



République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur
et de La Recherche Scientifique.



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR KHENCHELA
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Département De Biologie Moléculaire Et Cellulaire

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de :

Master Académique

FILIERE : Sciences Biologiques

OPTION : Biochimie appliquée

Thème

**Étude de l'activité antioxydante de l'huile
essentielle de *Pulicaria odora* L.**

Présenté par:

- LAHDIR Amira
- ABBAOUI Manel

Membres du jury :

Président: M. ZERAIB Azzedine MCB Univ. Abbès Laghrouour -Khenchela

Promoteur : M. BOUSSAA Abdelhalim MAA Univ. Abbès Laghrouour -Khenchela

Examineur: M. RAHAL Khaled MAA Univ. Abbès Laghrouour –Khenchela

Année universitaire : 2020/2021

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

*Nos vifs remerciements vont également à Notre encadreur : **DR ABD ELHALIM BOUSSAA**, pour son précieux conseil et son aide durant toute la période du travail. Ainsi qu'aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions et recommandations. Monsieur **ZERAI B Azzedine** Maître de conférences à l'Université. Abbès Laghrour -Khenchela, pour avoir accepté de présider le jury. Monsieur. **RAHAL Khaled** : Maître-assistant à l'Université. Abbès Laghrour -Khenchela, pour avoir accepté d'examiner notre travail, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Nous adressons notre profond remerciement aussi à l'équipe du laboratoires pédagogique khenchela pour leur aide qu'ils nous ont fourni et les efforts déployés pour faciliter notre travail et surtout pour leurs gentillesse.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



A ma chère mère **Farida**, tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Rien au monde n'égale les efforts consentis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Que dieu te préserve et te procure santé et longue vie.

A mon père **Saïd** l'épaule solide, l'œil attentif et la personne digne de mon estime et de mon respect. Ton affection et ton soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie.

A mes frères **Issam, Aymen, Khalef** et **Raouf**. Et mes adorables sœurs **Imen, Lilya, Rania, Mélissa** et **Yasmine** je ne pourrais jamais exprimer l'attachement et l'affection que j'ai pour vous. Aucun mot ne pourrait exprimer la gratitude et l'amour que je vous porte.

A mes chères amies **Manel, Aya, Bouthayna, Zina, Houda, Nafissa, Sabrina** et **Chaïma** je vous remercie pour les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble. Votre précieuse collaboration et votre soutien amical m'ont été source d'inspiration et d'encouragement.

A tous mes enseignants pour la qualité de l'enseignement qu'ils ont bien voulu me prodiguer durant mes études afin de me donner une formation efficace.

Lahdir Amira



Dédicace

Dédie sincèrement cette fleur que j'accueillis du jardin de ma vie d'étude à mes tuteurs dans la vie, la source d'amour et le symbole de compassion : Mon cher père **Salah** et ma mignonne mère **Khadidja**, que Dieu les protège ; je les remercie jusqu'à l'infini pour leurs soutiens, leurs encouragements, leurs patiences... et tous les mots ne suffisent pour exprimer ma gratitude. Je suis très reconnaissante et j'espère qu'ils seront fiers de moi. Je dédie du profond de mon cœur : A ceux qui ont attendu ma réussite. A mes gracieux chers frères, qui m'aident, m'encouragent incessamment : **Saber**, **Sami** et **Aymen**. A celles qui envoient la risette à mon âme, qui ont partagé le goût de vie et m'ont donné de l'espoir, aux fleurs de ma vie, mes chères sœurs : **Linda**, **Sakina** et **sabrina**. A celles qui m'ont toujours soutenue avec un grand cœur, mes idéales sœurs avant amies : **Amira**, **Amina**, **chaima** , **chahinez** et **zina** .A mes collègues de ma promotion, particulièrement : **Sabrina**, **Roumaïssa**, **Fatiha**, **soumia** .A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Abbaoui Manel

Résumé

Le but de cette étude est d'estimer la teneur en composés phénoliques d'une plante médicinale locale : *Pulicaria odora* ainsi que d'évaluer son activité antioxydante.

Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant quatre solvants à savoir le méthanol, éthanol, acétone, eau distillée les rendements respectifs 6.03 %, 3.58%, 0.838%, 6.168 %.

La teneur totale en composés phénolique a été déterminé en utilisant le réactif de Folin cioalteu, elle est de $62,69 \pm 3,27$, $47,76 \pm 0.40$, $9,92 \pm 0,40$ et 24.02 ± 2.73 /EAG/g dans les extraits éthanolique, méthanolique, acétonique et aqueux respectivement.

Les flavonoïdes ont été évalués en utilisant la méthode de $ALCL_3$;

$309,09 \pm 26,24$, $263,85 \pm 101,13$, $111,71 \pm 14,86$, $367,19 \pm 89,97$ mg EQ/g dans les extraits éthanolique, méthanolique, acétonique et aqueux respectivement.

L'activité antioxydant a été évaluée par la méthode de réduction de radical libre DPPH, l'IC50 la plus basse est enregistrée pour l'extrait méthanolique de *Pulicaria odora* estimer à 0.74 ± 0.04

Au bout de cette étude, nous retiendrons que l'extrait méthanolique des feuilles de la plante médicinale *P. Odora* exerce un effet antioxydant. Donc cette plante peut être une source prometteuse de nouvelles substances antioxydantes.

Mots clés : antioxydants, DPPH[•], *Pulicaria odora*, polyphénol, flavonoïdes.

Abstract

The objective of this study is to estimate the content of phenolic compounds in a plant local medicinal *pulicaria odora* as well as to evaluate its antioxidant activity.

The organic extracts were obtained by maceration using four solvents, methanol, ethanol, acetone, distilled water, the respective yields 6.03 %, 3.58%, 0.838%, 6.168 %.

The total content of phenol compounds was given using the Folin-Ciocalteu reagent, the results were of $62,69 \pm 3,27$, $47,76 \pm 0.40$, $9,92 \pm 0,40$, 24.02 ± 2.73 / EAG / g for the ethanolic, methanolic, acetonic and aqueous extracts respectively.

The flavonoïdes were evaluated using the $AlCl_3$ method, their content was $309,09 \pm 26,24$, $263,85 \pm 101,13$, $111,71 \pm 14,86$, $367,19 \pm 89,97$ mg EQ/g for the ethanolic, methanolic, acetonic and aqueous extracts respectively

The antioxidant activity was evaluated by the DPPH free radical reduction method, the lowest IC₅₀ is recorded for the methanolic extract of *pulicaria odora* estimated at 0.74 mg/ml.

At the end of this study, we will retain that the methanolic extract of the leaves of the medicinal plant *Pulicaria dora* exert an antioxidant effect. So this plant may be a promising source of new antioxidant substances

Key words: antioxidants, DPPH ●, *Pulicaria odora*, polyphenol, flavonoids

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقدير محتوى نبتة طبية محلية ، *Pulicaria odora* من المركبات الفينولية، وكذلك تقييم نشاط هذه النبتة المضاد للأوكسدة .

تم الحصول على المستخلصات العضوية عن طريق النقع باستخدام أربع مذيبات، وهي ميثانول، إيثانول، أسيتون، ماء مقطر، المرودود الخاص بها كان: كان **6.03 %** , **3.58 %** , **33.13 %** , **0.838 %** , **6.168 %**.

تم تحديد المحتوى الكلي للبوليفينول باستعمال محلول فولين سيوكالتو لمستخلص الإيثانول، الميثانول الاسيتون والماء المقطر والذي وجدناه يساوي على التوالي:

62,69 ± 3,27 , **47,76 ± 0,40** , **9,92 ± 0,40** et **24.02 ± 2.73** /EAG/g

تم تقييم مركبات الفلافونويد باستعمال كلورور الالمينيوم لمستخلص الإيثانول، الميثانول الاسيتون والماء المقطر وكانت النتائج على التوالي:

309,09 ± 26,24 , **263,85 ± 101,13** , **111,71 ± 14,86** , **367,19 ± 89,97** mg EQ/g

تم تحقيق الفعالية المضادة للأوكسدة باستخدام طريقة ارجاع الجذور الحرة DPPH ، وتم تسجيل أدنى IC50 للمستخلص المائي لبوليكاريا أودورا المقدرة بـ **0.74 mg/ml**

نستنتج في نهاية هذه الدراسة بأن المستخلص الميثانولي لأوراق النبات الطبي *P. Odora* له تأثير مضاد للأوكسدة. لذلك يمكن أن يكون هذا النبات مصدرًا واعدًا كمواد جديدة مضادات الأوكسدة.

الكلمات المفتاحية: مضاد للأوكسدة، DPPH، *Pulicaria odora*، المستخلصات العضوية.

Liste d'abréviations

ALCL3	Trichlorure d'aluminium
Ac	Absorbance du contrôle
At	Absorbance du test effectué
°C	Degré cellsus
DPPH	Le 2,2'-diphenyl-1- picrylhydrazyl
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
H2O2	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygéné)
IC50	Concentration inhibitrice de 50 %
Min	Minute
mM	mili molaire
nm	nanomètre
NaOH	Hydroxyde de sodium
NaNO2	Acide gallique,nitrite de sodium
HE	Huile essentielle.
PI	Pourcentage d'Inhibition
PPT	Polyphénols totaux
E	Extrait
EQ	Equivalents de Quercétine.
Mg EQ/g E	Equivalent milligramme de quercétine par g d'extrait
Tr	Tour
P. Odora	Pulicaria odora
Na2 CO3	Carbonate de sodium
NH4OH	Hydroxyde d'ammonium

Liste des figures

Figure 01	Type d'inflorescence de la famille des Astéracées	4
Figure 02	Aspect de <i>pulicaria odora</i>	6
Figure 03	Carte de répartition en Afrique et région méditerranéenne	8
Figure 04	Caractéristiques du climat et du sol de <i>Pulicaria odora</i>	9
Figure 05	Quelques exemples d'assemblage des isoprènes	18
Figure 06	Exemples de quelques monoterpènes	19
Figure 07	Exemples de quelques sesquiterpènes	19
Figure 08	Structure chimique de quelques composés aromatiques des HE.	20
Figure 09	Structure de l'acétylCoenzymes.A	21
Figure 10	Schéma générale de la biosynthèse des terpènes par la voie du méthylérythritol phosphate.	23
Figure 11	Exemple de la biosynthèse d'un dérivé du phénylpropane.	24
Figure 12	Représentation schématique de la distillation à la vapeur	25
Figure 13	Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation	26
Figure 14	Principe schématisé de différentes étapes d'hydrodiffusion	27
Figure 15	Technique d'extraction par solvants	28
Figure 16	Dispositif d'extraction assistée par micro-ondes	29
Figure 17	Principe du test DPPH	35
Figure 18	Mécanisme réactionnel du test FRAP	36

Figure 19	Situation géographique de station de collecte de plante <i>Pulicaria odora</i> .	38
Figure 20	Aspect des feuilles sèches de <i>Pulicaria odora</i>	39
Figure 21	Les étapes de la préparation des différents extraits.	41
Figure 22	Clevenger en schéma	43
Figure 23	Photo originale du Clevenger	43
Figure 24	Structure chimique du radical libre DPPH.	44
Figure 25	Rendement d'extraction des composés phénoliques de <i>Pulicaria odora</i>	48
Figure 26	Teneur en polyphénols totaux des différents extraits de <i>Pulicaria odora</i> .	50
Figure 27	Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>Pulicaria odora</i> .	52
Figure 28	Courbe présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanol et acétone.	54
Figure 29	Courbe présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait eau distillée et éthanol.	54
Figure 30	Valeurs des concentrations efficaces 50% de l'activité anti radicalaire.	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre <i>Inula</i> .	5
Tableau II	Classification de <i>Pulicaria odora</i> .	7
Tableau III	Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées.	34
Tableau IV	Solvants et réactifs utilisés.	39
Tableau V	Liste des appareils utilisés.	40
Tableau VI	Rendement, poids et couleur des quatre extraits des feuilles sèches de <i>Pulicaria odora</i> .	47
Tableau VII	Teneur des extraits de l'éthanol, méthanol, l'acétone et de l'eau de <i>pulicaria odora</i> en polyphénols totaux.	49
Tableau VIII	Teneur en flavonoïdes des extraits de l'éthanol, méthanol, l'acétone et de l'eau de <i>pulicaria odora</i> .	51
Tableau IX	Pourcentages de la réduction du radical DPPH° des extraits de <i>Pulicaria Odora</i> .	53
Tableau X	Valeurs des concentrations efficaces 50% de l'activité anti radicalaire.	55

Table des Matières

Résumé.....	I
Abstract.....	II
المخلص.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	VI
Table des Matières.....	VII
Introduction.....	1

Première Partie : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Présentation de la plante étudiée

I- Présentation de la plante étudiée.....	4
I-1- La famille des Astéracées	4
I.1.2 Caractéristiques morphologiques des Astéracées.....	4
I-2- Genre Pulicaria	5
I.2.1 Usages traditionnels	5

I.2. I-3- Espèce <i>Pulicaria Odora (Inula odora)</i> ...	6
I.3.1 Description de <i>Pulicaria odora</i> :	6
I.3.2. Classification et appellation :...	7
I.3.3 Habitat et distribution géographique	8
I.3.3 Quelques caractères de la plante	9
I.3.4 Principales utilisations de <i>Pulicaria odora</i> :	11
Chapitre II : Généralités Sur Les Huiles Essentielles.	
II- Généralités sur les huiles essentielles.....	13
II-1- Définition d'une huile essentielle.....	13
II-2- Répartition et lieu de synthèse des huiles essentielles dans la plante	14
II.2.1 Répartition	14
II.2.2 Localisation	15
II-4 - Rôle physiologique des huiles essentielles	15
II-5- Caractérisation des huiles essentielles.	15
II.5.1 Caractérisation organoleptique.....	15
II.5.2 Caractérisation physique	16
II.5.3 Caractérisation chimique.....	17
II-6- Composition chimique des huiles essentielles	17
II.6.1 Les composés terpéniques	18
II.6.1 .1 Les monoterpènes	18
II.6.1 .2 Les sesquiterpènes.....	19
II.6.2 Les composés aromatiques	19
II.6.3 Les composés d'origines diverses	20
II-7- Biosynthèse des constituants des huiles essentielles.....	20

II.7.1 Biosynthèse des terpènes :	20
II.7.2 Biosynthèse des phénylpropanoïdes.....	24
II-8- Méthodes d'extraction	25
II-8. 1 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau	25
II.8.2 Hydrodistillation :	26
II.8.3 Hydrodiffusion :.....	26
II.8.4 L'extraction par solvants organiques :	27
II.8. 4 Extraction assistée par micro-ondes :	28
II.8.5 L'expression à froid :	28
II.9. Les utilisations des huiles essentielles.....	29
III -Activité antioxydante.....	30
III.1. Introduction	30
III.1. 1'origine et production des espèces réactives oxygénées	30
III.2. Le stress oxydant	31
III.3. Les radicaux libres	32
III.4. Les antioxydants	32
III.4.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques)	33
III.4.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)	33
III.5. Mécanismes d'action des antioxydants.....	35
III.6. Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants	35
<i>Deuxième Partie : Étude Expérimentale</i>	
<i>Chapitre I : Matériel Et Méthodes</i>	
I- Objectif de l'étude.....	38

I- I-1- Cadre de l'étude.....	38
II- Matériel.....	38
II-1- Matériel végétal.....	38
II-1-1- Récolte du matériel végétal Objectif de l'étude.....	38
I. 2. Préparation de l'échantillon.....	39
1.3. Matériels du laboratoire.....	39
III. Méthodes.....	40
III.1. Préparation des extraits bruts.....	40
III.1.2. Calcul de rendement.....	42
III.2. Dosage des polyphénols totaux.....	42
III.3. Dosage des flavonoïdes.....	42
III-4- L'extraction des huiles essentielles des feuilles sèches de <i>Pulicaria odora</i>	43
III-4-1-Le principe de l'hydrodistillation.....	43
III-4-2- Le mode opératoire de l'hydrodistillation.....	43
III-5- Étude de l'activité antioxydant de plants médicinale <i>plulicaria odora</i>	44
III-5- 1 Test au DPPH.....	44
III-5- 1-1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)	44
III-5- 1-2 Dosage.....	45
<i>Résultats et discussion</i>	
I. Résultats Et Discussion.....	46
I.1 Rendement de l'extraction des composés phénoliques	46
II. 2. Dosage des composés phénoliques	48
II.2 .1. Dosage des polyphénols totaux	48
I. 3. Dosage de flavonoïdes	50
II. 3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>Pulicaria Odora</i>	51

II. 3. 1. Détermination des IC50 des extraits.....	55
Conclusion.....	57
Références Bibliographiques.....	60

Introduction

Pendant des siècles, l'Homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. La plupart de grands médecins du passé ont été des phytothérapeutes (**Goeb, 1999**).

Depuis lors, les gens ont expérimenté les propriétés curatives des plantes, et leurs précieuses propriétés ont été transmises de génération en génération ou enregistrées dans des écrits anciens. Bien que le développement de la médecine moderne ait marginalisé l'utilisation de la technologie médicale naturelle, des thérapies réputées sont toujours répandues.

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux (**Tchamdja, 1995**).

L'Algérie est riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques et odorantes. Ces plantes aromatiques sont, donc, la source des huiles essentielle qui peuvent posséder une capacité antioxydant, réductrice très importante (**Lempiäinen, 1992**).

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydant ne peut réagir qu'avec un seul radical libre et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources antioxydants (**PELI et LYLY, 2003**).

Ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydatif (**Cole et al., 2005 ; Liu, 2003 ; Riboli et Norat, 2003**).

Parmi ces plantes utilisé en médecine traditionnelle pour leurs vertus curatives et leurs propriétés antioxydantes on peut citer *Pulicaria odora* sur la quelle est porté notre présent travail Cette plante constitue un patrimoine local très important en grande partie décrit d'un point de vue botanique et quelques études portant sur les huiles essentielles de *Pulicaria odora* et leur activité antioxydante

Introduction

Dans le cadre de cette étude, ce mémoire est composé de deux parties :

- La première partie propose une mise au point bibliographique. Elle est divisée en deux chapitres. Le premier est présente une description botanique et systématique de la plante, les propriétés biologiques du genre et de l'espèce étudiée. Le second chapitre est consacré aux généralités sur les huiles essentielles.

- Dans la seconde partie (pratique), nous avons décrit en détail le matériel végétal de cette plante, puis l'extraction de ses huiles essentielles et enfin, l'étude de son activité antioxydante. Les résultats obtenus sont ensuite amplement discutés. Le manuscrit est achevé par une conclusion générale, les annexes et la liste des références bibliographiques.

