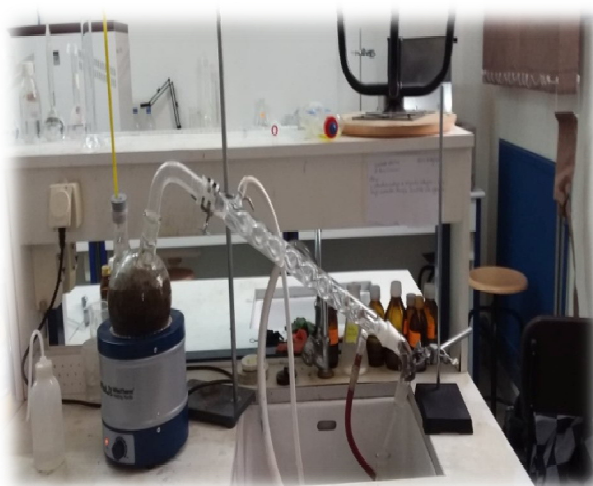


**Figure 24** : broyage d'*Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf).

## **II.2. extraction des huiles essentielles :**

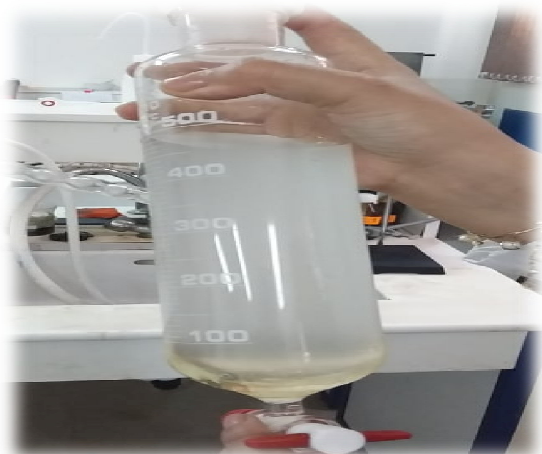
### **II.2.1 l'hydrodistillation :**

L'obtention des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne. Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles Essentielles. On place la matière végétale sèche 100 g ont été introduits dans un grand ballon en verre on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'une chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers un réfrigérons où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière l'huile essentielle se sépare par différence de densité.

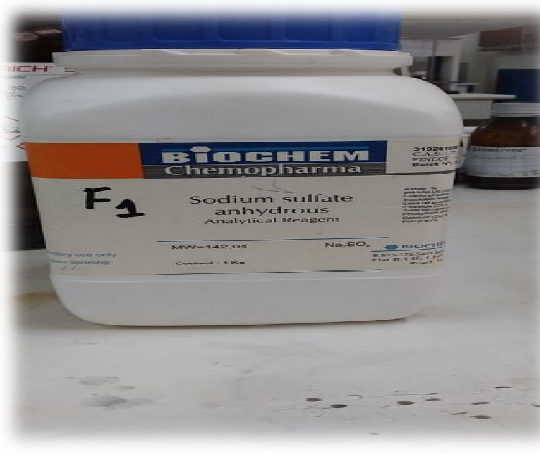


**Figure 25** : Dispositif d'hydrodistillation utilisé à l'échelle du laboratoire.

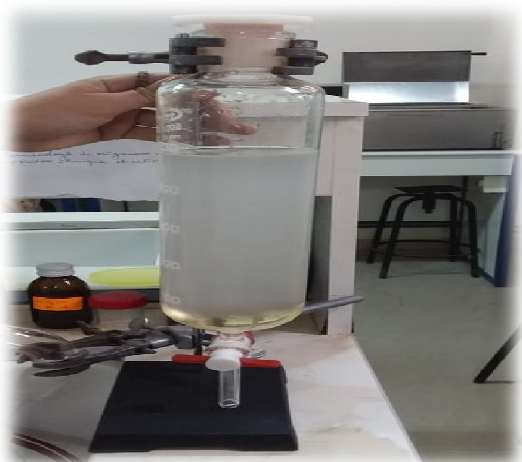
Nous récupérons le distillat, et on le met dans une ampoule à décanter de 500 ml, puis on ajoute 50 ml de dichlorométhane, Après agitation et décantation l'extraction liquide-liquide on obtient deux phase la phase organique sur une phase aqueuse (huile essentielle + hydrolat).



**Figure 26 :** distillat et solvant (Dichlorométhane).



**Figure 27:** sodium de sulfate ( Éliminer les traces d'eau)



**Figure 28 :** décantation de la phase Organique.



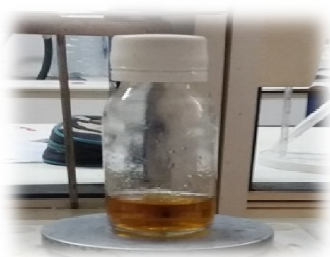
**Figure 29:** Filtration.

- Le filtrat obtenu a été concentré sous vide à 40°c à l'aide du rota à vapeur pour éliminer le solvant.

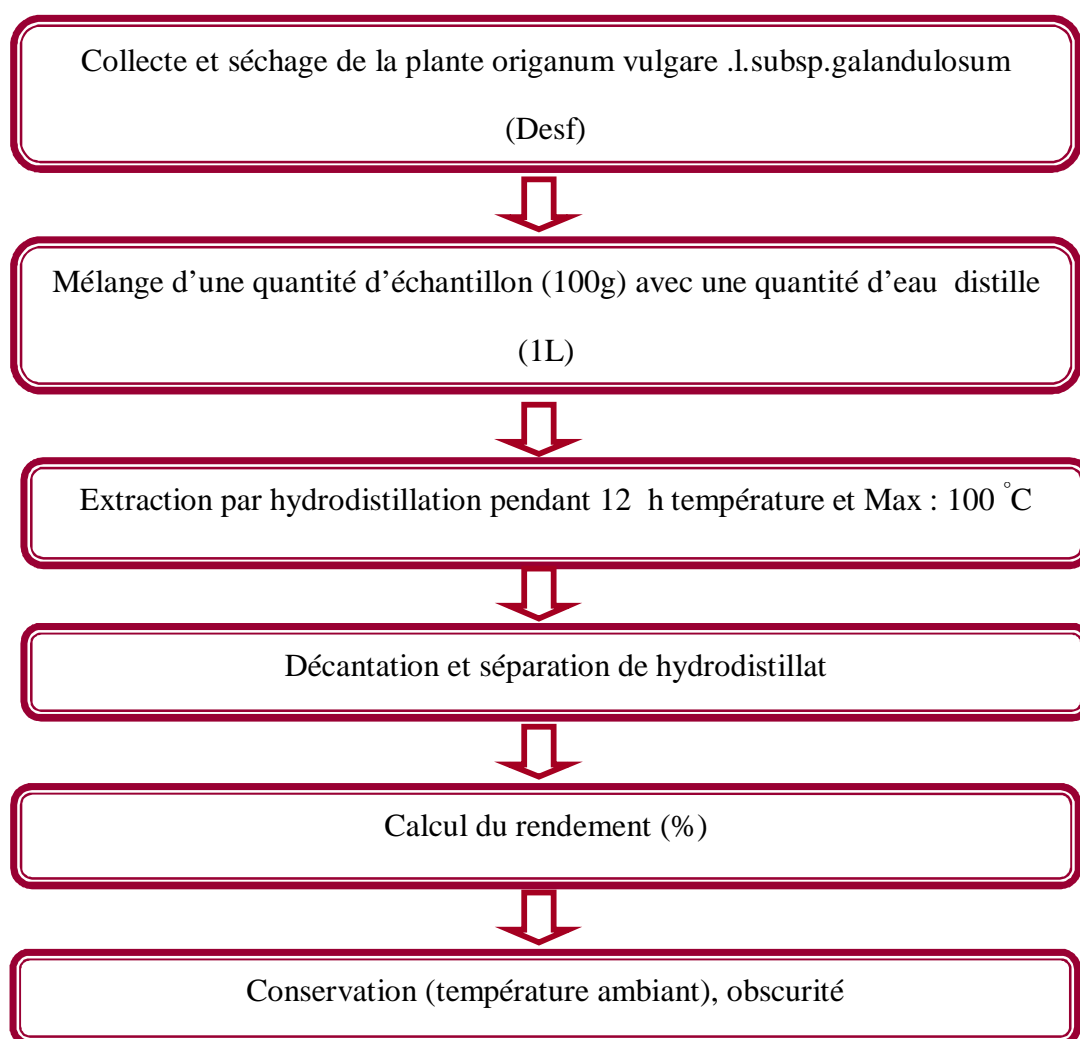


**Figure30 :** évaporation le solvant

- Après filtration et évaporation de solvant par Rota vapeur , L'huile essentielle est récupérée .



**Figure31:** Huile essentielle d'*Origanum vulgare L. subsp. glandulosum* (Desf).



**Figure 32 :** Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle.

### II.2.2. Caractères de l'huile essentielle :

On a identifié des caractères de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf), obtenus par hydrodistillation.

### II.2 .3. Calcul de rendement :

On appelle « rendement » le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la plante à traiter. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé d'après la relation suivante :

$$R = Pa / Pb.100$$

R : rendement en huile essentielle (%).

Pa : poids de l'huile essentielle extraite en g.

Pb : poids de la plante à traiter en g.

### III.1. Analyses de l' huile essentielle :

Après l'extraction de l'huile essentielle de *L'Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.).

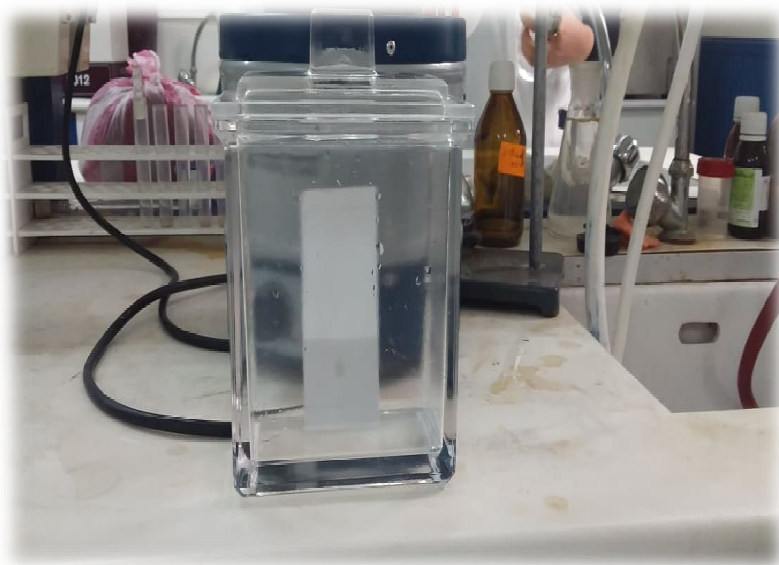
#### III.1.1.Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange des solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Généralement, en chromatographie sur couche mince les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

### III.1.2. Matériel :

- Plaque CCM, cuve chromatographie
- Dans une cuve à élution (pot avec couvercle) verser l'éluant jusqu'à une hauteur de 2,5 cm, l'éluant utilisé est méthanol/ acétate d'éthyle (5 :5 v/v), refermer la cuve avec son couvercle.
- La préparation de la plaque à chromatographie : cette plaque est une feuille de papier d'aluminium recouverte d'une fine couche de silice : tracer à la règle et au crayon à papier, et sans appuyer, une ligne fine à environ 1,9 cm du bord inférieur de la plaque.
- Par un trait fins, repérer les positions des dépôts à effectuer.
- A l'aide d'une micropipette déposer une goutte d'huile essentielle. Le dépôt doit s'effectuer par petites touches brèves, de façon à obtenir une tâche de diamètre égal environ à 2 mm.
- Placer délicatement la plaque dans la cuve, en position verticale ; refermer le couvercle et laisser évoluer l'ensemble jusqu'à ce que l'éluant monte, faire sortir la plaque, et repérer immédiatement par un trait de crayon à papier la hauteur maximale atteinte par l'éluant, ce trait est appelé front de l'éluant (ou front du solvant).

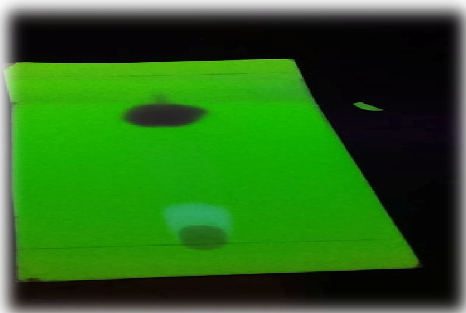


**Figure33** : chromatographie sur couche mince.

- Révélation : après développement, la plaque a été séchée, puis visualisées séparément par une lampe UV à 365 nm. On peut calculer le rapport frontal ( $R_f$ ) pour chaque spot par la relation suivante :

$$R_f = h / H$$

- h : Distance parcourue par la substance.
- H : Distance parcourue par le solvant.



**Figure34** : Révélation de la plaque de CCM par la lampe UV aux longueurs d'onde 365nm.

### III.2. Spectroscopie Infrarouge (IR) :

La spectroscopie infrarouge (IR) est une technique utilisée pour la caractérisation et l'identification des espèces présente dans un échantillon, donc c'est une méthode d'analyse qualitative de nombreuses espèces moléculaires.

L'huile essentielle d'O .glandulosum a été analysée par cette méthode .le spectre infrarouge est enregistré par un spectromètre à transformée de Fourier Perkin Elmer System 2000 FTIR Figure (35) .les fréquences d'absorption sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figure 35:** Le spectro-FTIR.

L'échantillon est traversé par une lumière complexe et on détermine quelle radiation manque à la sortie.

#### **IV.1. Tests phytochimiques :**

Dans le but de connaître la composition des extraits obtenus, des tests phytochimiques sont réalisés en présence de certains réactifs de caractérisation. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation dans le but de mettre en évidence la présence ou l'absence de certains composés chimiques par macération dans le méthanol aqueux.

La macération : est un procédé qui consiste à laisser séjourner un solide dans un liquide froid pour en extraire les composés solubles, ou bien pour qu'il absorbe ce liquide afin d'en obtenir le parfum ou la saveur, pour le conserver ou pour qu'il s'y décompose<sup>1</sup>.

##### **IV.1.1. Préparation des extraits bruts méthanoïque :**

Dans un erlenmeyer on a ajouté 52g de matériel végétal avec 96 ml de méthanol et de 24 ml de l'eau distille. Le mélange est macéré pendant 24 heures. Nous avons fait la filtration de ce mélange. L'extrait est réuni et est évaporé à l'aide d'un rotavapor à 40°C (figure 37).