Chapitre I :

*Présentation de la plante
Etudiée :*

« *Pulicaria Odora* »



I- Présentation de la plante étudiée

I-1- La famille des Astéracées :

La famille des Astéracées (*asteraceae*) ou Composées (*Compositae*) est la famille la plus large des plantes à fleurs qui comprend près de 13 000 espèces réparties en 1500 genres formant approximativement 10% de la flore du monde (**Pottier, 1981**).

En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (**Quezel, 1962**), 111 genres et 638 espèces (**Gaussen, 1982**). Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires : Laitues (*Lactuca*), artichauts (*Cynara*), tournesol (*Heliantus annuus*). Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie : Le Semen-contra (*Artemisia cina Berge*), l'Arnica (*Arnica montana L.*), la Chamomille (*matricaria chamomilla*), (**GUIGNARD, 1994**). Une des propriétés typiques de la famille des Composés est la richesse en composés naturels divers. On y trouve des terpenoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes. C'est une famille très riche en lactones sesquiterpéniques qui représente des principes amers typiques de cette famille (**Harborne et Swain, 1969**).

I.1.2 Caractéristiques morphologiques des Astéracées :

Les Astéracées sont caractérisées par :

- L'inflorescence en capitule qui comprend un réceptacle sur lequel sont insérées des fleurs.
- Formant ainsi une « fleur composée », d'où l'ancien nom de la famille (*Compositae*).
- Les fleurs, très particulières dont les anthères sont soudées entre elles (*Synanthérées*).
- Le fruit, un akène généralement surmonté d'un pappus (**Dupont et Guignard., 2012**).

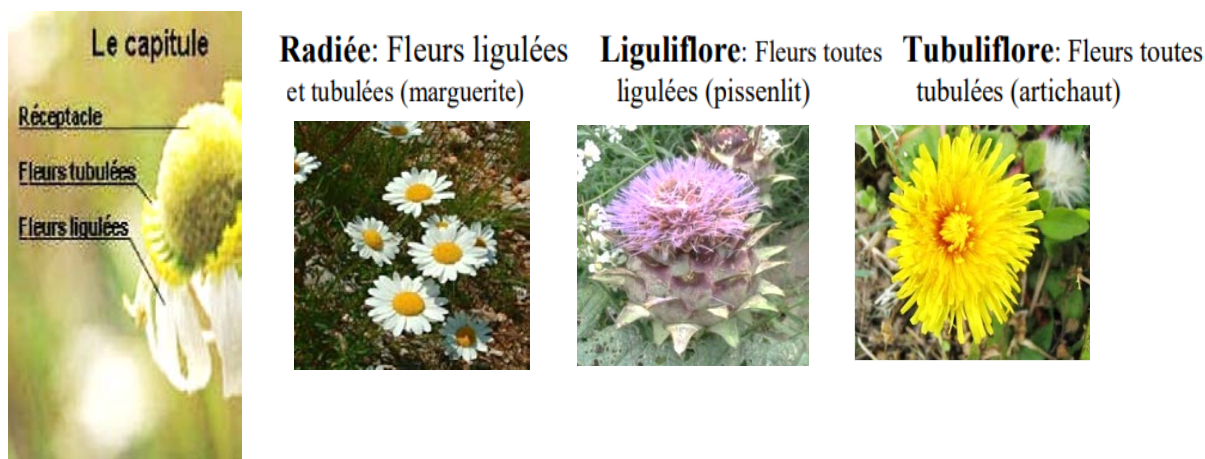


Figure 1 : Type d'inflorescence de la famille des Astéracées.

I-2- Genre *Pulicaria*

Les pulicaires appartiennent au l'attribut des inules. Le nom *Inula* est très ancien et vient du nom de l'espèce *Inula helenium* et généralisé pour tout le genre (Gaertner, 1791 et Flann, 2009). Le genre *Inula*, représente une variété d'environ 90 espèces, largement distribué dans le bassin méditerranéen, en Europe (Espagne, France...), Asie (Chine, Turquie, Japon, Korea...) et en Afrique (Egypte, Algérie, Maroc...) (Quazel et Santa 1963).

I.2.1 Usages traditionnels :

Les espèces du genre *Inula*, ont été utilisées en médecine populaire pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques, on va présenter quelques-unes dans le tableau ci-dessous :

Tableau I : propriétés thérapeutiques de quelques espèces du genre *Inula*.

Espèces	Usages traditionnels
<i>Inula helenium</i> L.	-Comme un remède familial en Japon (Okuda, 1986) -Comme un agent thérapeutique pour la tuberculose en Taïwan et Chine. elle a aussi des propriétés antiseptiques, antibiotiques, antispasmodiques, toniques et aromatiques (Jiangsu, 1986).
<i>Inula britannica</i> L:	- Les fleurs de ces plantes ont été utilisées pour le traitement des troubles digestifs, la bronchite, et l'inflammation. <i>I. britannica</i> a aussi une activité anti-inflammatoire, antibactérienne, antiseptique, anti tumorale (Jiangsu, 1977).
<i>Inula royleana</i> L.	- Ces racines possèdent une activité anti-inflammatoire, antibiotique, et une activité vermifuge (Blaschek et al., 1998).
<i>Inula racemosa</i> L.	- En médecine traditionnelle Chinoise, les racines d'herbe d' <i>Inula racemosa</i> ont été habituellement employées pour fortifier la rate, réguler la fonction de l'estomac, alléger la douleur rhumatismale Particulièrement entre le cou et les épaules et pour empêcher L'avortement (JIANGSU, 1977).
<i>Inula montana</i> L.	-Possède une activité sur le système Digestif (Tardio et al., 2002).
<i>Inula salicina</i> L.	-Digestif, anti diarrhéique (Tardio et al., 2002).
<i>Inula conyza</i> DC.	-Laxative, vulnéraire (VILLAR et al., 1987).
<i>Inula viscosa</i> L	-Possède une activité curative de blessure a été observé avec l'extrait du d' <i>Inula viscosa</i> (Enam et al., 2007).

I-3- Espèce *Pulicaria Odora* (*Inula odora*)

Pulicaria odora est une plante médicinale appartenant à la famille des Astéracées, contenant plus de 77 espèces à travers le monde (Algabr et al., 2012) et largement utilisée par la population algérienne. On pense qu'il possède des propriétés biologiques et médicinales très intéressantes, telles que des activités antibactériennes, antioxydants et cicatrisantes. D'après la pharmacopée traditionnelle et notre étude ethno-botanique, *P. odora* est classiquement utilisée par les populations locales de Tizi-Ouzou, Tipaza et Jijel (nord de l'Algérie).

I.3.1 Description de *Pulicaria odora* :

Pulicaria odora (L.) est une Plante vivace de 30-60 cm, elle est velue ou laineuse. Elle présente une tige dressée, simple, ou rameuse dans sa moitié supérieure. La tige souterraine renflée en tubercules est couverte de feuilles écailleuses. Hémicryptophyte, elle est constituée de feuilles alternes de forme ovale oblongue (Figure 2 b), denticulées, les inférieures atténuées en pétiole, persistant à la floraison, les caulinaires embarrassantes, mais sans oreillettes saillantes. Elle comporte de grands capitules (15-25mm) longuement pédonculés, solitaires au sommet de la tige et des rameaux ; involucre à bractées velues, linéaires, acuminées ; toutes les fleurs jaunes (Figure 2 c), celles en languettent étaler, dépassant longuement le disque formé par les fleurs en tube ; akènes blanchâtres, velus ; aigrette rousse dotée d'une couronne dentée de 10 à 12 poils 3 fois plus longs que l'akène. La floraison de la plante a lieu au mois de juin à août ; pollinisée par les insectes (ou autogame) ; dispersée par le vent (Rameau et al., 2008 ; Roubaudi, 2011).

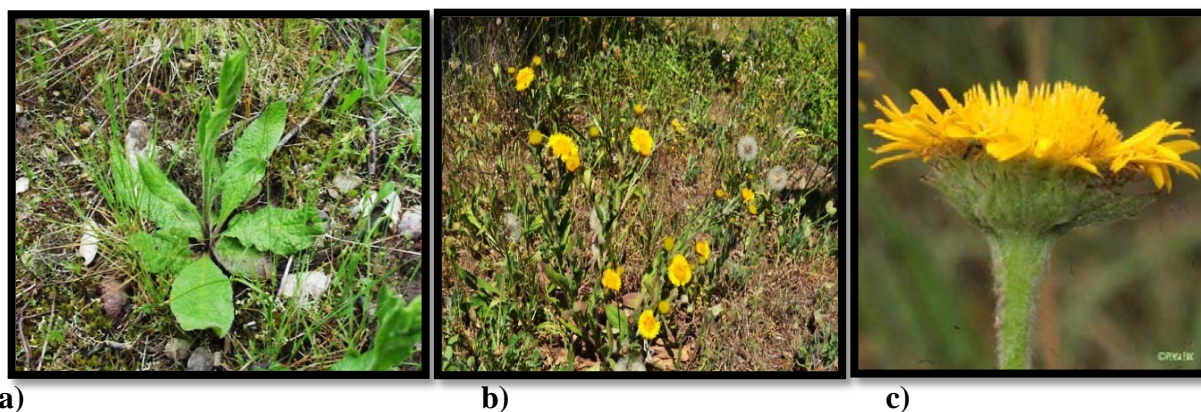


Figure 2 : Aspect de *pulicaria odora*
a) : plante entière, b) : les feuilles ; c) : les fleurs

I.3.2. Classification et appellation :

La classification de la plante *Pulicaria odora* est présentée dans le tableau I.

Tableau II : Classification de *Pulicaria odora* (Cronquist, 1988).

Règne	Plante
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Pulicaria</i>
Espèce	<i>Pulicaria odora.L</i>

Pulicaria odora L. ou *Inula odora L* cette plante est connue au Maroc sous le nom d'Ouden El hallouf (Hanbali et al., 2005). En Algérie, particulièrement en petite Kabylie, elle est connue sous le nom de 'Ouden e'nadja', cependant le nom 'Ouden El hallouf' est destiné pour une autre plante non utilisée traditionnellement.

➤ **Noms vernaculaires :**

- **Nom de l'espèce :** *Pulicaria odora* (L.) Reichenbach (Quezel et Santa, 1963).
- **Synonymes :** *Inule odorante*.
- **Nom anglais :** *Vergerette de Méditerranée*.
- **Nom français :** Pulicaire odorante.
- **Nom arabe :** Ouden EL halouf.
- **Nom kabyle :** Amzough n'tixsi.

I.3.3 Habitat et distribution géographique :

Pulicaria odora est une espèce qu'on rencontre dans les maquis et les sous-bois clairs. Elle n'est ramifiée que dans l'inflorescence. Toutefois, elles sont abondantes principalement dans les lieux frais de la région méditerranéenne comme dans les Alpes-Maritimes, Var, et rare dans les Bouches-du-Rhône (Rameau et al., 2008), Pyrénées-Orientales, Corse, sont distribués encore en Espagne, Portugal, Italie, Afrique septentrionale. En Algérie *P. odora* présente surtout au niveau de la commune rurale dans certaines régions de la Kabylie.

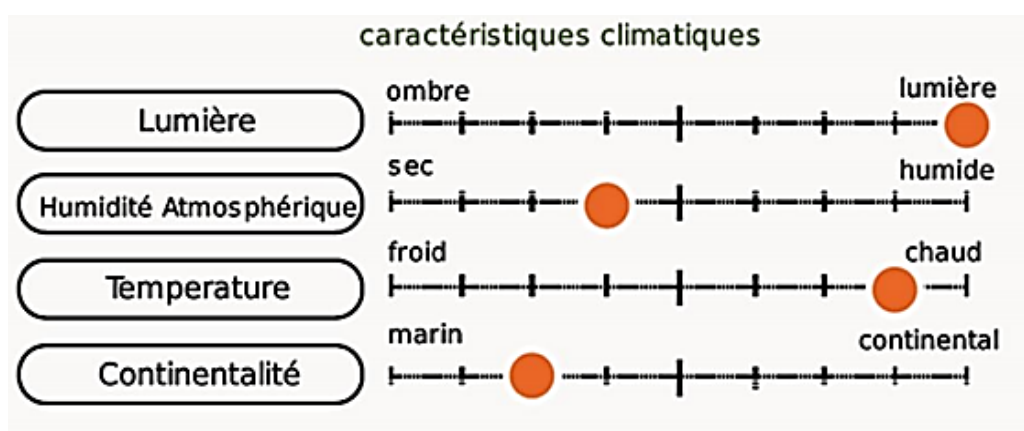


Figure 3 : Carte de répartition en Afrique et région méditerranéenne

I.3.3 Quelques caractères de la plante :

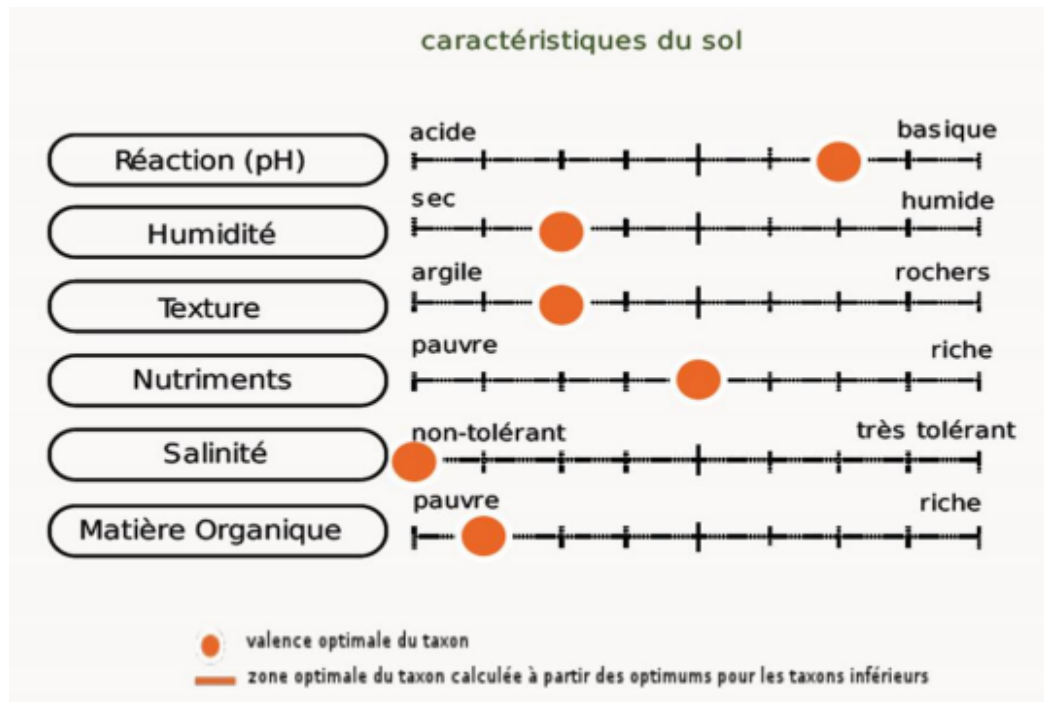
Pulicaria odora pousse dans un climat chaud proche de la mer plus ou moins sec exigeant la lumière, dans un sol plus ou moins sec avec une texture proche de celle de l'argile, moyennement riche en nutriments, pauvre en matières organiques et une intolérance à la salinité avec pH proche de la basicité.

Figure 4 : Caractéristiques du climat et du sol de *Pulicaria odora* (Lavagne, 2006).



- **Lumière** : 1 : hypersciaphiles (10 lux) 2 : persciaphiles (50 lux) 3 : sciaphiles (100 lux) 4 : hémisciaphiles (1000 lux) 5 : hélioclines à sciaclines (5 000 lux) 6 : hémihéliophiles (10 000 lux) 7 : héliophiles (50 000 lux) 8 : perhéliophiles (75 000 lux) 9 : hyperhéliophiles (100 000 lux).
- **Température**: 1 : alpines à nivales, altiméditerranéennes ($T \approx 0^\circ\text{C}$) 2 : subalpines, oroméditerranéennes ($T \approx 5^\circ\text{C}$) 3 : montagnardes ($T \approx 7^\circ\text{C}$) 4 : collinéennes, planitiales psychrophiles (psychro-atlantiques, psychrocentro-européennes) ($T \approx 9^\circ\text{C}$) 5 : planitiales à montagnardes ($T \approx 7-10^\circ\text{C}$) 6 : planitiales thermophiles (thermo-atlantiques, thermocentro-européennes) et sub- à supraméditerranéennes ($T \approx 12^\circ\text{C}$) 7 : euryméditerranéennes, méditerranéo-atlantiques ($T \approx 13^\circ\text{C}$) 8 : mésoméditerranéennes ($T \approx 15^\circ\text{C}$) 9 : thermoméditerranéennes à subdésertiques (inframéditerranéennes) ($T \approx 18^\circ\text{C}$)
- **Humidité atmosphérique** : 1 : aéroxérophiles (10%) 2 : intermédiaires (20%) 3 : aéromésoxérophiles (30%) 4 : intermédiaires (40%) 5 : aéromésohydriques (50%) 6 : intermédiaires (60%) 7 : aéromésohygrophiles (70%) 8 : intermédiaires (80%) 9 : aérohydrophiles (90%).

- **Continentalité** : 1 : marines à maritimes (AT≈8°C) 2 : hyperocéaniques (AT≈10°C) 3 : océaniques (AT≈17°C) 4 : subocéaniques (AT≈19°C) 5 : intermédiaires (AT≈21°C) 6 : précontinentales (AT≈23°C) 7 : subcontinentales (AT≈25°C) 8 : continentales (AT≈30°C) 9 : hypercontinentales (AT≈40°C).