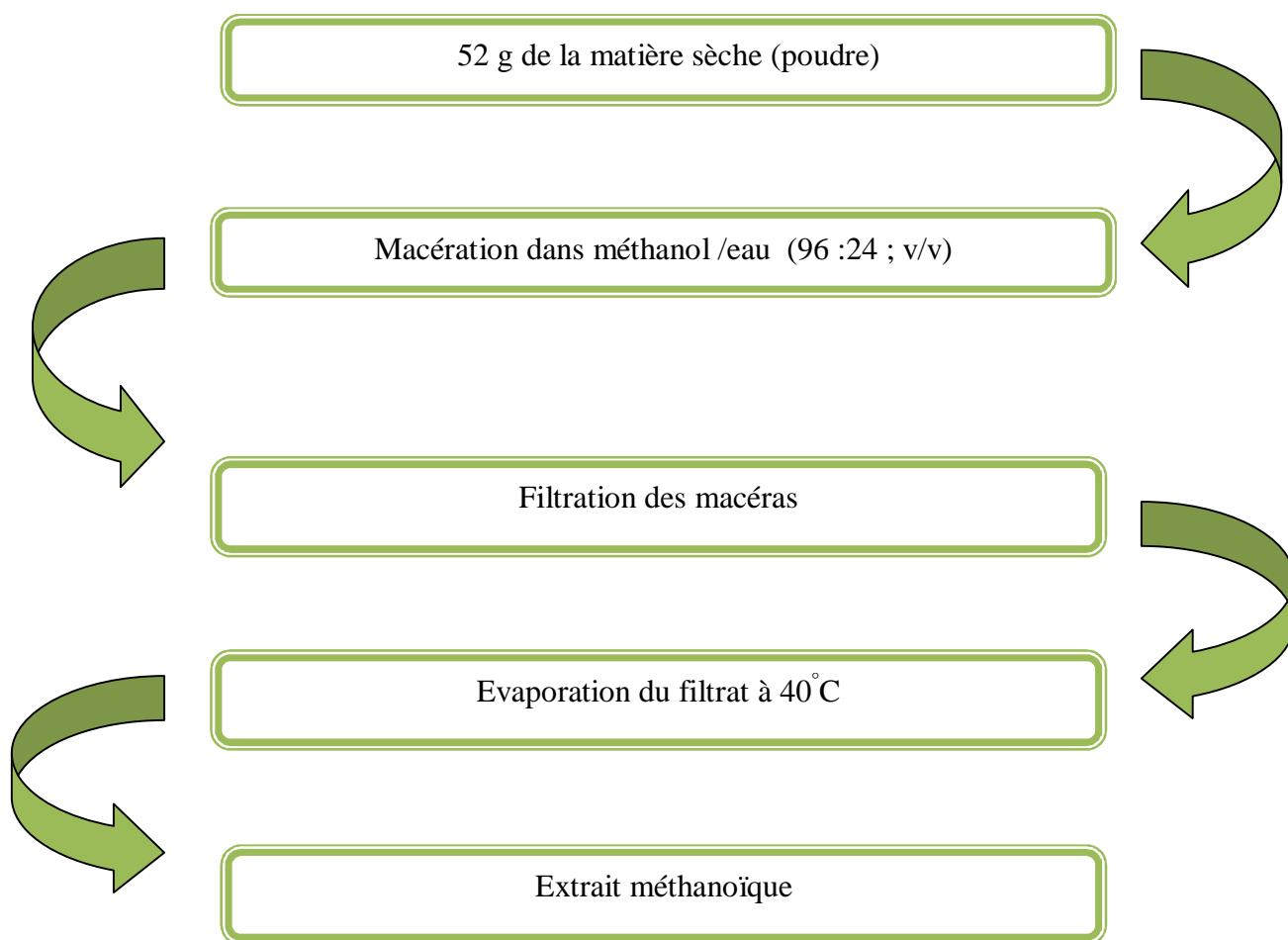


**Figure36** : filtration de mélange.

<sup>1</sup> Dictionnaire de la langue française : lexis, Paris, Larousse, 1989 (1re éd. 1979) (ISBN 2-03-320211-9), p. 2. Macérer



**Figure 37:** Evaporation le filtrat.



**Figure 38:** extraction méthanoïque

**IV.1.2. Détection des flavonoïdes :**

- 5 gouttes de l'acide chlorhydrique HCl concentré, 2 ml de méthanol chaud et quelques grains de tournures de magnésium sont ajoutés à 10 ml d'extrait. L'apparition de la coloration rouge orangé, après 3 min d'incubation à température ambiante, indique la présence des flavonoïdes.

**IV.1.3. Détection des stéroïdes et triterpénoïdes:**

- À 10 ml de l'extrait précédent, on ajoute 0.5 ml de chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) et 0.5 ml d'acide Acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (sur la paroi interne du tube à essai). L'ensemble est agité puis incubé pendant 30 min à température ambiante. Une couleur virée du violet au bleu ou vert révèle la présence des stéroïdes. Une couleur rouge- marron de la couche d'interface révèle la présence des tritèrènes.

**IV.1.4. Détection Des Tanins :**

- Dans un tube à essai contenant 2 ml de extrait, ajouter 3 gouttes d'une solution de chlorure ferrique  $\text{FeCl}_3$  et 2 ml de eau chaud. Après quelques minutes d'incubation à température ambiante, le chlorure ferrique développe une coloration verdâtre qui indique la présence des tanins catéchiques ou bleu-noirâtre qui révèle l'existence des tanins galliques.

**IV.1.5. Détection des alcaloïdes :**

- On ajoute 10 ml d'HCl et 0.5 ml carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans un tube à essai contenant 50ml de extrait, on prélève 3 ml et on ajoute le réactif de Mayer, La formation d'un précipité blanc jaunâtre (par le réactif Mayer)
- Réactif de Mayer : 0.14 g d' $\text{HgCl}_2$  et 0.5 g de KI dans l'eau distillée. Mélanger et ajuster le volume total à 10 ml.

**IV.1.6. Détection des saponosides :**

- Introduire un volume de 2 ml de extrait dans un tube à essai et l'ajusté à 5 ml avec de l'eau distillée. Agiter les tubes pendant 15 secondes dans le sens de la longueur puis

laisser reposer pendant 20 minutes .La teneur en saponosides est évaluée selon les critères suivants

- Pas de mousse : test négatif
- Mousse moins de 1 cm : test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm : test positif
- Mousse plus de 2 cm : test très positif.

#### **IV.1.7. Détection des coumarines :**

- Une quantité de 10ml d'extrait est solubilisée dans 2 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égale dont la première représente un témoin et la deuxième est traitée avec 0.5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines.

### **V. L'ACTIVITE BIOLOGIQUE :**

#### **V.1 .l'activité antioxydante :**

##### **V.1.2.Evaluation de l'activité antioxydante :**

L'activité antioxydant des huiles essentielles et des extraits méthanique d'O .glandulosum est étudiée qualitativement par dépistage sur CCM à l'aide du DPPH et quantitativement par le piégeage du radical DPPH.

##### **V.1.3.Dépistage de l'activité antioxydant sur CCM à l'aide du DPPH :**

Les méthodes d'évaluation du caractère antioxydant sont nombreuses et peuvent être qualitative ou quantitative. Les méthodes qualitative utilisées pour repérer l'activité antioxydant des composes sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la déclaration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants .une des méthodes les plus utilisées pour la détection d'antioxydant est la chromatographie sur couche mince (CCM).

Le test chimique que nous avons utilisé pour déceler la présence de composés antioxydant dans l'huile essentielles de plante étudiée repose sur le principe de la réduction des radicaux libres fournis par le 1,1-Diphényl-2-picrylHydrazyle(DPPH).

- Pour réaliser ce test, on dépose 5 $\mu$ l d'une solution de 1mg/ml d'huile essentielle sur la plaque de gel de silice possédant un support en aluminium.
- Le développement des plaques se fait dans le système de solvants méthanol- acétate d'éthyle (10:10 ; v/v).Après migration, les chromatogrammes sont séchés à l'aide d'un séchoir électrique puis révélés à l'aide d'une solution de DPPH à la concentration de 0,02mg/ml dans le méthanol.Ils sont alors maintenues à température ambiante pendant 30 minutes .L'apparition de taches jaunes formées à partir du blanchiment de couleur pourpre du réactif de DPPH évaluée comme activité antioxydant positive.