- **Réaction (pH)** : 1 : hyperacidophiles (3,0 < pH < 4,0) 2 : peracidophiles (4,0 < pH < 4,5) 3 : acidophiles (4,5 < pH < 5,0) 4 : acidoclines (5,0 < pH < 5,5) 5 : neutroclines (5,5 < pH < 6,5) 6 : basoclines (6,5 < pH < 7,0) 7 : basophiles (7,0 < pH < 7,5) 8 : perbasophiles (7,5 < pH < 8,0) 9 : hyperbasophiles (8,0 < pH < 9,0).
- **Humidité** : 1 : hyperxérophiles (sclérophiles, ligneuses microphylles, révisiscentes) 2 : perxérophiles (caulocrassulescentes subaphylles, coussinets) 3 : xérophiles (velues, aiguillonnées, cuticule épaisse) 4 : mésoxérophiles 5 : mésohydriques (jamais inondé, feuilles malacophylles) 6 : mésohygroclines, mésohygrophiles 7 : hygrophiles (durée d'inondation en quelques semaines) 8 : hydrophiles (durée d'inondation en plusieurs mois) 9 : amphibies saisonnières (hélrophytes exondés une partie minoritaire de l'année) 10 : amphibies permanentes (hélrophytes semi-émergés à base toujours noyée) 11 : aquatiques superficielles (0-50 cm) ou flottantes 12 : aquatiques profondes (1-3 m) ou intra-aquatiques

- **Texture :** 1 : argile 2 : intermédiaire 3 : limon 4 : sable fin 5 : sable grossier 6 : graviers 7 : galets, rocailles 8 : blocs, dalles, replats rocheux 9 : fissures verticales des parois.
- **Nutriments :** 1 : hyperoligotrophiles ($\approx 100 \mu\text{g N/l}$) 2 : peroligotrophiles ($\approx 200 \mu\text{g N/l}$) 3 : oligotrophiles ($\approx 300 \mu\text{g N/l}$) 4 : méso-oligotrophiles ($\approx 400 \mu\text{g N/l}$) 5 : mésotrophiles ($\approx 500 \mu\text{g N/l}$) 6 : méso-eutrophiles ($\approx 750 \mu\text{g N/l}$) 7 : eutrophiles ($\approx 1000 \mu\text{g N/l}$) 8 : pereutrophiles ($\approx 1250 \mu\text{g N/l}$) 9 : hypereutrophiles ($\approx 1500 \mu\text{g N/l}$)
- **Salinité :** 0 : ne supportant pas le sel 1 : hyperoligohalines, [0-0,1% Cl-] 2 : peroligohalines, [0,1-0,3% Cl-] 3 : oligohalines, [0,3-0,5% Cl-] 4 : meso-oligohalines, [0,5-0,7% Cl-] 5 : mesohalines, [0,7-0,9% Cl-] 6 : meso-euhalines, [0,9-1,2% Cl-] 7 : euhalines, [1,2-1,6% Cl-] 8 : polyhalines, [1,6-2,3% Cl-] 9 : hyperhalines, [$>2,3\%$ Cl-]
- **Matière Organique :** 1 : lithosol, peyrosol, régosol 2 : mull carbonaté 3 : mull actif 4 : mull acide 5 : moder 6 : mor, hydromor, xéromor 7 : ranker, tangel 8 : anmoor, gyttja 9 : tourbe

I.3.4 Principales utilisations de *Pulicaria odora* :

L'utilisation de *P. odora* en médecine traditionnelle est différente d'un pays à un autre.

Dans certaines régions de la Kabylie (nord de l'Algérie), les feuilles de *Pulicaria odora* ont des usages traditionnels variés, sont utilisées sous forme fraîche pour soulager certaines affections cutanées (gale, plaies et brûlures, engelures, eczéma, alopecie, champignon Pityriasis versicolore, rougeole (Meddour, 2010). Ou encore par voie orale pour traiter les troubles gastriques et les douleurs abdominales (ulcère gastrique, gastrite, crampe menstruelle ...).

Au Maroc est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les maux de dos, les troubles intestinaux et menstruels crampes. La plante est également un constituant de la remède traditionnel appelé « Mssakhen », qui est donné aux femmes après l'accouchement (Ezoubeiri et al., 2005). Elle est aussi utilisée comme épice pour parfumer le pain et la viande. Les racines de *Pulicaria odora* sont également utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Hanbali et al., 2005).



Chapitre II :

Généralités Sur Les

Huiles Essentielles

II- Généralités sur les huiles essentielles

II-1- Définition d'une huile essentielle

On trouve dans la littérature et sur internet plusieurs définitions des huiles essentielles. Afin d'être le plus exact possible, voici quelques-unes de ces définitions.

Avant d'entreprendre une véritable définition, il est important de souligner qu'il n'y a pas d'huile essentielle dans les plantes, mais des essences.

➤ **Wikipédia :**

On appelle huile essentielle, ou parfois essence végétale (du latin *essentia*, « nature d'une chose »), le liquide concentré et hydrophobe des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante. Il est obtenu par extraction mécanique, entraînement à la vapeur d'eau ou distillation à sec.

➤ **Selon la Commission de la Pharmacopée européenne (2008) :**

« Produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition ».

➤ **Selon AFNOR NF T 75-006 (1998) :**

L'huile essentielle est définie selon la norme (AFNOR NF T 75-006) comme : *« 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 de citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition... ».*

➤ **Selon AFNOR ISO 9235 : (Matières premières aromatiques d'origine naturelle – vocabulaire) :**

Une huile essentielle est définie comme un : *« Produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche.*

➤ **Définition Générale :**

On obtient des huiles essentielles après une distillation. Une grande partie des végétaux contiennent des essences, mais souvent en petite quantité, ce qui ne permet pas la distillation ou alors à des prix élevés.

Les plantes contenant beaucoup d'essences appartiennent à la famille des Labiacées (thym, origan, sarriette, serpolet, sauge, menthe...), des Abiétacées (sapin, cyprès, genévrier, mélèze, épicéa, pin...), des Apiacées (angélique, persil, fenouil...), des Asteracées (achillée, camomille, coriandre, absinthe...), des Lauracées (cannelier de Chine, bois de Hô...), des Liliacées (ail), des Myrtacées (eucalyptus, niaouli...), des Rosacées (rosier de Dalmatie...).

Ces essences, ensembles de principes actifs contenus dans les plantes en général, se trouvent dans différentes parties des végétaux (écorce, fleurs, fruits, racines, graines) et c'est la distillation de ces parties qui permettra d'obtenir des huiles essentielles. Elles sont constituées par un mélange de plusieurs principes chimiques, et possèdent un certain nombre de propriétés communes par lesquelles on peut les définir.

Presque toutes les HE ont un pouvoir rotatoire lévogyre à des degrés divers selon les constituants. La propriété lévogyre d'une HE peut se définir par la fonction.

II-2- Répartition et lieu de synthèse des huiles essentielles dans la plante :

II.2.1 Répartition :

Les huiles essentielles sont produites par des cellules végétales spécialisées et peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemples dans :

- **Les sommités fleuries :** (*Menthe, Lavande...*)
- **Les feuilles :** (*Eucalyptus, Laurier...*)
- **Les rhizomes :** (*Gingembre...*)
- **Les fruits :** (*agrumes, badiane, anis...*)
- **Les racines :** (*Vétiver...*)
- **Les graines :** (*Muscades...*)
- **L'écorce :** (*Cannelier...*) (**BELLAKHDAR, J1997**).

II.2.2 Localisation :

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence des structures histologique spécialisés, souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont : cellules à huiles essentielles de Lauraceae, les poils sécréteurs des laminaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae, des Rutaceae, et les canaux sécréteurs qui existent dans des nombreuses familles. Il est intéressant de remarquer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante (**DEGRYSE et al., 2008**).

II-4 - Rôle physiologique des huiles essentielles

Le rôle physiologique des huiles pour le rôle végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et propriétés biologiques.

Généralement la synthèse des HEs par les végétaux supérieurs est en réponse à des conditions de stress et surtout pour combattre les parasites ou les agents infectieux (**Goetz et Ghedira, 2012**). Les auteurs pensent qu'elles ont un rôle écologique qui est la protection contre la flore microbienne infectieuse par les Propriétés fongicides et bactéricides, ainsi que leur rôle dans la protection contre les prédateurs et l'attraction des pollinisateurs et la réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines (**Thompson et al., 2003 ; Bardeau, 2009**).

II-5- Caractérisation des huiles essentielles

II-5-1 Caractérisation organoleptique :

Les HE sont habituellement liquides à température ambiante, rarement visqueuse (myrrhe), certaines cristallisent partiellement ou totalement à plus faible température (anis : anéthol ; menthe des champs : menthol ; thym saturéioïde: bornéol). (**Kaloustian Je et al.,2012**).

Les huiles essentielles sont volatiles et n'ont pas le toucher gras et onctueux, ce qui les différencie des huiles dites « fixes ». (**Franchrome P et al.,2001**)

La plupart d'entre elles sont incolores ou jaune pâle lorsqu'elles viennent d'être préparées à l'exception des essences à azulènes qui sont bleues (ex : camomille allemande), de l'essence d'absinthe qui est verte, de celle de girofle qui est brune et de celle de

wintergreen (Gaulthérie couchée) qui est rougeâtre. D'odeur agréable, aromatique. Pour la saveur, elle peut être douce, piquante, caractéristique, fruité, fraîche... (Haddad D et al.,2016).

II-5-2 Caractérisation physique :

Pouvoir rotatoire : c'est une propriété des molécules chirales, celles-ci ont la propriété de dévier le vecteur d'un faisceau lumineux les traversant (**Wikipédia**). Il est mesuré à l'aide d'un polarimètre.

Les huiles essentielles sont le plus souvent optiquement actives.

Densité relative : elle représente le rapport de la masse d'un volume de liquide (HE pour notre cas) par la masse du même volume d'eau. Elle est sans unité et varie en fonction de la température. La densité relative est mesurée par deux appareils : le densimètre et le pycnomètre. La densité des HE est en général inférieure à celle de l'eau à l'exception des HEs de sassafras, de cannelle et de girofle (**Brunton J,1999**)

Indice de réfraction : c'est une grandeur sans dimension, caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci (**Wikipédia**) ; Il est mesuré couramment par le réfractomètre d'Abbe (**Kaloustian Je et al .,2008**). La détermination de l'indice de réfraction pour une huile essentielle permet seulement de vérifier si elle est conforme aux normes établies (**Kaloustian Je et al .,2008**).

Les HEs ont souvent un indice de réfraction élevé (1,45-1,56) (**Courtial S,2005**).

Solubilité des huiles essentielles

- **Dans l'eau :** elles ne sont naturellement pas, ou très peu, solubles dans l'eau ; certains composants sont néanmoins plus solubles que d'autres (verbénone du romarin officinal, lavandulol de la lavande vraie) ; quelques-unes ont des constituants particulièrement solubles, ce qui entraîne, durant la distillation des écorces de cannelle, l'obtention habituelle d'émulsions (**Franchrome P et al . ,2001**).

- **Dans les huiles fixes :** elles sont totalement solubles dans les huiles grasses (**mira,2012**).

- **Dans l'éthanol :** Une huile essentielle est dite miscible à V volumes et plus de l'éthanol de titre alcalimétrique déterminé à la température de 20°C, lorsque le mélange de 1 volume

d'huile essentielle et de V volumes de cet éthanol est limpide, et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre jusqu'à un total de 20 volumes (Chouiteh O,2012).

- **Dans les solvants organiques** : les HE s'y solubilisent très bien (Franchrome P et al ;2001).

II-5-3 Caractérisation chimique :

Indice d'acide : IA est le nombre de milligramme (mg) de potasse nécessaire pour neutraliser les acides libres contenus dans 1gramme (g) d'HE (Kaloustian Je et al ;2008).

Indice de saponification : Is est le nombre de milligramme (mg) d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libres et saponifier les acides estérifiés contenus dans un gramme d'HE (Wikipédia).

Indice d'ester : IE est le nombre de milligramme de potasse nécessaire pour saponifier les esters présents dans 1 gramme d'HE (Kaloustian et al ;2008).

II-6- Composition chimique des huiles essentielles

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique analysable et très variable. Le nombre de composants isolés est d'environ des milliers et il en reste beaucoup à découvrir (BACIS, 1999). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane , beaucoup moins fréquents.

Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Bruneton, 1999).

II.6.1 Les composés terpéniques :

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isoprénique à 5 atomes de carbone (C₅H₈). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entités isoprènes en monoterpènes formés de deux isoprènes (C₁₀H₁₆), les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes (C₁₅H₂₄), les diterpènes, formés de quatre isoprènes (C₂₀H₃₂).

Les tetraterpènes sont constitués de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les polyterpènes ont pour formule générale : (C₅H₈)_n ou n peut être de 9 à 30 Les térpénoides

sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhydes, cétone, acide) (Bakkali et al., 2008). Seuls les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999) et leur confère un caractère volatil et est à la base de leurs propriétés olfactives (Pibiri, 2006). Il convient de souligner que la synthèse des terpènes n'est pas propre aux végétaux. Le squalène, ainsi que son nom l'indique est un terpène abondant chez les requins. Des sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent également chez les spongiaires et les coelentérés (Guignard, 2000).

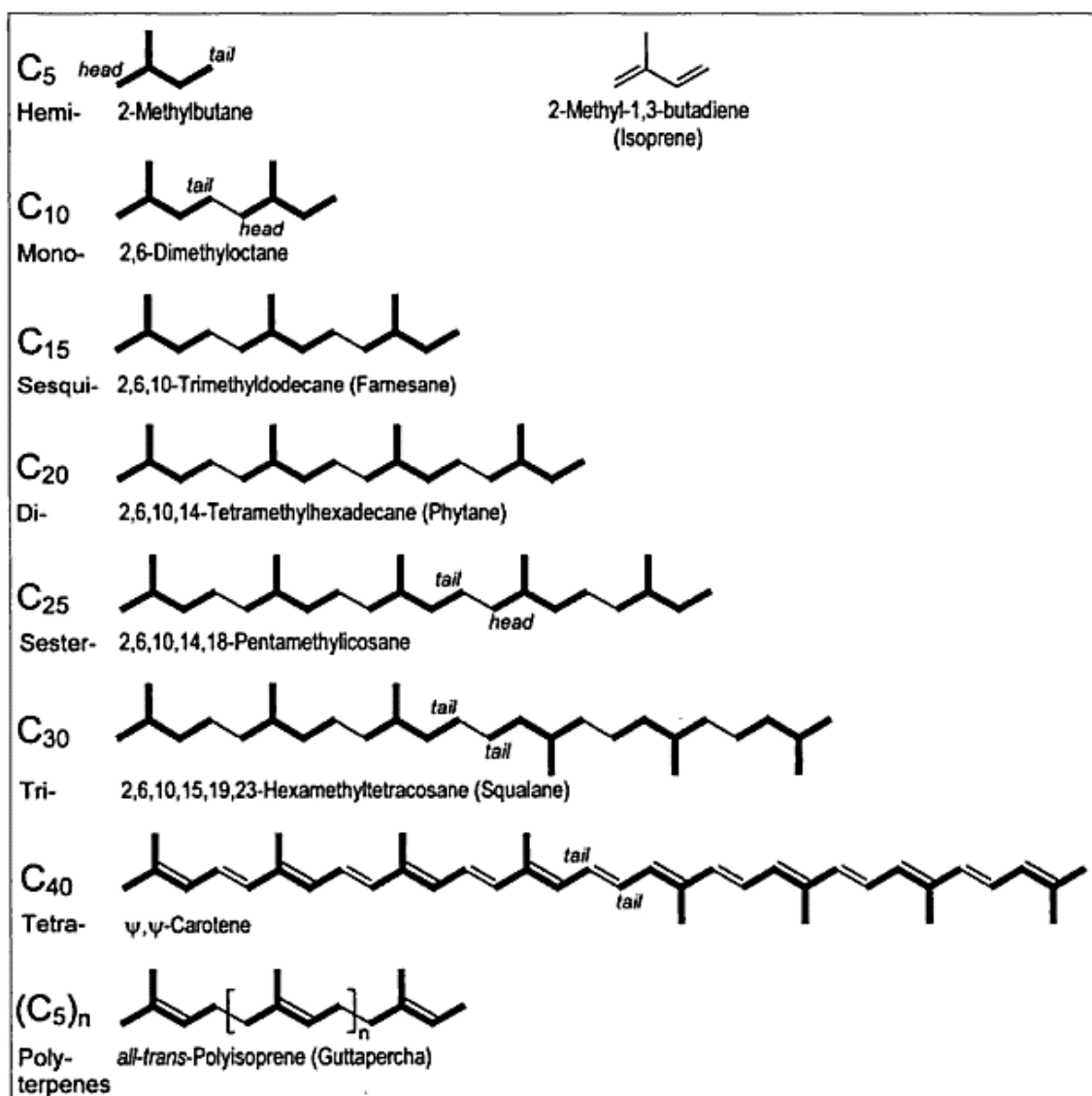


Figure 05 : Quelques exemples d'assemblage des isoprènes

II.6.1 .1 Les monoterpènes :

Sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des H.E, parfois plus de 90%. Ils peuvent être acyclique (myrcène, o-cymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène).

A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique :

- **Alcools** : géraniol, menthol.
- **Aldéhydes** : géraniol, citronellal, sésényl.
- **Cétones** : carvone, menthone, β -vétinone.
- **Esters** : acétate de géranyl, acétate de linalyl, acétate de cédryle, acétate α -terpinyle - Peroxydes : ascaridol, allicine (**Bruneton, 2008**).

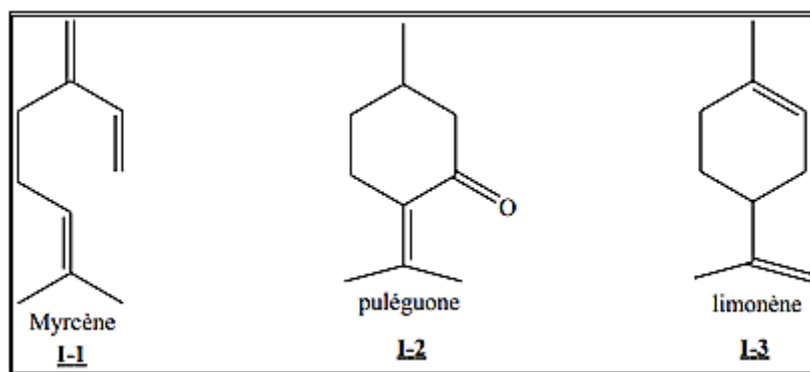


Figure 06 : Exemples de quelques monoterpènes

II.6.1 .2 Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

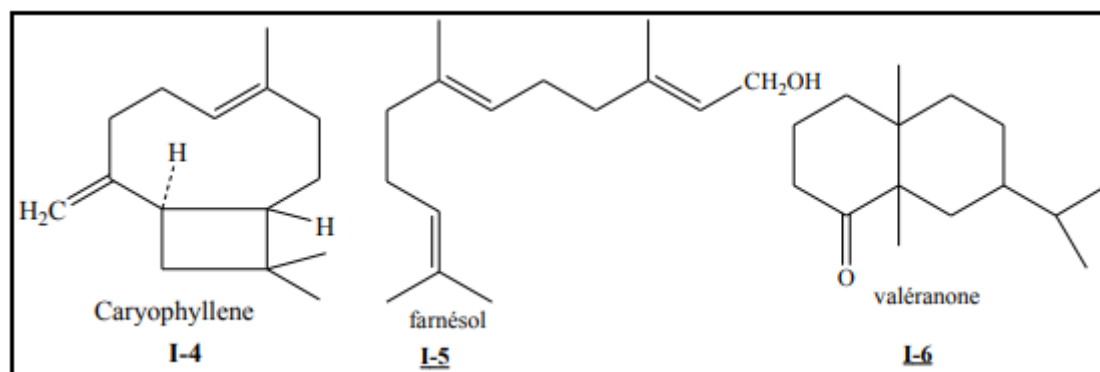


Figure 07 : Exemples de quelques sesquiterpènes.

II.6.2 Les composés aromatiques :

Contrairement aux composés terpéniques ; les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Nous pouvons citer en exemple l'eugénol qui est responsable de l'odeur du clou de girofle (Kunle et okogum, 2003).

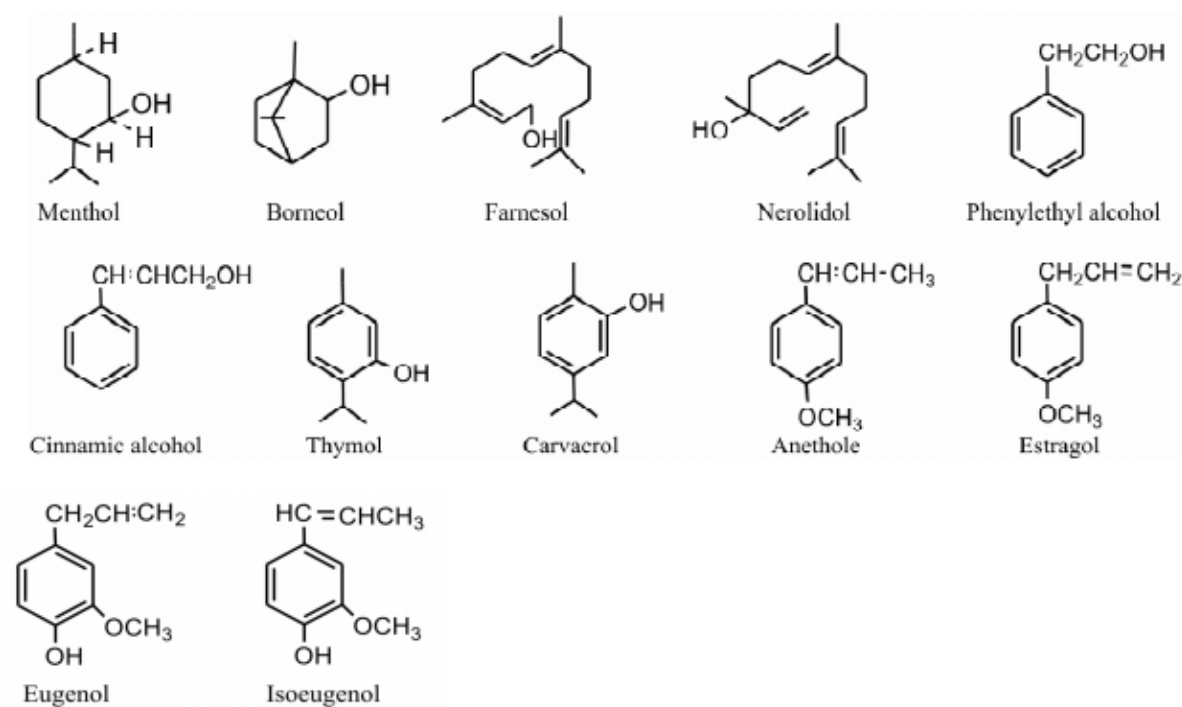


Figure 08 : Structure chimique de quelques composés aromatiques des huiles essentielles.

II.6.3 Les composés d'origines diverses :

Il s'agit de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles (composés issus de la dégradation d'acides gras ou d'autres composés). Ces composés contribuent souvent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les

absolues peuvent en renfermer ces types de composés. Il en est de même pour les huiles essentielles lorsqu'elles sont entraînaables par la vapeur d'eau (Bruneton, 1999).

II-7- Biosynthèse des constituants des huiles essentielles

La biosynthèse des constituants des HEs au sein du végétal emprunte deux voies utilisant comme intermédiaires :

- L'acide mévaloniaque pour les terpénoïdes ;
- L'acide shikimique pour les phénylpropanoïdes.

II.7.1 Biosynthèse des terpènes :

L'unité de base de la biosynthèse des terpènes est l'isopentényl-diphosphate (pyrophosphate d'isopentén-3yle) : **PPI3**, et son isomère le diméthylallyl-diphosphate (pyrophosphate de diméthylallyle) : **PPI2**.

Deux voies de biosynthèse conduites à ces unités de base à 5 atomes de carbone :

- La voie de l'acide mévalonique (MVA);
- La voie du méthylérythritol phosphate (MEP).

La première est la voie du mévalonate. Elle prend son origine au niveau de l'acétyl coenzyme A (CH₃CO:SCoA) (Figure I.4), produit de la glycolyse (catabolisme des sucres).

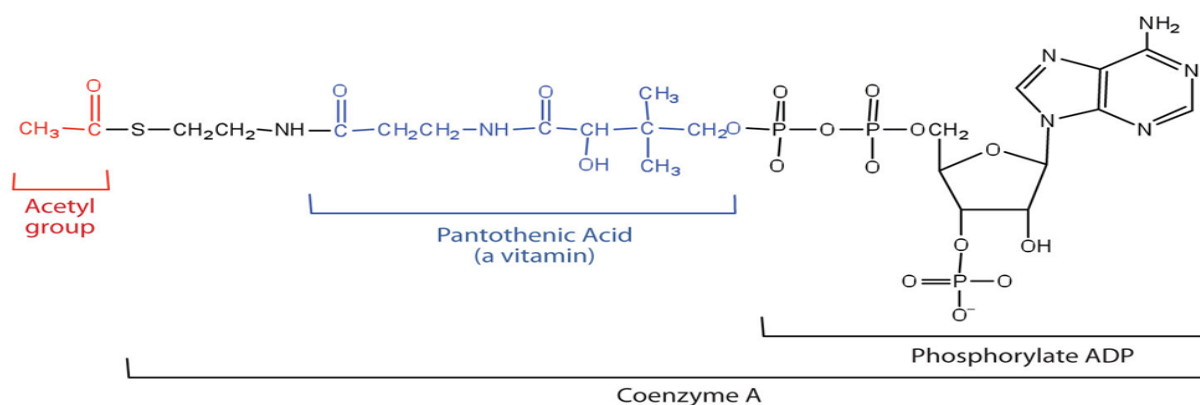
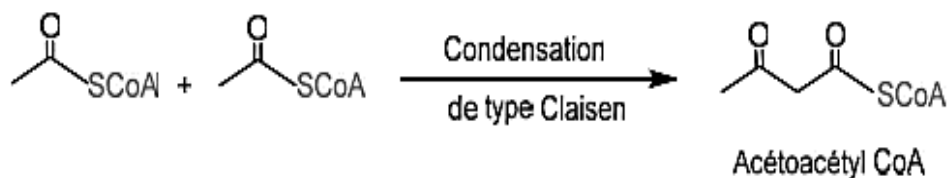


Figure 09 : structure de l'acétylCoenzymes.A

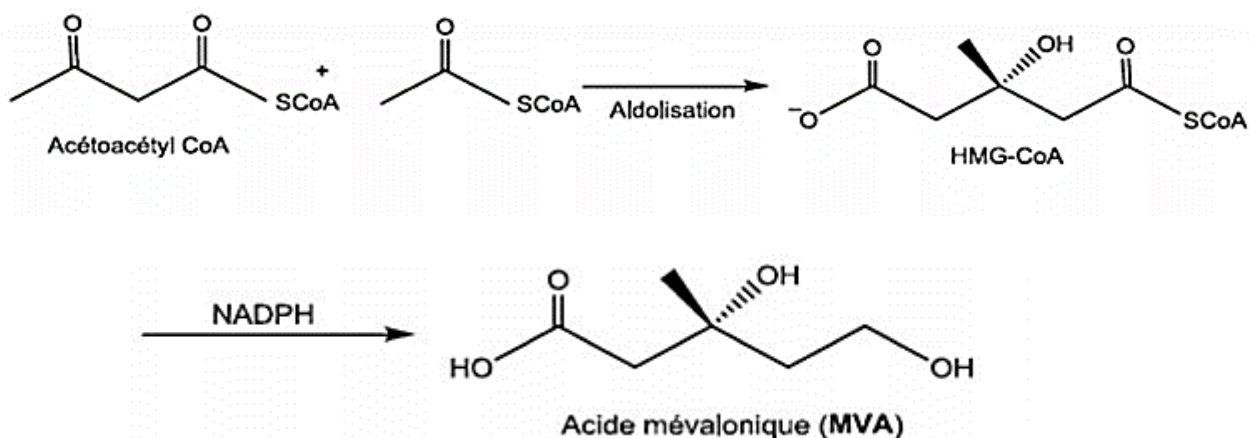
L'étude du mécanisme réactionnel régissant la biosynthèse des terpènes, a montré l'existence de plusieurs étapes :

La première étape débute par la condensation de trois unités d'acétylCoA, et passe par un composé en C6 (le mévalonate) et conduit au **PPI3**.

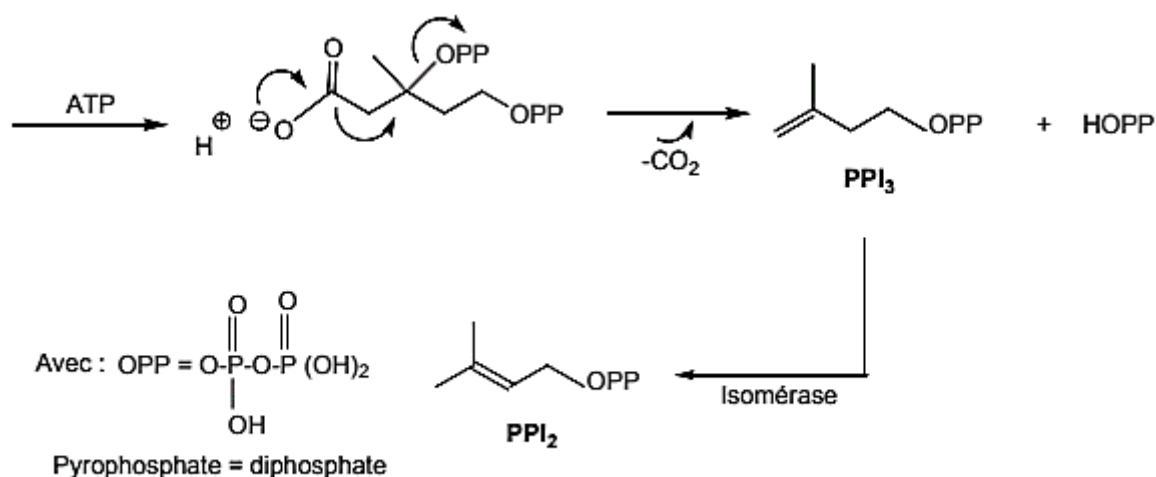
Pour cette voie principale, la première étape est une condensation de type Claisen entre deux molécules d'acétylCoA pour conduire à l'acétoacétylCoA.



La deuxième étape est une réaction d'aldolisation entre une 3ème molécule d'acétylCoA et l'acétoacétylCoA. Après hydrolyse et réduction par le NADPH (Nicotine Adénine Dinucléotide Phosphate), **MVA** (l'acide mévalonique) se forme.



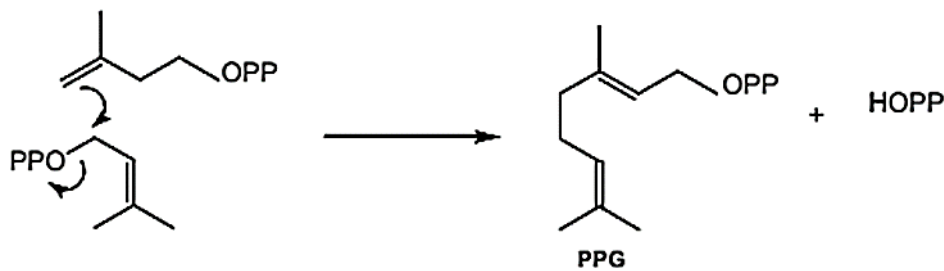
Après pyrophosphorylation par l'ATP, la déshydratation et la décarboxylation de l'acide mévalonique (**MVA**) par une élimination concertée, permettent d'aboutir aux deux



intermédiaires en C5, bio-précurseurs des terpènes : *Pyrophosphate d'isopentén-3-yle (PPI3)* en équilibre, par simple transfert de proton, avec le *pyrophosphate de diméthylallyle (PPI2)*.

Les deux intermédiaires en C5 réagissent entre eux pour conduire au pyrophosphate de géranyle (PPG) point de départ de tous les monoterpénoïdes.

La condensation suivant le même principe d'une autre unité de PPI3 sur le pyrophosphate de géranyle donne le pyrophosphate de farnésyle, précurseur de tous les sesquiterpènes. Selon ce processus, les diterpènes, triterpènes (squalène) ainsi que les tétraterpènes sont obtenus. Montre le schéma indiquant les différentes étapes de la biosynthèse des terpénoïdes.



La seconde voie, voie du méthylérythritol phosphate (MEP) ou encore nommée *voie non mévalonique*, est spécifique aux végétaux et se fait au niveau des plastes. Elle commence par la condensation d'une unité pyruvate (C3) avec une unité de glycéraldéhyde 3- phosphate (C3) et conduit au *méthylérythritol phosphate*, un composé intermédiaire en Cs.

Plusieurs étapes enzymatiques conduisent ensuite à la synthèse de **PPI3**. Cette voie n'a été mise en évidence qu'à la fin des années 90, mais elle s'est rapidement avérée être la voie majoritaire pour la biosynthèse de la majeure partie des terpènes (Figure I.6).

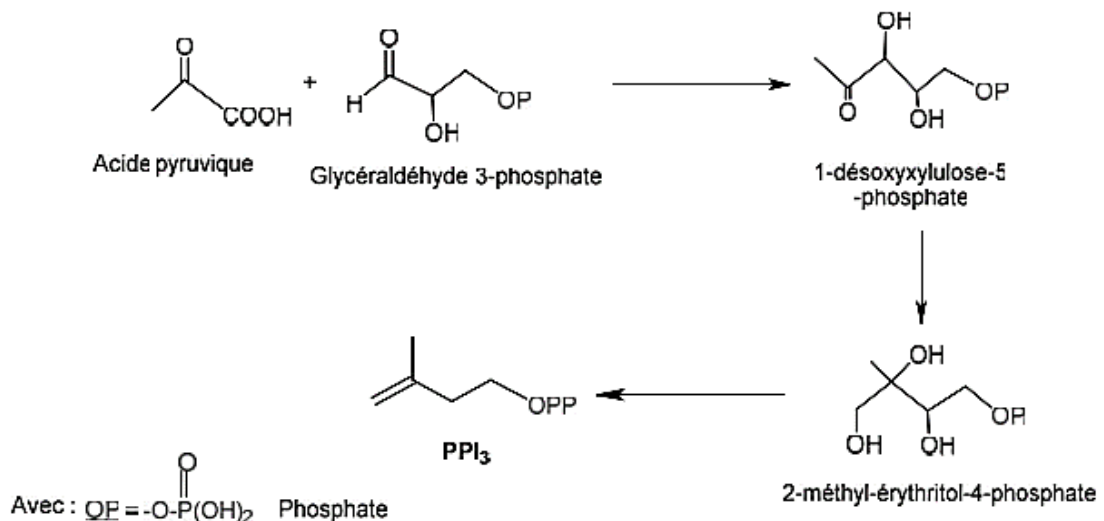


Figure 10 : schéma générale de la biosynthèse des terpènes par la voie du méthylérythritol phosphate.

II.7.2 Biosynthèse des phénylpropanoïdes

La biosynthèse des dérivés du phénylpropane se fait par l'intermédiaire de *l'acide shikimique* qui représente le principal mode d'accumulation des phénols dans les plantes. Cette voie fait intervenir une série de réactions et représente le chemin biosynthétique des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane,..tyrosine).

L'acide shikimique est obtenu par condensation de l'acide pyruvique activé par phosphorylation sur un sucre phosphorylé. L'addition d'une deuxième molécule d'acide pyruvique activée fournit l'acide préphénique qui par déshydratation et décarboxylation donne l'acide phénylpyruvique. Cet acide aromatique se transforme en phénylalanine, acide aminé aromatique, qui est à l'origine du métabolisme des composés aromatiques. La figure I.7 résume les principales étapes de la biosynthèse de l'acide cinnamique par cette voie de métabolique.

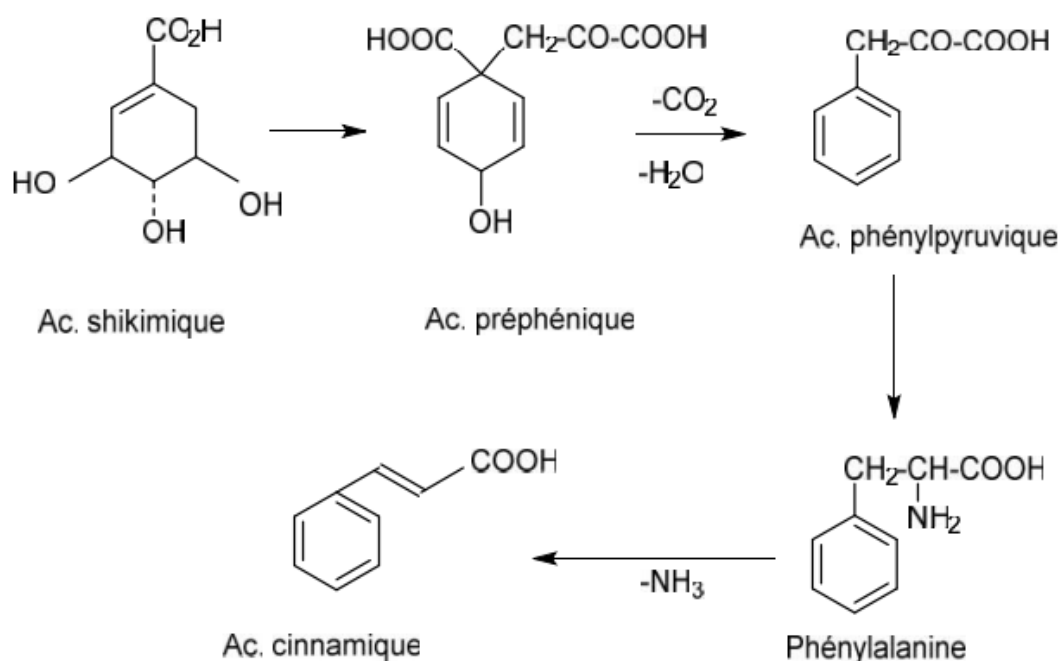


Figure 11 : Exemple de la biosynthèse d'un dérivé du phénylpropane : Acide cinnamique

II-8- Méthodes d'extraction :

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, et précieuses. Ainsi les différentes techniques sont mises en œuvre pour l'extraction des HEs des végétaux, cette diversité est en fonction de la partie de la plante où se trouve l'huile essentielle, ainsi que de la qualité et de la valeur thérapeutique. De chaque procédé résulte un produit différent.