#### **V.1.4.Test de piégeage du radical libre DPPH :**

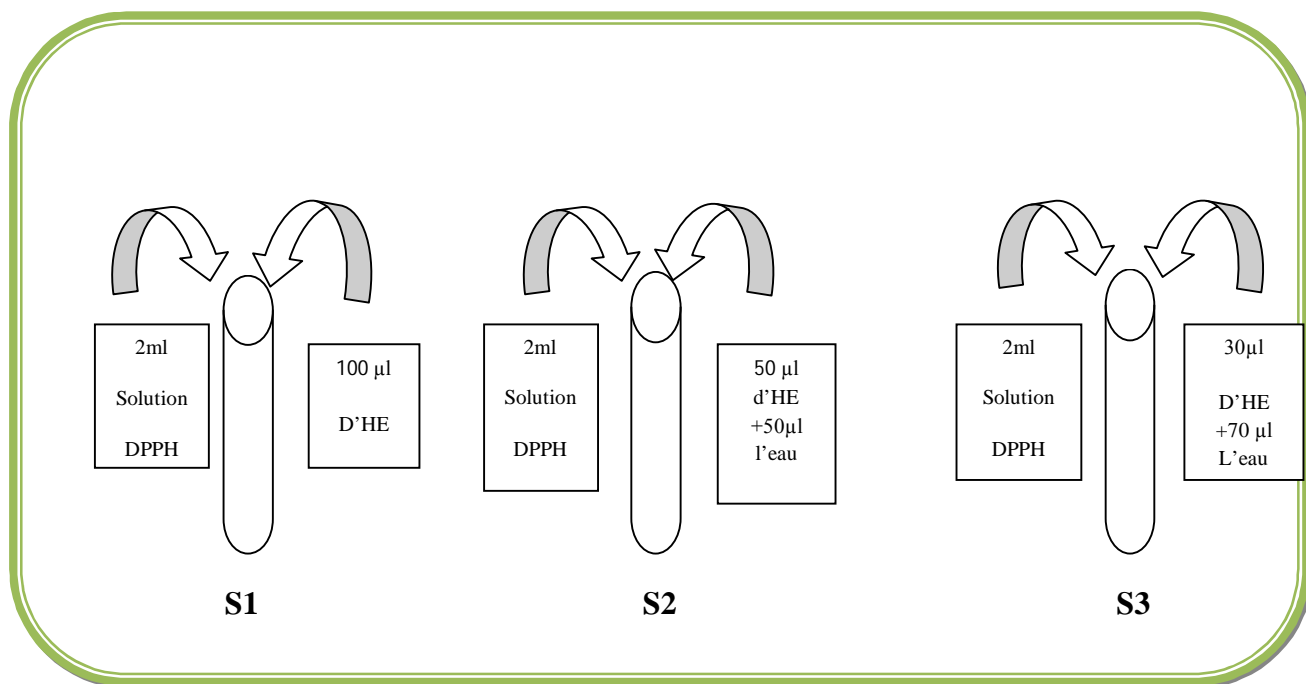
##### **V .1.4.1.Mode opératoire :**

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2.4mg de DPPH dans 100ml de méthanol (elle ne conserve pas plus de 4-5 jours à l'obscurité).

Un volume de 100 $\mu$ l d'huiles essentielles (à différentes concentrations) a été ajoutée pendant 30 min à l'obscurité et à la température ambiante. Les absorbance ont été mesurées à 517 nm contre le blanc (DPPH /méthanol).



**Figure 39 :** spectrophotomètre.



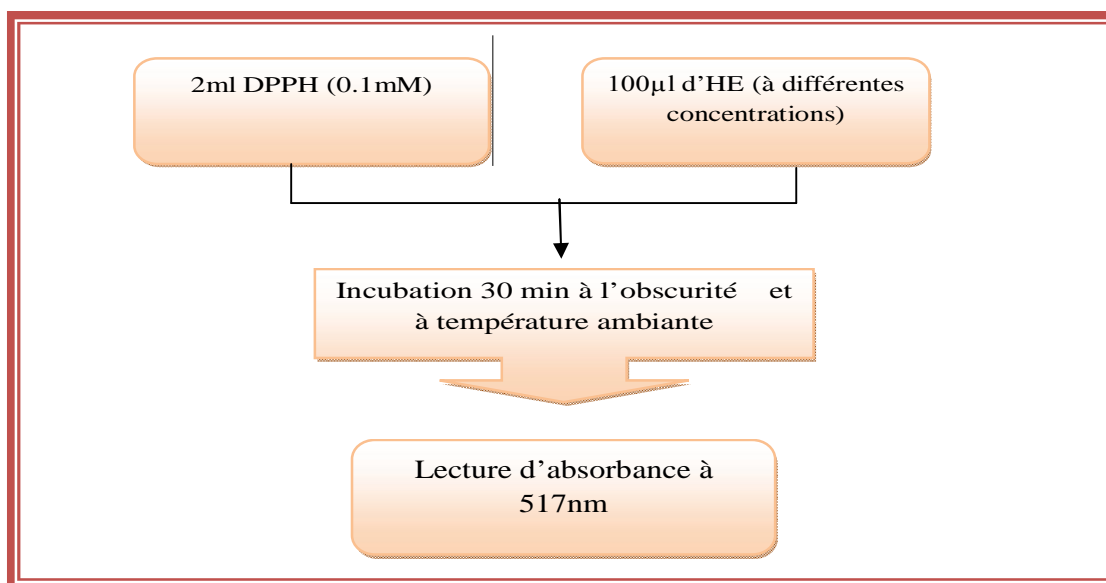
**NB :** il est nécessaire d'effectuer 3 répétitions pour chaque concentration de l'huile essentielle

**S1 :** 2ml solution (DPPH/méthanol) + 100 $\mu$ l d'huile essentielle.

**S2 :** 2ml solution (DPPH/méthanol) + 50 $\mu$ l d'huile essentielle + 50 $\mu$ l l'eau distille.

**S3 :** 2ml solution (DPPH/méthanol) + 30 $\mu$ l d'huile essentielle + 70 $\mu$ l l'eau distille.

✓ On peut résumer :



**Figure 40 :** Protocole de réduction de radical DPPH.

### V .1.4.2.Expression des résultats:

-Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire où l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [(Abs\ témoin - Abs\ teste)] / (Abs\ témoin) \times 100$$

Abs témoin : l'absorbance du radical DPPH + Méthanol.

Abs teste : l'absorbance de l'échantillon ; radical DPPH + Méthanol.

% I : pourcentage d'inhibition.

Sachant que Abs contrôle l'absorbance du blanc (DPPH /méthanol).

- La réalisation d'une cinétique de l'activité antiradicalaire a permis de déterminer le paramètre  $IC_{50}$ , défini étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de DPPH de 50%, elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante.

- L'indice de l'activité antioxydante (AAI) est calculé selon l'équation suivante :

$$AAI = concentration\ finale\ de\ DPPH\ (\mu g/ml) / IC_{50}\ (\mu g/ml)$$

Les résultats d'AAI sont exprimés comme suit :

$AAI < 0.5$  ———> faible activité antioxydante.

$1 > AAI > 0.5$  ———> activité antioxydante modérée.

$2 > AAI > 1$  ———> forte activité antioxydante.

$AAI > 2$  ———> très forte activité antioxydante.

## V.2. L'activité antibactérienne :

### V. 2.1. Mode opératoire :

Les tests microbiologiques ont été effectués au laboratoire de la recherche biologique université « Abbés Laghrour ».

On suit le protocole suivant :

#### 1- Préparation du matériel et produits

- \_ Milieu de culture (Gélose Meuler Hinton).
- \_ Souches microbiennes : Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Staphylococcus aureus ATCC 25923 et Listeria ATCC 19115
- \_ Eau physiologie.
- \_ Boîtes de pétri.
- \_ Tubes à essai.
- \_ Disques de papier filtre.
- \_ Pipette pasteur.
- \_ Anse pour prélèvement de colonie microbienne.
- \_ Bec bunsen.
- \_ Poupinel.