La méthode choisie pour l'extraction des huiles essentielles doit être la plus efficace et qui donnerait une huile essentielle de très bonne qualité, un rendement élevé avec un coût économique faible, l'huile essentielle obtenue doit être limpide, concentrée, d'odeur fine caractéristique de la partie de la plante utilisée et ne doit contenir aucune trace de solvant.

II-8- 1 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau :

Constitue la technique la plus utilisée (Lucchesi, 2005). La plante n'est pas en contact direct avec l'eau. Le principe consiste à placer la plante sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (Boukhobza et Gotez, 2014) qui détruit la structure des cellules, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles (Goetz et Busser, 2008). Ensuite les huiles volatiles sont condensées dans un réfrigérant avant d'être récupérées dans un essencier par décantation (Figure 4) (Aiache et al., 2012). Les avantages de cette technique consistent à apporter une amélioration de la qualité des produits obtenus et permettre d'extraire les HEs les plus pures (Riotte, 2017) en minimisant les altérations thermique des composés volatils (Werner et al., 2010).

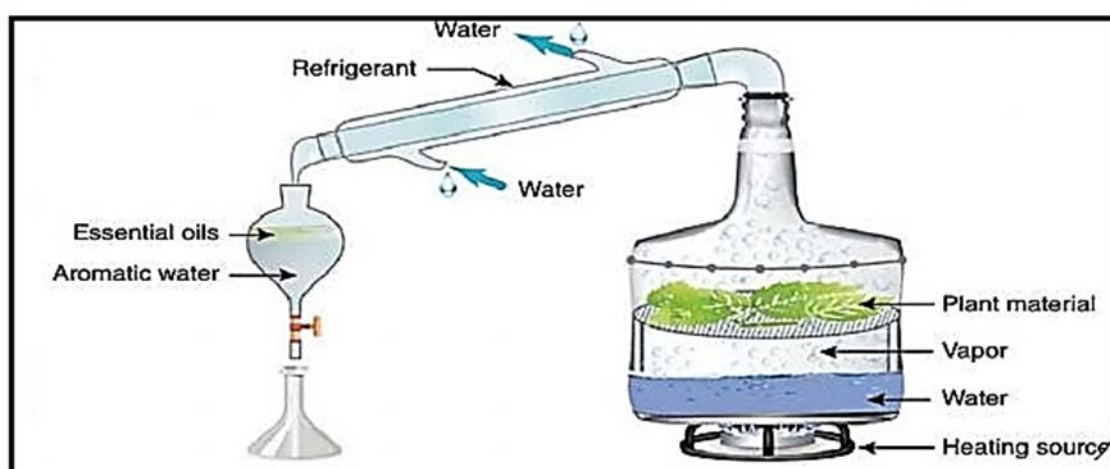


Figure 12 : Représentation schématique de la distillation à la vapeur (Seyed et al., 2017)

II-8- 2 Hydrodistillation :

L'hydrodistillation est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles. Cette méthode consiste à immerger directement la partie de la plante à extraire dans l'eau chauffée jusqu'à l'ébullition pendant 3 heures. L'huile essentielle est évaporée avec la vapeur d'eau. Ces derniers sont hétérogènes sont alors condensés à l'aide d'un réfrigèrent. Le distillat est ensuite récupéré dans un erlenmeyer (Jouault, 2012).

L'eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. (Boukhalfa, 2014).

La distillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue lors de la décantation. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

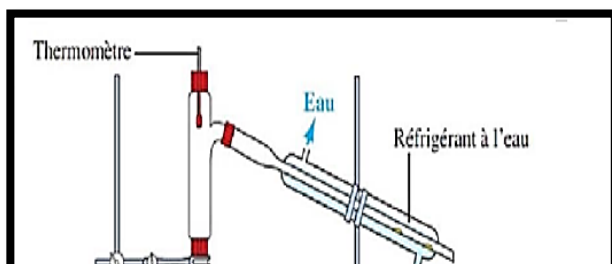


Figure 13 : principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation

II-8- 3 Hydrodiffusion :

Consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15 bar) à travers la masse végétale, de haut vers le bas. la composition des produits obtenus est qualitativement différente de celle des produits obtenus par les méthodes précédentes. Ce procédé permet un gain de temps et d'énergie (**Bruneton, 1999**). Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau-huile essentielle » dispersé dans la matière végétale (**Franchomme et al, 1990**).

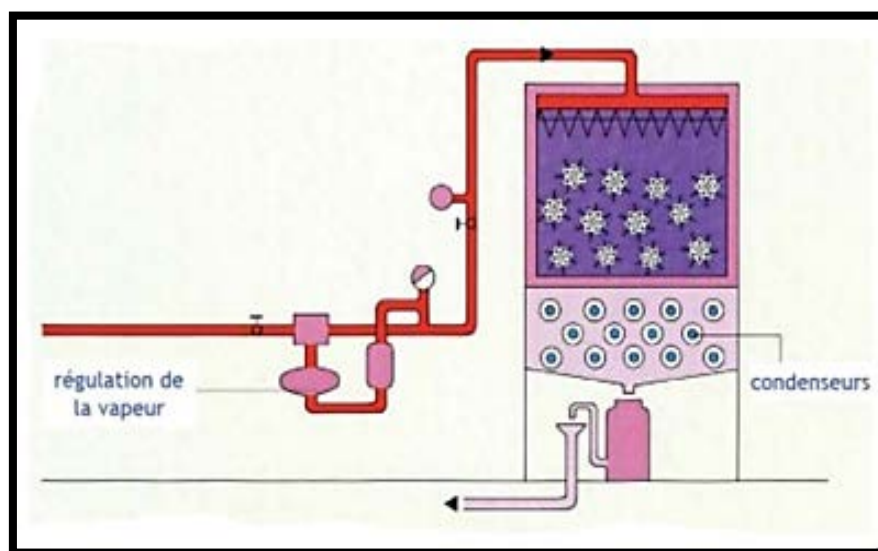


Figure 14 : Principe schématisé de différentes étapes d'hydrodiffusion

II-8- 4 L'extraction par solvants organiques :

Cette forme d'extraction est couramment employée pour l'industrie des arômes, mais doit impérativement être proscrite pour un usage thérapeutique, excepté si le seul solvant est l'alcool pur (Jorite S, 2015).

L'extraction proprement dite est généralement précédée d'une division de la drogue : contusion des organes frais, hachage des drogues herbacées, concassage des racines et rhizomes, réduction en copeaux des bois (Wicht M et al ; 1999)

Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui sera ensuite éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne la concrète : mélange odorant de consistance pâteuse. L'extraction de la concrète avec l'alcool conduit à l'absolue (Chabrier J-Y,2010).

Cette technique est utilisée avec les plantes dont l'extraction d'huiles essentielles grâce à l'hydrodistillation est inefficace : c'est le cas du jasmin, de certaines roses, du narcisse, du néroli du mimosa (Jammaledine M,2010).

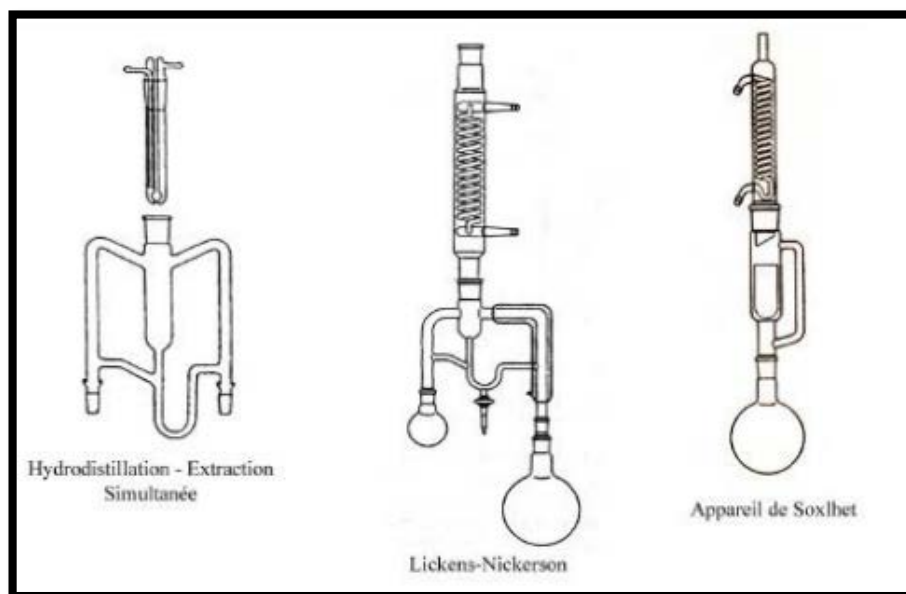


Figure 15 : Technique d'extraction par solvants

II-8- 5 L'expression à froid :

Les huiles essentielles de fruits d'agrumes sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de

matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique qui est l'expression à froid (Lucchesi, 2005).

Le principe de cette technique est basé sur la rupture des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits ; cette essence entraînée par un courant d'eau froide. L'émulsion d'essence et d'eau isolée par décantation ou centrifugation.

II-8- 4 Extraction assistée par micro-ondes :

Cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Les parties du végétal les plus riches en eau, comme les vacuoles, absorbent les ondes puis les convertissent en chaleur, engendrant une augmentation rapide et soudaine de la température au sein de ces structures.

Ces dernières éclatent sous la pression régnant dans l'extracteur, libérant ainsi les molécules olfactives. Puis les vapeurs d'eau entraînent l'HE. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal.

Pour les plantes aromatiques, après seulement 30 minutes d'extraction, les rendements en huiles essentielles obtenus sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation (Grunwald J et al ,2006).

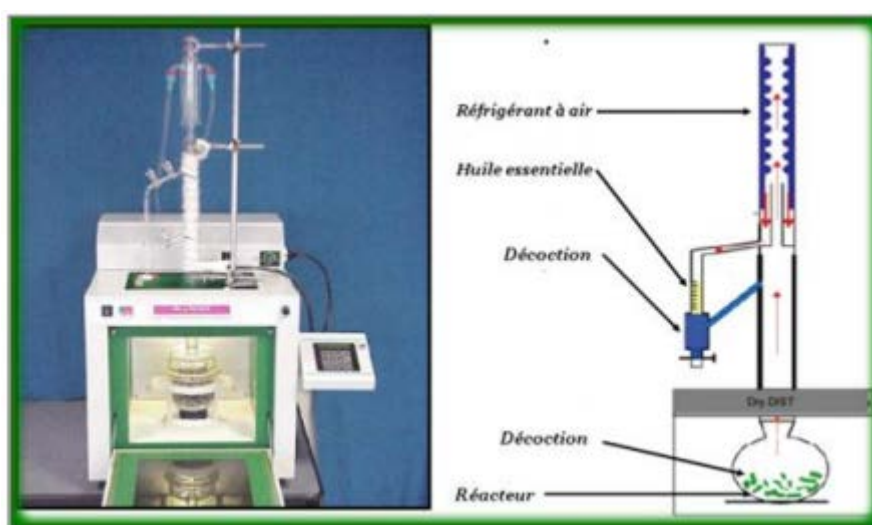


Figure 16 : dispositif d'extraction assistée par micro-ondes (Boutamani.M 2013).

II-9- Les utilisations des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont aujourd'hui omniprésentes dans les savons, les crèmes, les détergents, lessives et dans l'industrie agro-alimentaire. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Makhloufi, 2013**). Elles sont appréciées pour leurs propriétés odorantes et antiseptiques dans le domaine de la parfumerie, de la cosmétologie et de l'industrie alimentaire. Leur intérêt en médecine humaine et vétérinaire est aussi grandissant. Elles sont utilisées par voie orale (diluée dans du lait, yaourt, miel..etc), rectale, ou par inhalation directe (**Degryse et al., 2008**). A l'heure actuelle, en France, la phytothérapie est reconnue par le Ministère de la Santé Publique comme thérapie officielle depuis 1986. L'aromathérapie, se soigner par les HEs, fait partie de cette médecine est donc, en développement (**Zhiri et al., 2010**). Les HEs sont également utilisées comme biopesticides efficaces (**Chiasson et Beloin, 2007**).

III -Activité antioxydante

III.1. Introduction :

La génération des espèces réactives de l'oxygène dénommées ROS (Reactive Oxygen Species) se produit naturellement au cours de la respiration cellulaire (**Tarnawski et al., 2005**).

L'appellation ROS n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyl OH^{\bullet} , monoxyde d'azote NO^{\bullet} , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : L'oxygène singulet O_2 , peroxyde d'hydrogene H_2O_2 , peroxynitrite $ONOO^-$ (**Favier, 2003**).

Ces derniers endommagent la vie cellulaire en causant l'oxydation des lipides, des protéines et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'évolution de cette oxydation semble être la cause de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les infections inflammatoires, les maladies cardiaques et accélèrent le processus de vieillissement (**Dasgupta et De, 2007**).

III.1. 1 l'origine et production des espèces réactives oxygénées :

La chaîne respiratoire est une source permanente de production des ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 7% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des anions superoxydes, de l'eau oxygénée et éventuellement des radicaux hydroxyles (**Pincemail et al., 2002 ; Favier, 2003 ; De Moffarts et al., 2005**).

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

A côté de ces sources majeures des ROS, d'autres sources existent. Les sources cytosoliques, constituées essentiellement de peroxydase qui constitue une source importante de la production cellulaire de H_2O_2 (**Sevanian et al., 1990 ; Valko et al., 2007**), la xanthine oxydase qui produit de l' $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 (**Groussard, 2006**) et les enzymes de réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques) (**Massion et al., 2002**).

A cela, s'ajoute d'autres facteurs qui peuvent contribuer dans la formation des radicaux libres. On peut citer entre autres, les rayonnements UV capables de générer des anions superoxydes ou de l'oxygène singulet, les rayons X ou γ sont aussi capables de couper la molécule d'eau en deux radicaux par l'intermédiaire d'agents photo sensibilisants (**Tamer, 2003**) les poussières d'amiante et de silice sont des sources des ROS (**Favier, 2003 ; Wang et al., 2008**).

Les fumées de combustion (cigarettes), la consommation de l'alcool et l'effort physique intense sont aussi des paramètres à ne pas écarter (**Pincemail et al., 2001 ; Lee et al., 2006 ; Pincemail & Defraigne, 2004**). Des infections bactériennes ou virales provoquent, elles aussi selon (**Aurousseau, 2002**), des phénomènes radicalaires à caractère exponentiel après augmentation de la population des macrophages impliqués dans leur élimination.

III.2. Le stress oxydant :

Le stress oxydatif survient lors du déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants (**Gil del Valle et al., 2013**), ce qui conduit l'endommagement de toutes les classes des macromolécules endogènes comprenant des protéines, des acides nucléiques, des lipides et des hydrates de carbone (**Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2015**). Mais lors de l'équilibre, les oxydants peuvent fonctionner comme des molécules de signalisation régulant la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose (**Barbieri & Sestili, 2012**).

Le stress oxydatif a un effet dévastateur causant la mort de la cellule et les lésions tissulaires et est couramment observé dans plusieurs maladies telles que le diabète, les troubles neuroaux et le vieillissement (**Kandikattu et al., 2015; Treml et Smejkal, 2016**). La recherche a permis l'utilisation d'antioxydants comme agents thérapeutiques dans le traitement de ces maladies (**Sarangarajan et al., 2017**).

III.3. Les radicaux libres :

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié (Électrons célibataires). Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. C'est typiquement ce qui se passe lors de la peroxydation lipidique (**Dacosta, 2003**).

Les radicaux libres, dérivés du métabolisme, sont produits dans toutes les cellules, même si certaines en fabriquent des quantités plus importantes (par exemple les macrophages pendant

La phagocytose). Les principaux radicaux libres présents dans les cellules aérobies, notamment

Les cellules humaines, sont l'oxygène, les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène et les métaux de transition. Les radicaux libres présents dans la cellule oxydent les molécules (molécules se trouvant à l'intérieur des cellules, en particulier des lipides), ce qui provoque la mort des cellules. Toutefois le corps humain possède des

mécanismes de défense contre les effets des radicaux libres. Ce sont les enzymes qui dégradent les peroxydes et les métaux de transition et des protéines ou d'autres molécules qui emprisonnent les radicaux libres (**Hubert, 1998**).

III.4. Les antioxydants :

Les antioxydants sont des molécules oxydables qui, en agissant comme donneurs d'hydrogène

vis-à-vis d'un radical hydroperoxyde, interrompent la réaction en chaîne de formation des peroxydes (**White, 1994**).

Ce sont des composés capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire (**Poknory, 2001**).

Les antioxydants sont pour la plupart synthétiques (hydroquinone, pyrogallol, acide gallique et gallate), et sont rajoutés aux huiles dans l'industrie alimentaire. Ils peuvent par contre être présents à l'état naturel dans les huiles végétales (vitamine E, polyphénols de l'olivier et du chêne, flavonoïdes, certaines huiles essentielles) (**White, 1994**).

III.4.1. Les antioxydants endogènes (enzymatiques) :

Ce sont des enzymes ou protéines antioxydantes (Superoxyde dismutase, Catalase et Glutathion peroxydase) élaborées par notre organisme avec l'aide de certains minéraux. Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge (**Mika et al., 2004**).

- **La superoxyde dismutase (SOD) :** accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD)] (**Piquet et Hebuterne, 2007**). sont localisés dans le cytoplasme et la mitochondrie (**Landis et Tower, 2005**).

- **La catalase :** présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes (**Valko et al., 2006**). Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du

peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en et en eau (H₂O) et en oxygène moléculaire (O₂) (**Piquet et Hebuterne, 2007**).



- **La glutathion peroxydase (GPx)** : La glutathion peroxydase joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydroperoxyde résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (**Piquet et Hebuterne, 2007**).

III.4.2. Les antioxydants exogènes (non enzymatiques) :

Les antioxydants exogènes, vu leur efficacité, leur faible coût et leur disponibilité, sont largement utilisés dans les aliments comme additifs dans le but de prévenir la rancidité. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (**Wang et al., 2003**).

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, la β-carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Les sources alimentaires de ces antioxydants naturelles sont présentées dans le **tableau 1**.

Tableau III : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

Principaux nutriments Antioxydants	Sources alimentaires
Vitamine C	Agrumes, melon, brocoli, fraise, kiwi, chou, poivron.
Vitamine E	Huile : de tournesol, de soja, de maïs Beurre, œufs, noix.
β-carotène	Légumes et fruits orangés, et vert foncés.

Sélénium	Poissons, œufs, viande, céréales, volaille.
Zinc	Viande, pain complet, légumes verts, huîtres, produits laitiers.
Flavonoïdes	Fruits, légumes, thé vert.
Acides phénoliques	Céréales complètes, baies, cerises.
Tanins	Lentilles, thé, raisins, vin.
Métabolisme de cystéine, glutathion	Caséine, Lactalbumine (petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou œufs, poissons, viande.

III.5. Mécanismes d'action des antioxydants :

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier, 2006**). Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- **Système de défense primaire** : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants

Préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation.

Ils agissent donc en prévention.

- **Système de défense secondaire** : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation (**Buettner, 1993**).

III.6. Méthodes d'évaluation in vitro des propriétés antioxydants :

L'examen des données bibliographiques fait apparaître de nombreuses méthodes spectrométriques de détermination de l'activité antioxydante. Parmi les tests les plus utilisés, nous présenterons ceux couramment cités et qui ont été utilisés au cours de notre étude: la méthode au DPPH (Diphényl Picrylhydrazyle) et la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

- **La méthode de DPPH :**

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque (**Cotelle et al., 1996 ; Trouillas et al., 2003**), le radical DPPH en solution est coloré en violet. En présence d'antioxydant (donneurs de proton); le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable (Figure 4). Le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre UV à 517 nm, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant. L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition.

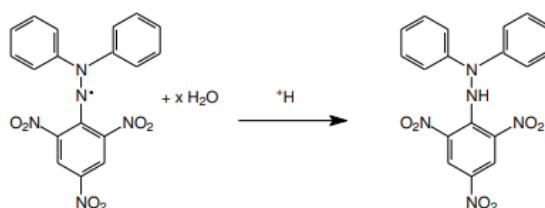


Figure 17 : Principe du test DPPH

- **La méthode de FRAP :**

Les métaux sont en général les meilleurs initiateurs de réactions en chaîne susceptibles de déséquilibrer la balance du stress oxydatif en faveur de prooxydants. Parmi ces métaux, le cation ferrique Fe³⁺ est le plus actif et on le retrouve souvent dans les aliments d'origine végétale ou animale. Le pouvoir réducteur d'un extrait vis-à-vis du cation ferrique peut être

considéré comme un indicateur de son activité antioxydante. L'activité antioxydante, non enzymatique, d'inhibition de radicaux libres et de la peroxydation lipidique, est généralement contrôlée par des réactions d'oxydo-réduction ; la méthode FRAP peut être une bonne méthode pour investiguer le pouvoir antioxydant d'un extrait en évaluant son pouvoir de réduction du cation ferrique.

La capacité totale en antioxydant de chaque extrait de plante est déterminée par la méthode Hinneburg adaptée par **(Lamien- Meda et al. en 2008.)** Le dosage consiste à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique $[\text{Fe (III)-TPTZ}]$ de couleur jaune en complexe ferreux $[\text{Fe (II)- TPTZ}]$ de couleur bleu, sous l'action d'un antioxydant par un transfert d'électron (Figure 5). La variation de la coloration est mesurée 700 nm.

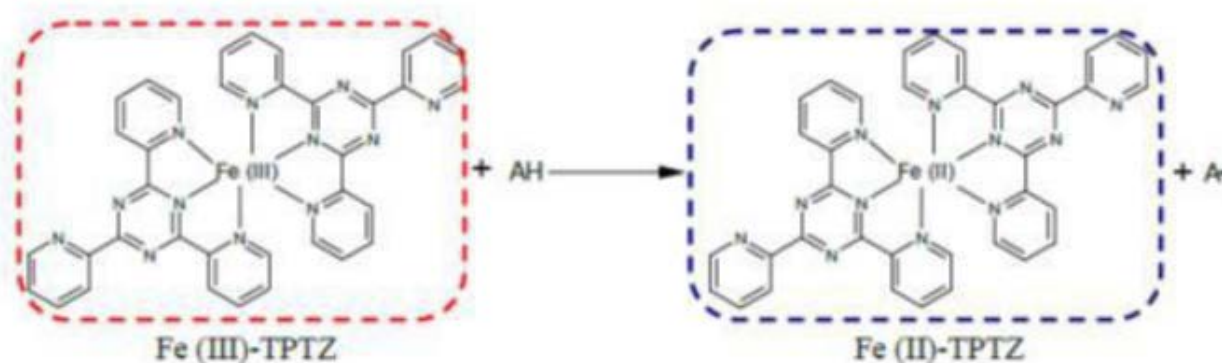


Figure 18 : Mécanisme réactionnel du test FRAP

Chapitre I :
Matériel Et
Méthodes

I- Objectif de l'étude

Dans notre démarche expérimentale nous avons réalisé l'étude de l'activité antioxydante des fractions d'huile essentielle collectées à différentes périodes au cours de l'hydrodistillation à partir d'une plante médicinale *Pulicaria odora*.

I-1- Cadre de l'étude

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein des laboratoires pédagogiques de l'Université Abbés Laghrour - Khenchela. Durant la période 25 mai 2021 au 26 juin 2021.

II- Matériel**II-1- Matériel végétal****II-1-1- Récolte du matériel végétal :**

La plante étudiée, *Pulicaria odora* a été récoltée manuellement de son milieu naturel durant le mois de mai 2021 dans la région d'El- Milia située au nord et à l'est de la wilaya de Jijel. Aux coordonnées de 36° 45' 00" nord, de latitude, 6° 16' 00" est de longitude et à une altitude de 210 m. L'identification de l'espèce a été faite par Dr. **Abd El halim Boussaa**.

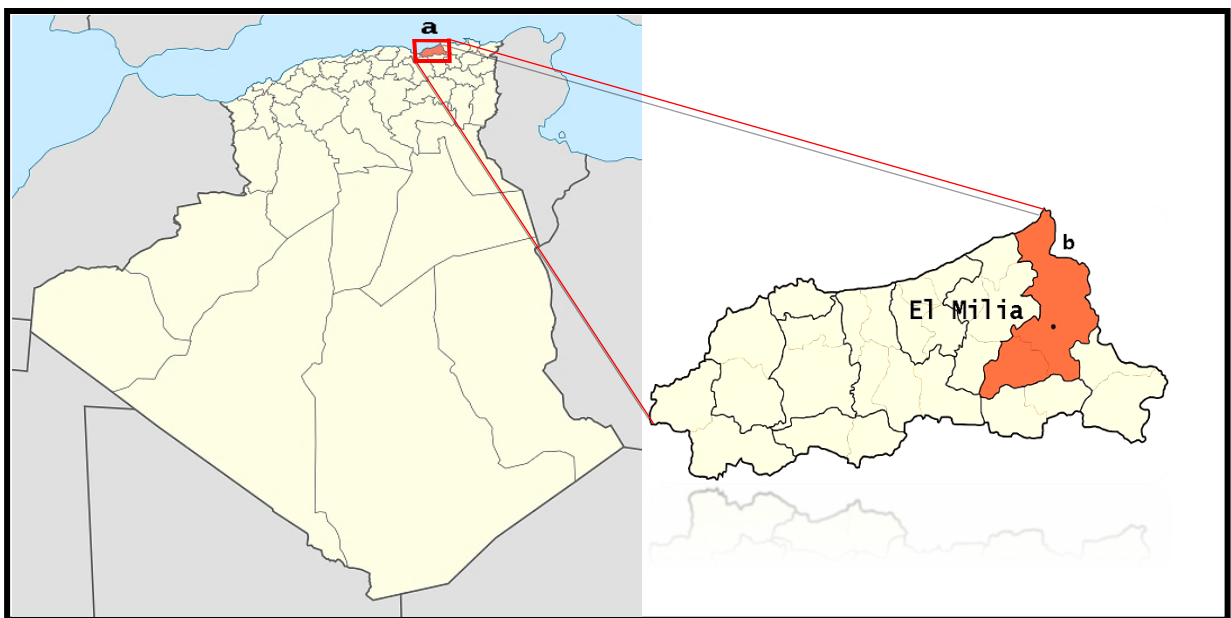


Figure 19 : Situation géographique de station de collecte de plante *Pulicaria odora*.

a : localisation de la wilaya de Jijel. **b :** localisation de la région d'El- Milia.

I. 2. Préparation de l'échantillon :

Après la récolte et l'identification, les feuilles de *Pulicaria odora* sont soumises à un triage pour éliminer et nettoyer des impuretés et des feuilles endommagées ou attaquées par des microorganismes, sont ensuite séchées à température ambiante et à l'abri du soleil pendant 1 mois, Elles sont par la suite broyées à l'aide d'un moulin électrique. La poudre est conservée dans des bocaux à l'abri de la lumière et de l'humidité. Et une partie non broyée a été conservée dans des sachets en plastique pour servir à l'extraction de l'huile essentielle.



Figure 20 : Aspect des feuilles sèches de *Pulicaria odora*.

1.3. Matériels du laboratoire

L'ensemble du matériel et d'appareillage utilisés au cours de ce travail est résumé dans le tableau ci-dessous : **Tableau IV : Solvants et réactifs utilisés.**

Réactifs	Solvants
<ul style="list-style-type: none"> • Folin-ciocalteu • Carbonate de Sodium (Na_2CO_3) • Acide gallique ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) • 1-1-diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) • Trichlorure d'aluminium (AlCl_3) 	<ul style="list-style-type: none"> • Méthanol • Ethanol • Eau distillée • Acétone

Tableau V : Liste des appareils utilisés.

Appareil	Marque
Spectrophotomètre	SP-UV 2005 Spectrum instruments
Balance de précision	Adventurer OHAUS
Centrifugeuse	SIGMA 2-16X
Autoclave	TRADE Raypa
Bain marie	memmert
Agitateur a barreau magnétique	Nahita bleu Magnetic stirrer Model 692
Erlenmeyer et ampoule a décote	/
Rota-vapeur	HS-2005V-N
Vortex	(VELP)
Broyeur électrique	COFFEE GRINDER SM-3016 220-240V, 50Hz, 180W
Micropipettes	/

III. Méthodes

III.1. Préparation des extraits bruts :

Les extraits utilisés au cours de notre études sont préparés selon la technique décrite par (**Isbilir et al., 2012**) avec quelques modifications ; une prise d'essai de 5 g de poudre de *Pulicaria odora* a été mise à macérer dans 50 ml du solvant (acétone, éthanol, méthanol et eau distillé) absolu sous agitation à température ambiante pendant une nuit (24h).

L'extrait a été récupéré après filtration à l'aide de papier filtre, puis centrifugé à 3500 tours pendant 5 min et filtré pour une deuxième fois, puis évaporé à sec sous pression réduite à 25 °C au Rota-vapeur pour les extraits alcooliques, quant à l'extrait contenant de l'eau, il est séché au lyophilisateur. Les produits obtenus seront récupérés dans leurs solvants pour être finalement prêts pour les différents tests. Le résidu sec pesé est conservé à 4°C.

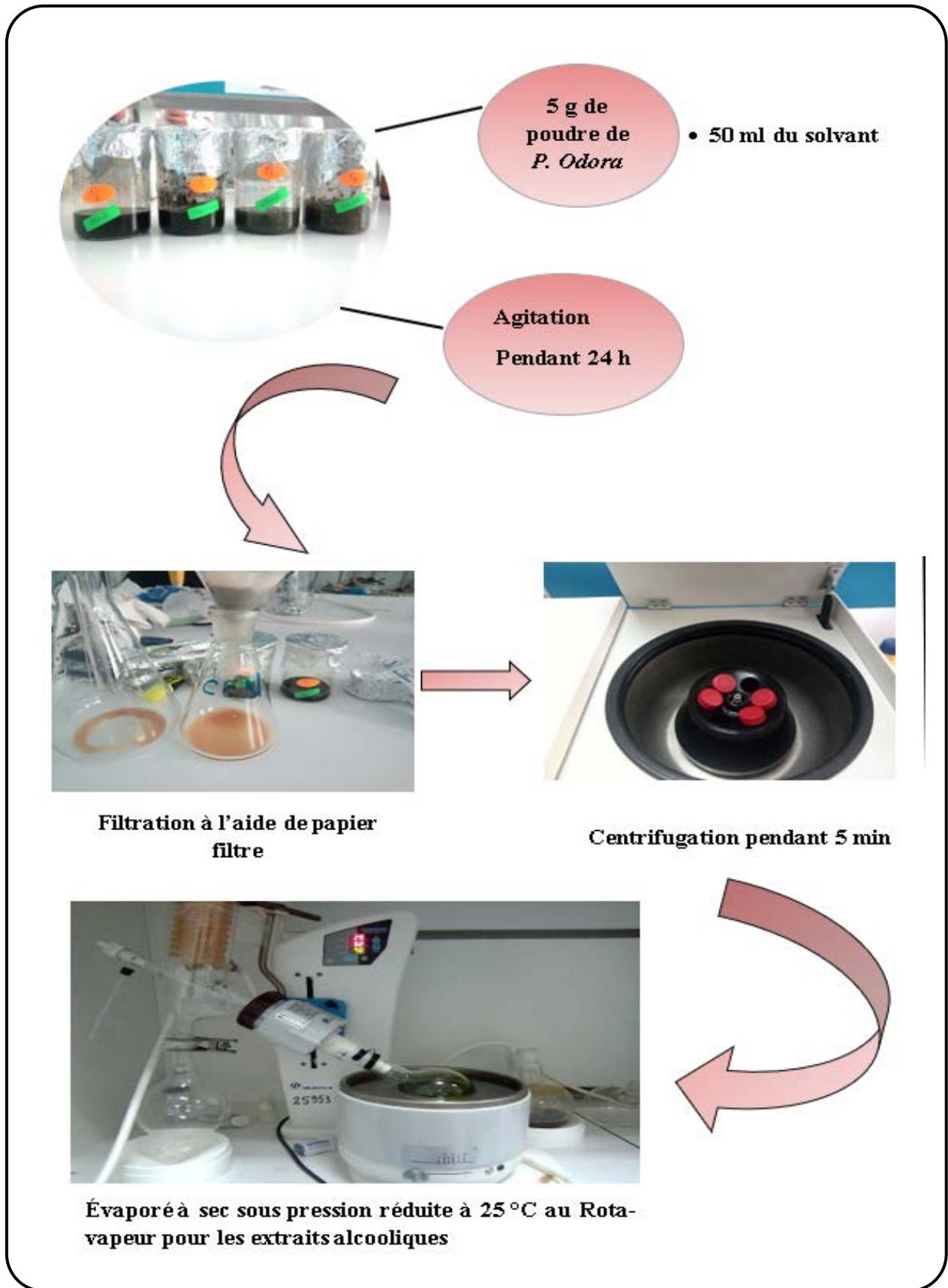


Figure 21 : Les étapes de la préparation des différents extraits.

III.1.2. Calcul de rendement :

Le pourcentage de rendement pour chaque extrait a été calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = (M/M0) \times 100$$

Où :

- ✓ **R (%)** : Rendement exprimé en %.
- ✓ **M** : Masse en grammes (g) de l'extrait sec résultant.
- ✓ **M0** : Masse en gramme (g) du matériel végétal à traiter.

III.2. Dosage des polyphénols totaux :

La teneur en phénols totaux des extraits de *Pulicaria odora* a été déterminée par la méthode de (Singleton et Ross, 1965) en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu.

Un volume de 200 µl pour chaque extrait de *C. villosus* à concentration de 2mg/ml est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Flin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à (7.5 %) est additionné. Le mélange est agité et laissé à l'obscurité à une température ambiante pendant 30 min. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance est mesurée à 765 nm. Une courbe d'étalonnage à différentes concentrations d'acide gallique a été préparée. Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

III.3. Dosage des flavonoïdes :

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par (Zhishen et al. 1999). Une quantité de 500 µl des extraits méthanoliques et éthanoliques (2mg/ml) est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) est rajouté. Après une incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc.

La teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g).

La concentration en flavonoïdes contenus dans les extraits a été calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

L'extraction dure environ entre 4h30 à 5 heures. A chaque extraction une quantité de 200 g des feuilles sèches broyées de *Pulicaria Odora* est introduit dans un ballon en verre à fond rond de un litre additionnée d'environ 400 ml d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition avec Une température de 300 °C, puis on diminue la température jusque 100 °C à l'aide d'un chauffe-eau ballon , les vapeurs se condensent en passant dans le réfrigérant qui est constamment refroidi par un courant d'eau froide du robinet et s'écoulent à l'état liquide, en goutte à goutte dans un récipient : c'est le distillat. Ce dernier est un mélange de deux phases non miscibles (eau et huiles essentielles), qui sont séparés par extraction liquide.

L'HE de *P. odora* a été récupérée à l'aide d'une pipette, déshydratée avec du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) pour éliminer les traces d'eau, puis conservée dans un flacon en verre hermétique et ombré au réfrigérateur à 4°C. Cette opération a été répétée 5 fois (utilisant un poids total de feuilles de 900 g) afin d'extraire une quantité suffisante d'HE pour l'étude de son activité biologique.

III-5- Étude de l'activité antioxydant de plants médicinale *plulicaria odora* :

III-5- 1 Test au DPPH :

III-5- 1-1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α , α -diphényl β picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilise pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont, d'azote (Figure 6) (Blois, 1958).

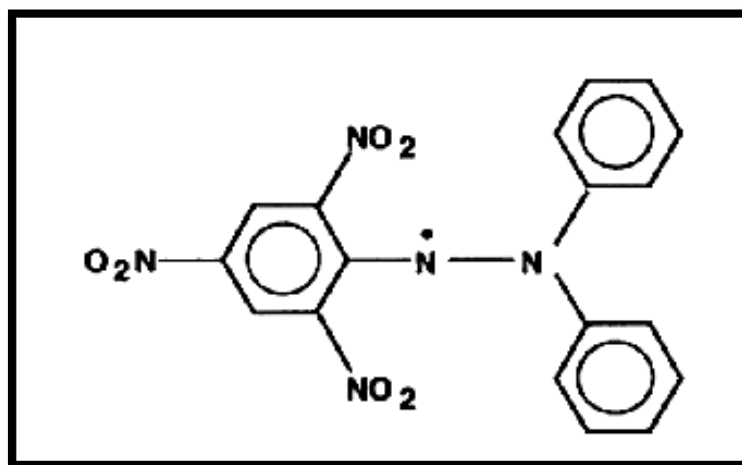


Figure 24 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2 DiPhenyle-1-Picryl- Hydrazyle).

III-5- 1-2 Dosage :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par (Benhammou et al ;2007). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100ml du solvant.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,950 ml de la solution méthanoïque du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanoïque de DPPH à la même concentration utilisée. Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration.

→ Pour le calcul des pourcentages d'inhibitions, nous avons utilisé la formule suivante :

$$I \% = ((Ac - At) / Ac) \times 100$$

Où :

- **I %** : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (AAR%).
- **Ac** : Absorbance du contrôle.
- **At** : Absorbance du test effectué.