2- Après avoir décongelé le milieu de culture dans un Poupinel, on le colle dans les boîtes de pétri puis on laisse ces dernières refroidir pendant 20 à 30 min.

3- On prépare une suspension bactérienne dans l'eau physiologique en prélevant à l'aide d'une anse stérile, une petite quantité de la colonie microbienne puis on l'émerge dans le tube contenant l'eau physiologique. On laisse le mélange pendant 15 min.

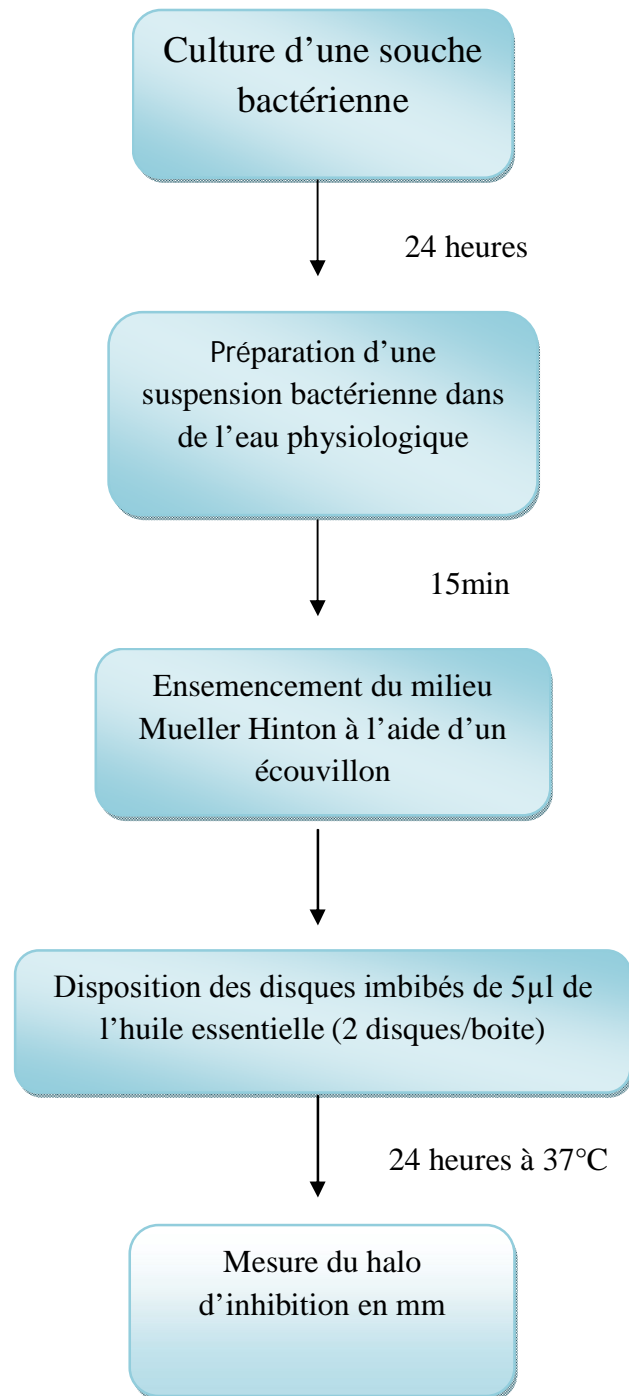
4- On étale le contenu du tube à la surface du milieu culture.

5- On imbibe les disques par les huiles déposés à la surface de la boîte.

6- Incubation à 37°C pendant 24 H

7- Mesure du diamètre de zone d'inhibition.

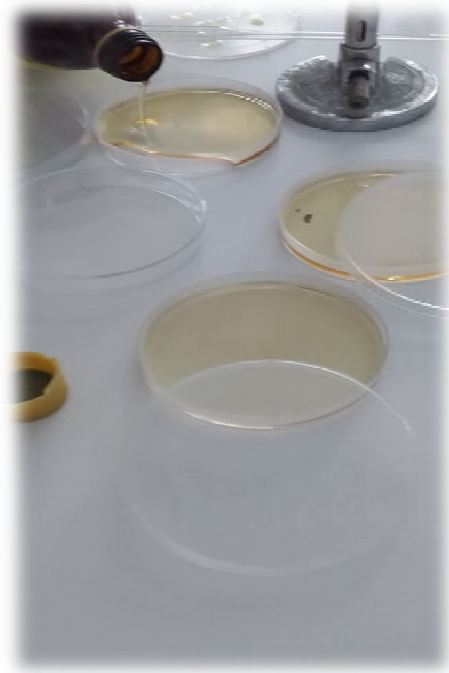
**NB.** Toutes les opérations doivent être effectuées dans une zone stérile devant un Bec bunsen.



**Figure 41:** Etapes de réalisation du test de l'activité antibactérienne.



**Figure 42 :** préparé les disques.



**Figure43:** la coulée des boîtes de pétrie.

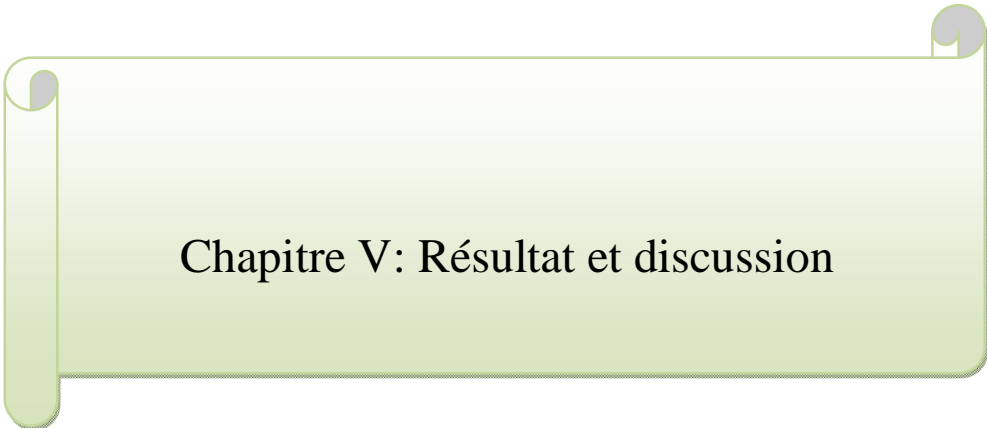


**Figure44 :** boîtes continu gélose.



**Figure45 :** les souches utilisées.

messieurs membres du jury, honorables assistance bonjour. J'ai l'honneur de vous présenter mon travail de thèse de master lmd intitulé ..... sous la direction de prof



## Chapitre V: Résultat et discussion

*Tout ce qui se ressemble n'est pas identique.*

## I.1. EXTRACTON DE L'HUILE ESSENTIELLE :

### I.1.1. Caractérisation d'huile essentielle:

Les caractérisations de l'huile essentielle de L'Origanum vulgare L. subsp. glandulosum (Desf.) obtenus par hydrodistillation ayant de coloration jaune relativement foncé , odeur forte ,un persistantes et une aspect liquide limpide .

Les résultats sont présentés dans le tableau (04) si dessous :

Origine	Caractérisation			
	Aspect	Couleur	Odeur	Point d'ébullition
HE obtenus au Laboratoire	Liquide limpide	Jaune foncé	Forte et persistantes	130°C

**Tableau04 :** Caractérisation d'HE d'O .glandulosum.

### I.2.2.Le rendement d'huile essentielle:

Le rendement de l'HE de la plante est présente dans le tableau (05) Les résultats obtenu sont des moyennes de trois répétions de L'échantillon L'Origanum vulgare L. ssp. glandulosum (Desf.).

Extraction N°	Poids végétal (g)	Poids d'H.E (g)	Rendement en H.E %
1	150	1,84	1,23
2	150	2,58	1,72
3	150	2,85	1,90
La moyenne			1,61

**Tableau 05:** Rendement d'HE d'O .glandulosum .

Le résultat du tableau (05).montre que l'extraction à partir de la plante sèche donne un rendement très important.

## II.1 Analyses des huiles essentielles :

### II.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La révélation chimique et visualisation sous UV à 254 nm, a été réalisée après l'analyse qualitative de CCM.

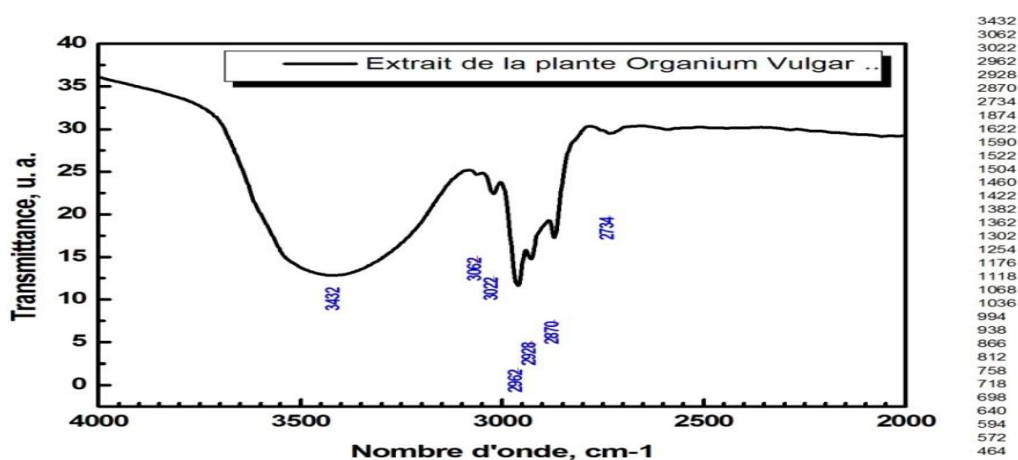
Pour la fraction MeOH / Acétate d'éthyle (10 / 10 v/v), on a trouvé une seule tache. Les résultats de cette analyse sont exprimés dans le tableau suivant :

Système	MeOH / Acétate d'éthyle (10 / 10 ; v/v)
Nombre de tache	Une tache majoritaire
R <sub>f</sub>	0.75

**Tableau 06** : les résultats de chromatographies sur plaque CCM.

### II.1.2. Interprétation des analyses infra rouge des huiles essentielles :

Le spectre IR d'*O. glandulosum* représenté dans la figure (46) est caractérisé par une bande large forte à 3432 cm<sup>-1</sup> de vibration d'élongation de O-H de l'alcool et phénol, 3022 cm<sup>-1</sup> une fine bande caractéristique de vibration d'élongation de la liaison C-H de Alcènes, 2962 cm<sup>-1</sup> une bande fine forte de vibration d'élongation de CH<sub>3</sub>Alcane et une bande à 2928 cm<sup>-1</sup> fine moyenne de vibration d'élongation asymétrique CH<sub>2</sub> Alcane, et une bande de 2870 cm<sup>-1</sup> moyenne correspondant à une vibration d'élongation de C-H d'un Aldéhyde.



**Figure 46** : spectre FTIR d'huile essentielle.

Fonction	Liaison	Fréquence $\text{cm}^{-1}$	Type de vibration	Intensité
Alcool et phénol	O-H Lié	3432	élongation	Fort ; large
C=CH Alcènes	C-H	3022	élongation	Moyenne
CH <sub>3</sub> Alcanes	C-H	2962	élongation	Fort ; Fine
CH <sub>2</sub> Alcanes	C-H	2928	élongation asym	Moyenne
Aldéhyde	C-H	2870	élongation	Moyenne

**Tableau 07 :** spectre FTIR d'huiles essentielle d'O .glandulosum .

### III.1. Tests phytochimiques :

Dans ce travail, l'existence des composés chimiques dans la matière végétale broyée de la plante d'O .glandulosum a été vérifiée par des tests bien précis:

#### III.1.1. Flavonoïdes :

L'apparition d'une coloration légèrement rouge-orangé indique la présence des flavonoïdes.



**Figure 47:** Test d'identification des Flavonoïdes.

#### III.1.2. stéroïdes et triterpénoïdes :

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration virée du violet révèle la présence des stéroïdes. Une couleur rouge- marron de la couche d'interface révèle la présence des tritèrènes.



**Figure 48 :** Test d'identification des stéroïdes et triterpénoïdes.

### **III.1.3. Tanins :**

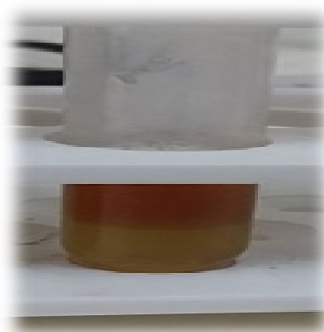
Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-verte et un précipité, donc présence de tanins.



**Figure 49 :** Test d'identification des Tanins.

### **III.1.4. Alcaloïdes :**

Un test positif est révélé par léger précipité blanc-jaunâtre, donc présence de alcaloïdes.



**Figure50:** Test d'identification des Alcaloïdes.

### III.1.5. saponosides :

Test faiblement positif, la mousse de la couche d'interface indique la présence de saponosides.



**Figure51:** Test d'identification des saponosides.

### III.1.6. Coumarines :

Après examen sous UV, on a une fluorescence bleue, donc une présence des coumarines.



**Figure52 :** Test d'identification des Coumarines.

Les tests phytochimiques réalisés sur la plante d'*O. glandulosum* révèlent la présence de différentes familles de composés dont les résultats sont présentés dans le tableau (08).

Composés	Plante
Flavonoïdes	++
stéroïdes et triterpénoïdes	+++
Tanins	+++
Alcaloïdes	++
saponosides	+
Coumarines	++

**Tableau 08:** Analyse phytochimique préliminaires d'*O. glandulosum* .

Les résultats sont interprétés comme suit :

Le signe (+) : présence des traces de principe actif.

Le signe (+ +) : présence d'une qualité appréciative de principe actif.

Le signe (+ + +) : plante riche en principe actif.

#### **IV.ETUDE DES ACTIVITES BIOLOGIQUES :**

##### **IV. 1. Evaluation de l'activité antioxydante :**

##### **IV .1.1.Test DPPH sur plaque CCM :**

Afin de visualiser qualitativement la capacité de piégeage des radicaux libres de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum*, on les a soumis à un test sur plaques de CCM en gel de silice. Avec le réactif DPPH comme révélateur, des taches jaunes sont apparues après la pulvérisation de la plaque. En se basant sur l'intensité de la couleur de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* qui avait le pouvoir antioxydant le plus important. L'huile essentielle d'*O. glandulosum* présenté une faible colorations de leurs taches.