Calcul des IC50 :

L'IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient Concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH.

Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

*Résultats
et
discussion*

I. Résultats et discussion :

I.1 Rendement de l'extraction des composés phénoliques :

La méthode d'extraction des composés phénoliques suivie est la méthode de macération qui consiste en la libération de molécules bioactive vers la solution d'extraction (eau ou solvant organique).

L'utilisation de la poudre à la place de la plante entière a pour but d'améliorer l'extraction du fait de rendre l'échantillon plus homogène, augmenter la surface du contact avec le solvant et faciliter sa pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage. (Jones et Kinghorn, 2005).

Au cours de notre travail, nous avons réalisé quatre 04 extractions qui sont : l'extraction aqueuse, l'extraction éthanolique, l'extraction Méthanolique et l'extraction Acétonique. Il a été déterminé par rapport à 5 g de matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage.

Les résultats obtenus à partir de ces différentes extractions dont le rendement, poids et la couleur sont illustré dans le tableau suivant :

Tableau VI : Rendement, poids et couleur des quatre extraits des feuilles sèches de *Pulicaria odora*.

<i>Pulicaria odora</i>	Extrait	Aqueux	Méthanolique	Ethanolique	Acétonique	Poids de l'extrait (g)
	Couleur	Brun	Verte foncée	Verte foncée	Brun foncé	5 g
	Rendement (%)	6.168	6.03	3.58	0.838	
	Poids de l'extrait (g)	0.3084 (g)	0.3015 (g)	0.179(g)	0.0419 (g)	

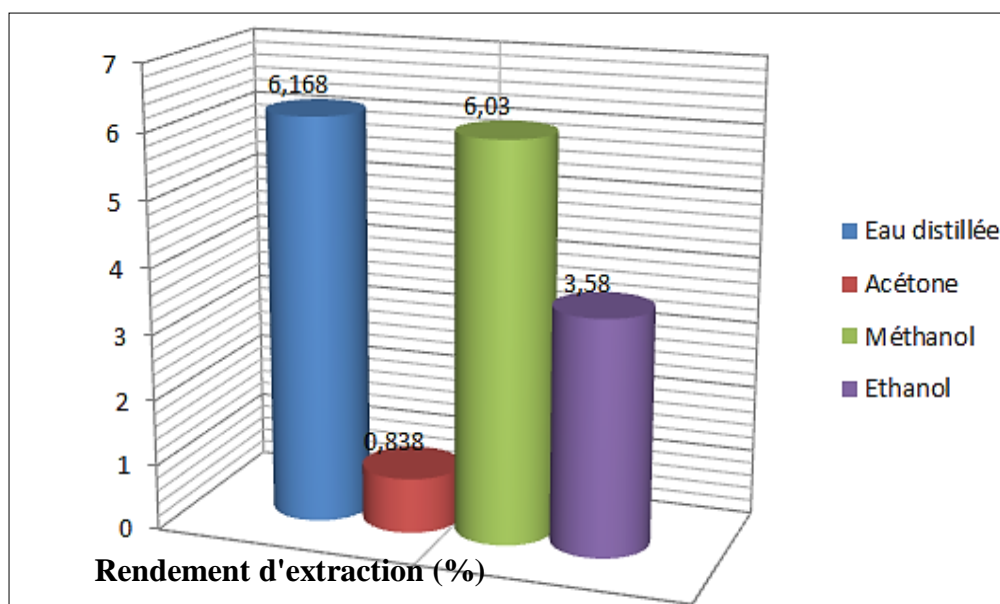


Figure 25 : Rendement d'extraction des composés phénoliques de *Pulicaria odora*.

L'imprégnation de la poudre de *Pulicaria odora* (feuille) dans différents solvants organiques donne des extraits de méthanol et d'éthanol vert foncé, et des extraits d'acétone et eau distillée brun. Les résultats ont montré que le taux d'extraction variait entre 0.838 % et 6.168 %. La valeur maximale du rendement est enregistrée pour l'eau distillée et la valeur minimale pour l'acétone.

Mothana et Lindequist (2005) ont trouvé des valeurs inférieures, les espèces *Pulicaria stephanocarpa*, utilisant du chloroforme, du méthanol et de l'eau (1,40, 2,98 et 2,20% continu).

Le rendement d'extraction n'est pas relatif ; il varie en fonction de la localisation géographique de l'espèce végétale, le degré de la maturité, la génétique, le climat, la période de récolte et l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites, la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa polarité. (**Kaplan, 1984**).

Les solvants alcooliques sont capables de faire augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (**Seidel, 2005**).

II. 2. Dosage des composés phénoliques :

Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes et tanins) constituent le groupe de composés phytochimiques le plus important chez les plantes (Beta et al., 2005). Sont possèdent des nombreuses activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antivirales, antiallergiques, anti-thrombotique et vasodilatatrices qui peuvent être reliées à leur activité anti-oxydante (Gulcin et al 2010).

La plupart des effets pharmacologiques des plantes sont causés par ces substances, un dosage de polyphénols totaux (ppt) des flavonoïdes des extraits (eau, acétone, méthanol et éthanol) sont analysés pour les estimer leur teneur.

II.2 .1. Dosage des polyphénols totaux :

La méthode suivie pour doser les ppt des différents extraits des feuilles sèches de *Pulicaria odora* est la méthode de Folin- Ciocalteu décrite par (Singleton et Ross, 1965). Cette méthode est considérée comme la meilleure pour déterminer la teneur en polyphénols totaux dans les extraits de plantes, car elle est standardisée, simple et reproductible. Les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent coloré sont minimisés à la grande longueur d'onde d'absorption (765 nm) utilisée (Huang et al.,2005 ; Djeridane et al.2010).

La teneur en polyphénols totaux des feuilles de *Pulicaria odora*, a été déterminée à partir d'une courbe standard en utilisant l'acide gallique comme étalon de référence (Annexe I).

Les résultats exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche sont présentés dans le (Tableau VII).

Tableau VII : Teneur des extraits de l'éthanol, méthanol, l'acétone et de l'eau de *pulicaria odora* en polyphénols totaux.

Extrait	Polyphénols
Ethanolique	11,51 ± 1.47
Méthanolique	47,76 ± 0,40
Acétonique	9,92 ± 0,40
Aqueux	30,02 ± 3,02

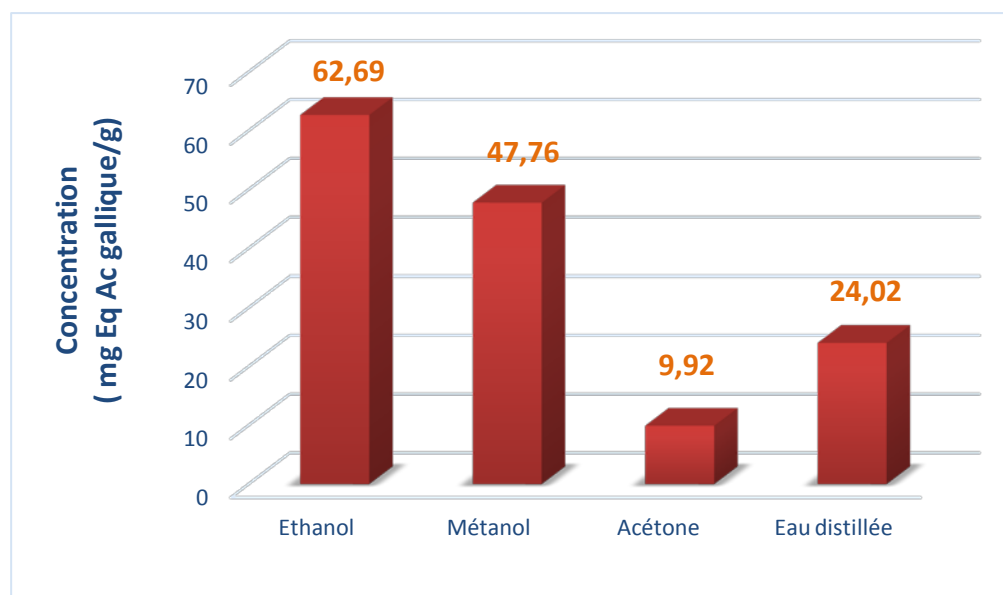


Figure 26 : Teneur en polyphénols totaux des différents extraits de *Pulicaria odora*.

Les résultats montrent que le taux le plus élevé des polyphénols totaux est obtenu avec l'éthanol suivi par le méthanol. Avec des valeurs de $62,69 \pm 3,27$ et $47,76 \pm 0,40$ mg eq Ac. Gallique/g respectivement. Tandis que le taux le plus bas est enregistré pour l'eau suivi par l'acétone avec des valeurs de $24,02 \pm 2,73$ et $9,92 \pm 0,40$ mg Eq Ac gallique/g respectivement.

Marwah et al. (2007), ont obtenu des valeurs très inférieures à nos résultats avec *Pulicaria crispa* et *Pluchea arabica*, soit 96.6 et 76.9 mg Eq Ac gallique par gramme d'extrait sec, ces résultats ont été obtenus, en réalisant deux extractions successives avec le chloroforme et le méthanol aqueux à 20%, pendant deux semaines pour chaque extraction, en utilisant toute la plante et non pas les feuilles uniquement.

Selon Albano et **Miguel (2011)**, des concentrations en composés phénoliques similaires peuvent être trouvées dans différentes plantes, en particulier si elles font partie de la même famille, d'après les résultats obtenus dans notre cas avec *Pulicaria odora*, cette plante est peut-être considérée comme la plus riche en composés phénoliques par rapport aux autres espèces étudiées du genre *Pulicaria*.

La variabilité de la teneur en polyphénols de ces espèces végétales peut être due à Les composants phénoliques de l'extrait (**Hayouni et al., 2007**), les facteurs génotypiques (**El-Waziry, 2007**), les conditions biologiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et non

biologiques (facteurs édaphiques) (Ksouri et al., 2008), les propriétés du sol et les types de microclimat (Atmani et al., 2009), et le stade bioclimatique de la croissance de ces plantes.

Bien que la méthode Folin soit sensible et simple, elle n'est pas spécifique aux Polyphénols. En effet, le réactif peut réagir avec les protéines, les sucres réducteurs, l'acide ascorbique et les composés soufrés

I. 3. Dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes des différents extraits des feuilles de *Pulicaria odora* a été déterminée en utilisant de trichlorure d'aluminium (AlCl₃). Les résultats sont exprimés en mg eq la quercétine/g matière sèche (tableau VIII).

La teneur en flavonoïdes est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage utilisant la quercétine (Annexe II).

Tableau VIII : Teneur en flavonoïdes des extraits de l'éthanol, méthanol, l'acétone et de l'eau de *pulicaria odora*.

Extrait	Flavonoïdes
Ethanolique	136 ± 19,21
Méthanolique	263,85 ± 101,13
Acétonique	111,71 ± 14,86
Aqueux	367,19 ± 89,97

Les résultats des tests de flavonoïdes montrent que l'extrait aqueux produit le taux le plus élevé **367,19 ± 89,97** mg Eq Quercétine/g), suivi de l'éthanol, la valeur est de **309,09 ± 26,24**. Cependant, le minimum est étiqueté comme l'extrait méthanol et acétone avec des valeurs de **263,85 ± 101,13** et **111,71 ± 14,86** mg eq Ac. Gallique/g respectivement.

D'après les teneurs obtenues dans notre étude, nous pouvons dire que les feuilles de *P. Odora* constituent une source non négligeable de flavonoïdes.



Figure 27 : Teneur en flavonoïdes totaux des différents extraits de *Pulicaria odora*.

En conséquence, le choix du bon système de solvant est l'étape **la plus critique** pour obtenir une bonne teneur en composés phénoliques, flavonoïdes ou tout autre composé d'un échantillon

Nous sommes donc arrivés à la même conclusion qui été déjà établi par Sulaiman et al. en 2011.

Et d'autre part **Conforti et al. (2009)**, ont trouvé des valeurs allant de 7,49 à 32,9 mg Eq quercétine/g matière sèche, à partir de feuilles de cinq espèces de la famille des astéracées, et en utilisant de l'éthanol aqueux à 70 % pour l'extraction.

Selon Seidel (2005), l'eau et le méthanol sont deux solvants polaires qui extraient particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins. Tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool (**Marston et Hostettmann,2006**).

II. 3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Pulicaria Odora* :

Pour détecter l'activité antiradicalaire des différents extraits de *Pulicaria odora*, nous avons utilisé le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable, de violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en routine est basé sur le fait que lorsque le DPPH est réduit par un composé aux propriétés anti-radicalaires, la valeur maximale disparaît, entraînant une décoloration.

En faisant varier la concentration de l'extrait et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI %), nous avons établi le profil d'activité oxydante, et c'est à partir de ce profil que nous avons déduit également la valeur correspondante à la IC 50.

Tableau IX. Pourcentages de la réduction du radical DPPH° des extraits de *Pulicaria Odora*

Les concentrations		Les pourcentages de la réduction du radical DPPH•			
Concentrations initiales en (mg/ml)	Concentrions dans Le mélange réactionnel en (mg/ml)	(%) de d'inhibition de E. méthanol	(%) de d'inhibition de E. Acétone	(%) de d'inhibition de E. Aqueux	(%) de d'inhibition de E. éthanol
100	1	62.025 ± 1.61	21.47 ± 2.55	34.125 ± 5.40	8.37 ± 1.35
80	0.8	55.175 ± 4.13	20.835 ± 2.94	25.455 ± 1.88	7.244 ± 1.47
60	0.6	47.87 ± 4.97	16.44 ± 0.31	23.45 ± 3.24	6.575 ± 1.29
40	0.4	25.935 ± 4.63	13.935 ± 0.61	16.37 ± 3.53	3.465 ± 1.27
20	0.2	11.45 ± 3.81	6.39 ± 5.67	14.515 ± 6.67	1.15 ± 0.73

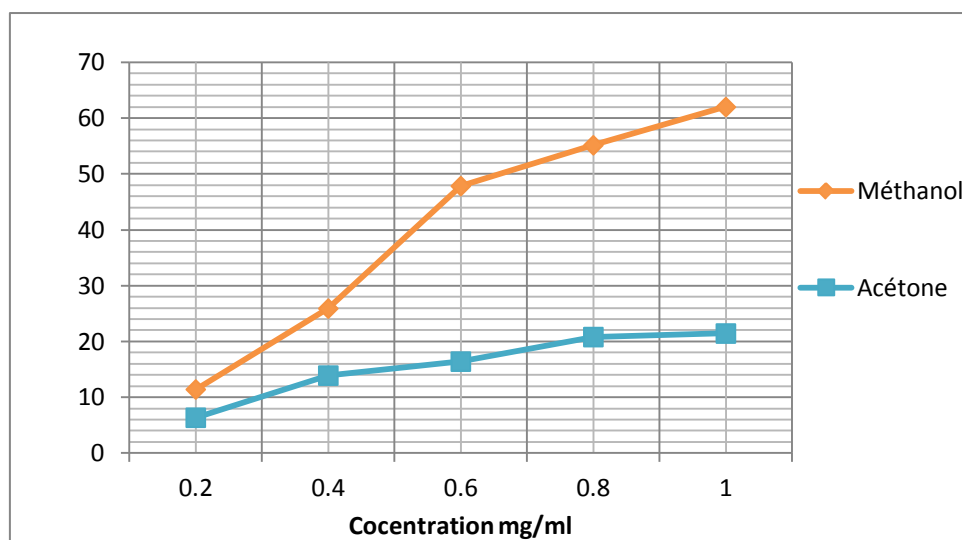
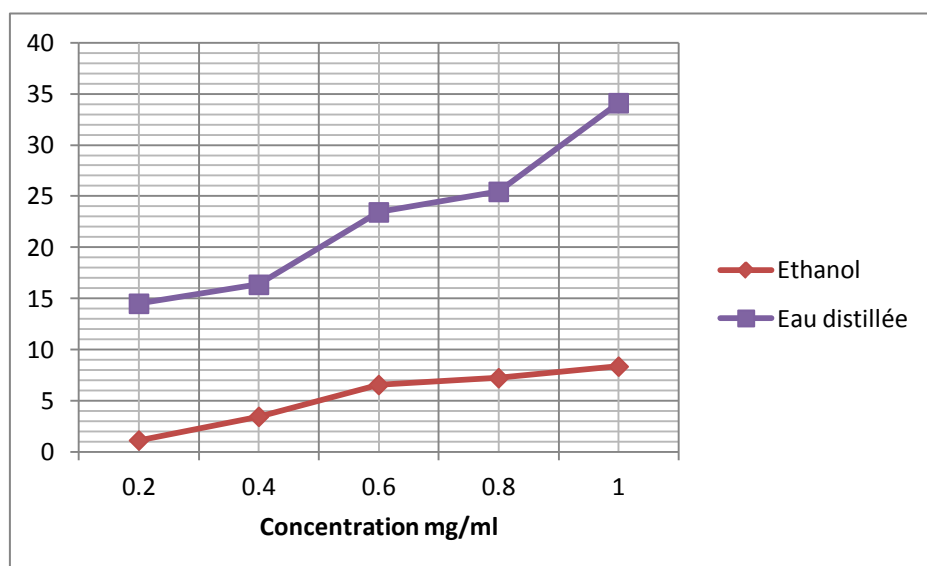


Figure 28 : Courbe présentant le pourcentage d’inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l’extrait méthanol et acétone.

La courbe d'activité antioxydante obtenue montre que le pourcentage d'inhibition (PI) dépend de la concentration des extraits méthanolique et acétonique de *pulicaria odora*.

Un effet anti radicalaire maximal de (62 ;025%) est exercé par l’extrait méthanolique et de (21.47 %) par l’extrait éthanolique à une concentration de 1 mg/ml. Ceci montre que l’espèce



P. Odora possède un potentiel antioxydant.

Figure 29 : Courbe présentant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait eau distillée et éthanol.

Les profils de l'activité antioxydante obtenus à partir des extraits aqueux et éthanolique révèle une augmentation des pourcentages d'inhibition (PI) en fonction des concentrations.

L'extrait aqueux a présenté l'activité anti-radicalaire la plus élevée (**34.125 %**) Tandis que la plus basse est enregistrée avec l'extrait éthanolique (**8.37%**).

Selon les résultats trouvés, l'extrait méthanolique est doté d'un grand pouvoir antioxydant . On remarque également que le pourcentage de piégeage du DPPH augmente en élevant la concentration des extraits, donc la concentration en éléments antioxydants est augmentée dans le milieu réactionnel.