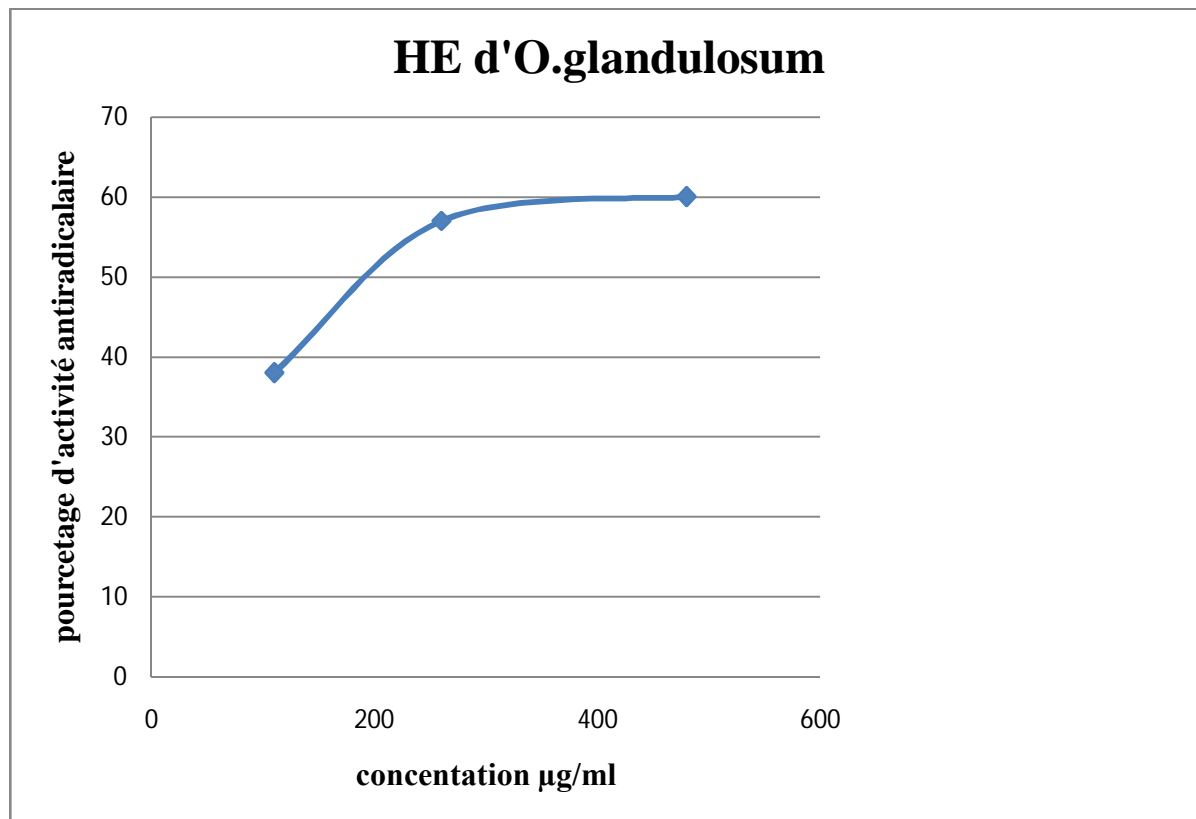
**Figure53:** Activité antioxydante sur plaque CCM.

##### **IV.1.2. Test DPPH mesuré au spectrophotomètre :**

L'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* est évaluée par le test de piégeage du radical DPPH. Il est bien connu que quand une solution de DPPH est mélangée avec celle d'une substance contenant des antioxydants, le radical libre stable DPPH (couleur violette foncée) est converti 1,1-diphényl 2-picrylhydrazyl en 1,1-diphényl-2-picryle hydrazine ce qui entraîne une décoloration facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer une courbe du pourcentage d'activité antiradicalaire de l'huile essentielle. D'après les résultats représentés dans la figure(54), on

peut constater que l'activité antiradicalaire est dépendante de l'augmentation de la concentration des échantillons.



**Figure 54 :** Pourcentage d'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*.

La cinétique du pourcentage d'activité antiradicalaire nous a permis de déterminer l' $IC_{50}$ , qui correspond à la concentration d'huile essentielle, nécessaire à l'inhibition de 50% du DPPH présent dans le milieu. Notant que plus l' $IC_{50}$  est faible plus l'activité antioxydante du composé est importante. Les résultats des propriétés antioxydantes des huiles essentielles de cette plante étudiée sont présentés dans le tableau 09. L'activité est exprimée sous la forme de valeurs d' $IC_{50}$  et d'AAI.

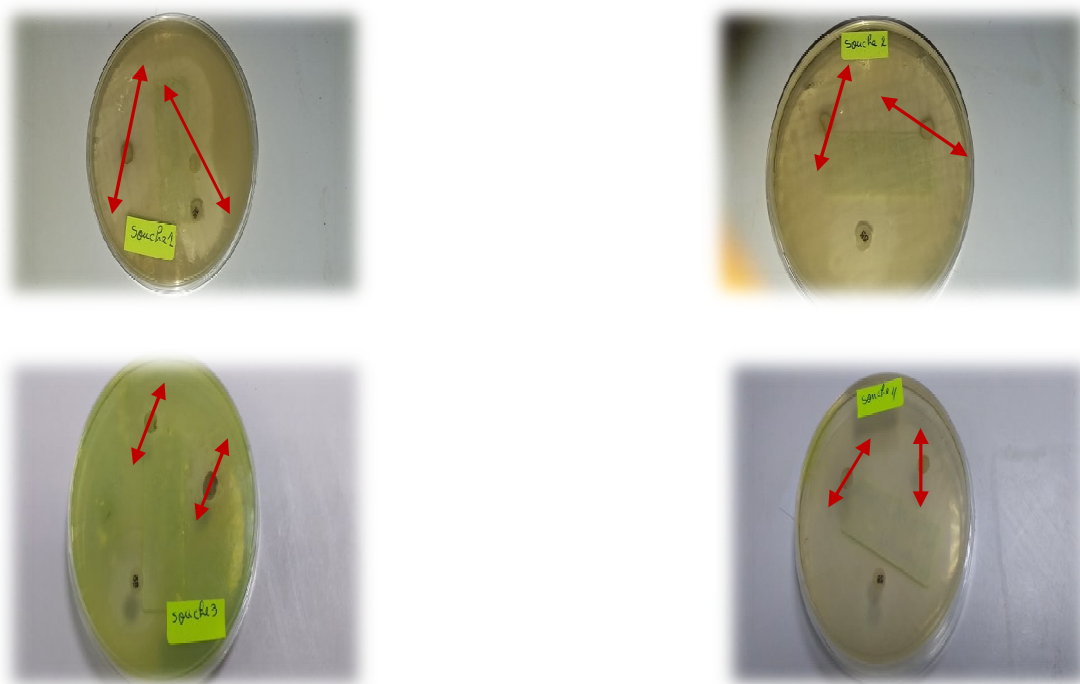
	Echantillon	$IC_{50}$ (µg/ml)	AAI
<b>Origanum glandulosum</b>	Huile essentielle	200	0.3

**Tableau 09:** Activité antioxydante des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*.

L'huile essentielle présente une activité antioxydante faible avec un  $IC_{50} = 200$  µg/ml et un AAI de 0.30 faible activité antioxydante.

## IV.2. Evaluation de l'activité antibactérienne :

Après avoir incubé les boîtes dans l'étuve pendant 24 heures. On les a retirées puis on a mesuré les diamètres des zones d'inhibition en millimètre comme le montre la figure suivante.



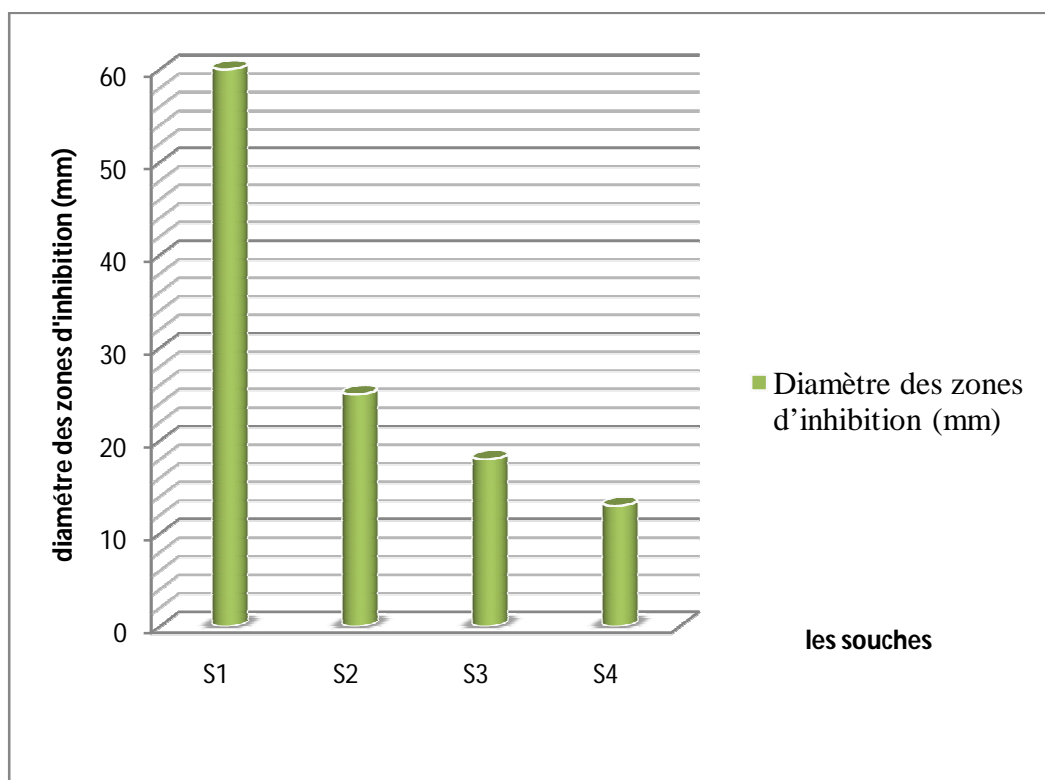
**Figure 55 :** Diamètre des zones d'inhibition.

Les résultats de la mesure des zones d'inhibition d'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* vis-à-vis les bactéries sont résumés dans le tableau(10):

Les souches	Les bactéries	Diamètre des zones d'inhibition (mm)
1	Listeria ATCC 19115	60
2	Escherichia coli ATCC 25922	25
3	Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	18
4	Staphylococcus aureus ATCC 25923	13

**Tableau10 :** zone inhibition (mm) pour les huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*.

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 8 mm .la sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm .Elle est moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm .pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible<sup>1</sup> .



**Figure56 :** Activité antibactérienne d'huile essentielle d'origanum glandulosum.

D'après les résultats précédents on constaté que les zones d'inhibition des huiles sont importantes ce qui signifie leur pouvoir antibactérien.

Il est aussi à signaler que les résultats sont très satisfaisants notamment vis-à-vis de *Listeria* on constaté des grandes zones d'inhibition.

<sup>1</sup> LAMAMRA MEBARKA , contribution de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L) parl.et de *filipendula hexapetala* Gibb.UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF.



## Conclusion générale

*Les portes de l'avenir sont ouvertes  
à ceux qui savent les pousser.*

### *Conclusion générale*

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés physicochimique, antioxydantes et antibactérien très importantes.

Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur l'huile essentielle extraite de cette plante aromatique.

L'extraction de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* qui a été réalisée par hydrodistillation a fourni de rendement de 1.61% est très intéressent. L'analyse effectuée par la chromatographie sur couche mince a montré l'existence une composé chimique majoritaires qui constituée l'huile essentielle d'*O. glandulosum*, et par le spectre IR a montré l'existence, l'alcool phénols, Alcènes, Alcanes et Aldéhyde.

Les testes phytochimiques réalisés montrent que les extraits méthanoliques sont les plus riches en ces métabolites secondaires. Ils contiennent des flavonoïdes, des tanins, des alcaloïdes, des saponosides et des stérols et triterpènes et coumarines.

Et en ce qui concerne l'activité atioxydante, l'*O. glandulosum* ont un pouvoir très important avec une faible concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres.

Par contre pour l'activité antibactérienne de l'huile essentielle est très important, avec une inhibition peut aller jusqu' à 60 mm de diamètre.

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation des ressources végétales algériennes, nous avons étudié Plante médicinales, car elles étaient largement utilisées par la population locale, d'*Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf) appartenant à la famille Lamiacée.

Notre travail vise à faire une étude phytochimique et d'évaluer l'activité antioxydante des extraits de plante médicinale.

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation de la matière végétale sèche et broyée. Le rendement obtenu de la plante est 1,61%. L'analyse par chromatographie CCM a révélé la présence un composé, Leur composition a été déterminée par infra rouge.

Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant solvant méthanol. Les teste phytochimique sur la plante a montré que cette plante contient: des flavonoïdes, des stéroïdes et triterpénoïdes, Tanins, des alcaloïdes, saponosides, coumarines.

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été étudiée par le test du piégeage du radical libre DPPH Cette étude a permis de révéler le faible pouvoir antioxydant de cette huile essentielle

D'autre part, L'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé a été réalisée sur quatre souches bactériennes. Les huiles essentielles ont été particulièrement efficaces contre toutes souches bactériennes testées.

**Les mots clé :** *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf), l'activité antioxydante , Huile essentielle, L'activité antibactérienne.

## ملخص

في إطار تميمين الموارد النباتية الجزائرية ، درسنا نبات طبي ، لأنه كان يستخدم على نطاق واسع من قبل السكان المحليين ، *Origanum vulgare L. subsp. glandulosum (Desf)* التي تنتمي إلى عائلة الشفويات.

يهدف عملنا إلى إجراء دراسة التركيب الكيميائي والنشاط المضاد للأكسدة لنبات الطبي .

تم استخلاص الزيت الأساسي عن طريق التحلل المائي للمواد النباتية الجافة والأرضية. العائد الناتج من المصنع هو

1.61٪. كشف تحليل CCM عن وجود مركب ، وتم تحديد تكوينه بالأشعة تحت الحمراء.

تم الحصول على المستخلصات العضوية بواسطة منقوع باستخدام مذيب الميثانول. أظهرت الاختبارات الكيميائية

الضوئية على النبات أن هذا النبات يحتوي على: الفلافونويد ، المنشطات وتريترينويدس ، العفص ، القلويدات ، السابونوزيد ، الكومارين.

تمت دراسة نشاط مضادات الأكسدة للزيوت الأساسية من خلال اختبار إزالة الجذور الحرة DPPH. كشفت

هذه الدراسة عن انخفاض قوة مضادة للأكسدة للزيت الأساسية.

من ناحية أخرى، تم تنفيذ نشاط مضادات الميكروبات بواسطة طريقة الانتشار في وسط غذائي على أربع سلالات

بكتيرية ؛ كانت الزيت الأساسية فعالة بشكل خاص ضد جميع السلالات البكتيرية التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية : *L'Origanum vulgare L. subsp. glandulosum (Desf)*, نشاط مضاد الأكسدة,

الزيوت الأساسية, نشاط مضاد البكتيريا.

## **Abstract**

Within the framework of valuing Algerian plant resources, we studied medicinal plant, because it was widely used by local people, *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf) belonging to the family of the parasites.

Our work aims to study the chemical composition and antioxidant activity of the medicinal plant.

Essential oils were extracted by hydrolysis of dry and terrestrial plant materials. The yield of the factory is 1.61%. CCM analysis revealed the presence of a compound, and its composition was determined by infrared..

Organic extracts were obtained by a hypocritical using methanol solvent. Photochemical tests on the plant showed that this plant contains: flavonoids, steroids, triterpenoids, tannins, alkaloids, saponose and coumarin..

Antioxidant activity of essential oils was studied through the DPPH free radical removal test. This study revealed low antioxidant strength of essential oil ..

On the other hand, antimicrobial activity was carried out by means of the propagation method in the middle of agar on four bacterial strains.

Essential oil was particularly effective against all bacterial strains tested.

**Keyword :** *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf), antioxidant activity, essential oil, antibacterial activity.