II. 3. 1Détermination des IC50 des extraits :

La valeur IC50 (concentration inhibitrice à 50%) est déterminée pour les extraits. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH, ou encore, c'est la concentration de l'échantillon exigée pour diminuer de 50% l'absorbance de la solution de DPPH. Les IC50 sont inversement proportionnelles à l'effet **scavenger** dont les valeurs faibles reflètent un effet antiradicalaire important (**Villano et al., 2007**).

Les IC50 de chacun des différents extraits ont été déterminées, les résultats sont présentés dans le tableau suivant

Tableau X : Valeurs des concentrations efficaces 50% de l'activité anti radicalaire

SOLVANT	IC50%
Méthanol	0.74 ± 0.04
Acétone	2.71 ± 1.08
Ethanol	5.68 ± 1.44

Eau distillée	1.79 ± 0.06
---------------	-------------

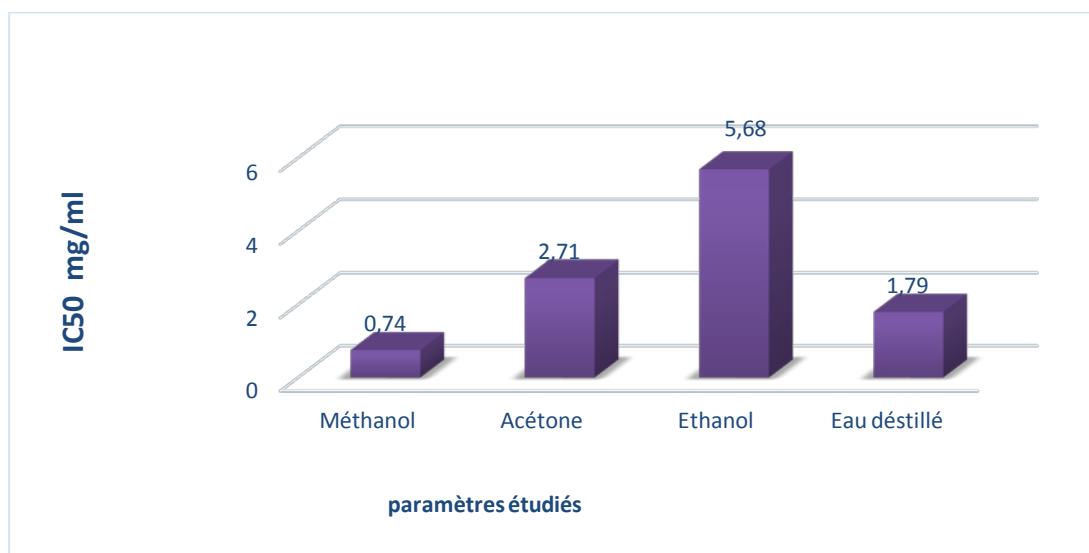


Figure 30 : Valeurs des concentrations efficaces 50% de l'activité anti radicalaire.

L'histogramme représente les concentrations des extraits de la plante *P. Odora* qui piègent 50 % du radical DPPH• (IC50). Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé. L'extrait de méthanol a donné une IC50 de l'ordre de 0.74 mg/ml, ce résultat reste satisfaisant, ainsi on peut considérer l'extrait de méthanol comme un puissant antioxydant.

Cette grande activité antioxydante de l'extrait peut être expliquée par leur forte teneur en flavonoïdes qui sont considérés comme d'excellents antioxydants dont les propriétés oxydo-réducteurs leurs permettent d'agir comme des agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et inhibiteurs de l'oxygène singulet et triplet (Kerbouche, 2010).

Conclusion :

L'étude de l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *pulicaria odora L.*, selon la méthode du piégeage du radical libre DPPH a montré que l'extrait méthanolique possède une grande activité antioxydante. Cet extrait pourrait donc constituer une alternative à certains additifs synthétiques. Il convient d'attirer l'attention sur le fait que ces résultats sont obtenus in vitro seulement. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils permettent ainsi de rechercher

directement l'activité antioxydante ou peroxydante des composés ou des extraits in vivo pour corréler les résultats observés dans les deux cas.

Conclusion

Les plantes aromatiques constituent une source insoupçonnée de molécules bioactives qui pourront servir à de nouvelles thérapies (aromathérapie) complémentaire aux thérapies conventionnelles.

A cet effet, plusieurs analyses de caractérisations ont été réalisées sur une plante appartenant à la famille des Astéracées, à savoir : extraction de son huile essentielle, le dosage des composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) ainsi que leur effet antioxydant.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressées à l'étude générale de cette plante en passant par la préparation des différents extraits, extraction de l'huile essentielle, le dosage des composés phénoliques, et l'évaluation de son pouvoir antioxydants.

L'extraction des composés phénoliques des feuilles de la plante a permis d'obtenir des rendements différents selon les solvants utilisés, tandis que la teneur en composés polyphénoliques, flavonoïdes était substantiel.

Concernant l'activité antioxydante des extraits de *Pulicaria odora* a été évaluée in vitro par la méthode de piégeage des radicaux DPPH[•].

D'après les résultats obtenus dans cette étude, on peut dire que *Pulicaria odora* est riche en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Les extraits donnent une bonne activité antioxydant par une capacité de piégeage de radicaux libres.

Références Bibliographiques



- **Aiache J., Carnat A., Coudert P.**, 2012 ; Source actuelles et futures du médicament-chimie du médicament (Cours+QCM). Éditions Elsevier Masson, France.45p.
- **Algabr MN, Ameddah S, Menad A, Mekkiou R, Chalchat JC, Benayeche S et Benayeche F.** (2012). Essential oil composition of *Pulicaria Jaubertii* from Yemen. International journal of medicinal and aromatique plants. 2(4). 688.
- **Albano SM. et Miguel MG.** (2011). Biological activities of extract of plants grown in Portugal. Industrial Crops and Products. 33: 338-343.
- **AFNOR, 2000** : Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P.
-
- **Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbache, N., Atmani, D.** (2009). Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. Food Chem, 112 : 303–309.
- **Aurousseau B.** (2002) – Les radicaux libres dans l’organisme des animaux d’élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA. Prod. Anim. 15: 67-82.



- **Bacis, 1999** Boelens Aroma Chemical information Service - ESO 2000, the complete.

Références Bibliographiques

- **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008.** Biological effects of essential oils. *Rev: Food. Chem.Toxicol.* 46 : 446–475.
- **Barbieri, E., Sestili, P., 2012 ;** Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling. *Journal Of Signal Transduction*, 982794.17p.
- **Bellakhdar, J. (1997)** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires.
- **Benhammou N., Bekkara A., Kadifkova P. (2007).** Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf, *Advances in FoodSciences*,29(3), 155-161
- **Beta T., Nam S ., Dexter J E et Sapirstein H D (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearkd wheat and Roller Milled fractions .*Cereal chem* , 82 - 390-393.
- **Blois, M.** Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181, 1199–1200 (1958).
- **Blaschek.W, Hainsel.R, Keller.K, Reichling.J, Rimpler.H, Schneider.G. H.** **Handbuch** der Pharmazeutischen Praxis, vol 2: Drogen A-K. New York: Springer Publishing; 1998. p. 526.
- **Boukhobza F et Gotez P., 2014 ;** phytothérapie en odontologie, éditions CdP, France, section 1.

Références Bibliographiques

- **Boukhalfa M. (2014).** Étude de l'activité antioxydante (test d'ABTS) des huiles essentielles et la pédologie haloxylon Scoparium pomel (remth) de la région de Naama. Mémoire de master en production et amélioration végétal, Université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen. P - 22-30.
- **Bruneton J.,** 1999. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P : 1120.
- **Bruneton J.,** 2008. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. 2ème Edition, Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P: 1188.
- **Buettner, GR.,** 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, Alpha-tocopherol, and ascorbate. Arch. Biochem. Biophys. 300 :535-543.
- **Burits M., Bucar F.,** 2000. Antioxydant activity of Nigella sativa essential oil. Phytotherapy Research. 14 : 323-328.
- **Burt S.,** 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in Foods. A review intern : J. Food. Microbiol. 94: 223-253.
- **Bonnefont - Rousselot D., Peynet J., Beaudoux J. L., Théron P., Legrand A. B. and Delattre J.,** 2002. Stress oxydant, fonctions vasculaires et atherosclérose. Nutrition clinique et Métabolisme, 16 260-267.

Références Bibliographiques

- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris. P : 915.



- **Chabrier, J.Y., 2010.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy 1.165p.
- **Chiasson. H et Beloin.N(2007).** Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre » Bulletin de la Société d'entomologie du Québec Antennae , vol. 14, no 1
- **Cole G.M., G.P. Lim, F.Yang, B.Teter, A. Begum, Q. Ma, M.E Harris-White and A Frautschy. (2005).** Prevention of Alzheimer's disease: Omega-3 fatty acid and phenolic anti-oxidant interventions. Neurobiology of Aging, 26, S133–S136.
- **Chouiteh O.** composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de Glycyrrhiza glabra [thèse] Oran : Université d'Oran 2012.
- **Courtial S.** précis d'aromathérapie vétérinaire à l'usage des pharmaciens d'officine [thèse]. Université de Nante, faculté de pharmacie. 2005
- **Cotelle, N.; Bernier, J.L.; Catteau, J.P.; Pommery, J.; Wallet, J.C.; Gaydou, E.M.** Antioxidant properties of hydroxy-flavones, Free Radic. Biol. Med. 1996, 20: 35-43.
- **Cronquist A.J. (1988).** The evaluation and classification of flowering plants, 2nd. Edit., New York, New York Bot.Garden. P 566



- **Dasgupta N., De B., 2007.** Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: a

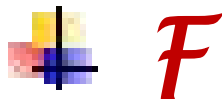
Références Bibliographiques

Comparative study. Food.

- **Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. YvesDacosta, Paris. P:317.
- **Degryse A. C, Delpla I, et voinier M.A(2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé et environnement-IGS-EHESP.P9Chem. 101:471 – 474
- **Dupont F. Et Guignard J.-L., 2012,** Botanique Les familles de plantes. Édition, Masson Elsevier, 300 p.



- **Enam.A.Khalil, Fatma.U.Afifi, Maysa.Al-Hussaini.** Journal of Ethnopharmacology 2007 109 104–112. Harborne J.B., *biol. Chem. comp.* 1977, 1, 359.
- **Ezoubeiri A, Gadhi CA, Fdil N, Benharref A, Jana M et Vanhaelen M. (2005).** Isolation and antimicrobial activity of two phenolic compounds from *Pulicaria odora* L. *Journal of Ethnopharmacology.* 99, 287–292.
- **El-Waziry, A.M. (2007).** Nutritive value assessment of ensiling or mixing *Acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3(6): 605-614.



Références Bibliographiques

- **Favier A.**, 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. Ann. Pharm. Fr. 64: 390-396.
- **Favier A.**, 2003. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité chimique. 108-117.
- **Franchome P , Jollois R, Pénoel D.** L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation des extraits aromatiques. Paris : Edition Roger Jollois. 2001.
- **Franchomme, P.; Pénoël, D.** 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jollois éditeur. Limoges. 445 p



- **Gaussen, H.F.** Leroy, Précis de Botanique (végétaux supérieurs). 2ème Ed, p 426, (1982).
- **Gil del Valle L., Hernández R.G., Pérez Ávila J., 2013** ; Oxidative Stress Associated to Disease Progression and Toxicity during Antiretroviral Therapy in Human Immunodeficiency Virus Infection, Journal of Virology & Microbiology, Article ID 279685, 15.
- **Goetz P., Busser C., 2008; la phytocosmétologie thérapeutique**, Edition springer shop, France, 58p.
- **Goeb Ph, (1999).** Aromathérapie pratique et familiale. Ed. MDB.

Références Bibliographiques

- **Goetz P., Ghedira K., 2012;** Phytothérapie anti-infectueuse. Edition Springer-Verlage, Paris,France, 382p.
- **Groussard C. (2006)** – Stress oxydatif et exercice anaérobie. Oxidative stress and anaerobic exercise. Science &Sports. 21 : 201-209.
- **Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M et Aboul-Enein H Y (2010).** Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. Arabian Journal of Chemistry, 3, 43-53
- **Guignard.J.L.** 1994, Abrégé Botanique, 9ème Ed.204.
- **Guignard, Jean-Louis. 2000.** Biochimie végétale. 2ème édition de l'abrégé Dunod.



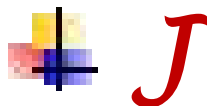
- **Harborne.J. B, swain.t.** 1969, perspectives in phytochemistry, academic press, london, new york.
- **Hanbali FEL, Akssira M, Ezoubeiri A, Gadhi CA, Mellouki F, Benherraaf Ahmed, Blazquez AM et Herminio B. (2005).** Chemical composition and antibacterial activity of Essential oil of Pulicaria odora L. Journal of Ethnopharmacology. 99, 399–401.
- **Haddad D, Hadji D.** Contribution à l'étude des huiles essentielles de Myrtus communis L. [thèse]. Université Mouloud Mammeri. Tizi ousou, **2016**

Références Bibliographiques

- **Huang D., OuB. Et Prior R.L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J of Agr Food chem.* 53:1841-1856. *merican Journal of Clinical Nutrition*, 78, 544-551.
- **Hubert Richard., 1998.** *Biochimie de l'aliment, acides aminés et oligopeptides* ENSIA.
- **Hayouni, E.A., Abedrabba. M., Bouix, M., Hamdi, M. (2007).** The effects of solvents and Extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus.




- **Isbilir, S.S., Orak, H.H., Yagar, H., Ekinci, N.(2012)** Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Sci. Pol.*, 11, 223–237.



- **Jammaledine M.** Extraction et caractérisation de la composition des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et *Juniperus oxycedrus* du Moyen Atlas [Mémoire]. Université sidi mohammed ben abdellah. Fès, 2010.
-
- **Jiangsu, New Medical College.** In *Dictionary of Traditional Chinese Material Medica*; Shanghai People's Press, 1977; Vol. 2, p 2216.
- **Jiangsu New Medical College (Ed.),** *Dictionary of Traditional Chinese Medicines*, Shanghai Scientific and Technological Publishing House, Shanghai, 1986, p. 80

Références Bibliographiques

- **Jouault S., 2012.** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de doctorat d'état en pharmacie. Université de Lorraine. Faculté de pharmacie. France. 137 p
 - **Jones W P et Kinghorn A D (2005).** Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Humana Press (Totowa), pp: 323-411
 - **Jorite S.** La phytothérapie, une discipline entre passé et future : de l'herboristerie aux pharmacies dédiées au naturel. [Thèse]. Bordeaux, Université de Bordeaux, 2015.
- 
- **Kaloustian, J. Chevalier, C. Mikail, M. Martino, L. Abou, M.-F. Vergnes.** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. Springer 2008
DOI 10.1007/s10298-008-0307-1.
 - **Kandikattu H.K., Rachitha P., Krupashree K., Jayashree G.V., Abhishek V., & Khanum F., 2015;** LC-ESI-MS/MS analysis of total oligomeric flavonoid fraction of *Cyperus rotundus* and its antioxidant, damage protective and antihemolytic effects. *Pathophysiology*, 22(4): 165-173.
 - **Koechlin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*. 20 : 165–177.
 - **Kunle , O. , J. Okogun , 2003.** Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol
from *Lippia multiflora* leaf extract *Phytomedicine* . Vol 10 . p59-61 .

Références Bibliographiques

- **Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly. C. (2007).** Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249



- **Lamien-Meda A., Lamien C.E., Compaoré M.M.Y., Meda R.N.T., Kiendrebeogo M., zeba B., Millogo J.F. & Nacoulma O.G. 2008.** Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Fourteen Wild Edible Fruits from Burkina Faso. *Molecules*, 13: 581-594.
- **Landis G. N, Tower J. (2005).** Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev*, 126, p 365–379.
- **Lavagne A (2006)** La végétation des bas-marais du vallon du Lauzanier Larche (Alpes-de-Haute-Provence, France) -.06, p. 41- 57 - Départ. /Région : , *Le Journal de Botanique*, 1, N°34
- **Lempiäinen, T.(1992).** Macrofossil finds of henbane (*Hyoscyamus niger*) in the old settlement layers in southern Finland. *Review of Palaeobotany and Palynology*. 73: 227–239.
- **Lucchesi M.E. (2005).** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes, conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat de en sciences. Université de la Réunion. 143p



Références Bibliographiques

- **Makhloufi A. (2013).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat en Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments. Université de Tlemcen. P 64,65,66,67,74

- **Marwah RG, Fatope MO, Al Mahrooqi R, Varma GB, Al Abadi H et Al-Burtamani SKS. (2007).** Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chemistry* ,101: 469.

- **Marston A et Hostettmann K. (2006).** Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography*. 1112 (2): 181-194.

- **Massion P., Preise R.J.C. et Balligand J.L. (2002)** – Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères. *Reactive nitrogen species : deleterious or not. Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 248- 252

- **Meddour R., 2010.** Bioclimatologie, phytogéographie et phytosociologie en Algérie. Exemple des groupements forestiers et préforestiers de la Kabylie. Thèse. Doct. Agr. Option : Foresterie. U.M.M.T.O. 398p.

- **Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S., 2004.** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochem. Rev.* 3 :173-193.

- **Mothana RAA et Lindequist U. (2005).** Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology*, 96 : 180.

Références Bibliographiques



- **OKUDA.T.** (Ed.), Encyclopedia of Natural Medicine, vol. 1, Hirokawa, Tokyo, 1986, p. 64.



- **Pelli, K., Lyly, M., 2003.** Les antioxydants dans l'alimentation. INRA. France. pp: 4-17.
- **Pincemail, J., Defraigne J.O. and Limet, R. (1998).** Vitamines, acides gras et prévention des maladies cardiovasculaires. Medi Sphère. 1-5
- **Piquet MA., et Hébuterne X., 2007.** Nutrition en pathologie digestive ; Ed : DOIN ; p: 16,20
- **Pibiri M. C. (2006)** - Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse Doctorat, EPFL Lausanne, p.161.
- **Poknory J., Yanishlieva N., Gordon H., 2001.** Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Woodhead Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angleterre.
- **Pottier G.** Artemisia herba-alba. Flore de la Tunisie : angiospermes–dicotylédones–gamopétales, (1981) p 1012



- **Quezel.F, Santa.S. 1962-1963,** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1-2. Ed. CNRS, Paris France.

Références Bibliographiques



- **Rameau, J.C. & al., 2008.** Flore forestière française : guide écologique illustré. Tome 3 : Région méditerranéenne. Ministère de l'Agriculture et Institut pour le développement forestier, 2421 p.
- **Riotte B., 2017 ;** Mon guide huiles essentielles secrets, recettes et astuces. Editions lulu.Com. France. 14p



- **Sadowska-Bartosz S I., Bartosz G., 2015;** Oxidative nitrative and chlorinative stress: biomarkers. In: Studies on Psychiatric Disorders. Series: Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, XVIII, Humana Press, 1 -39.
- **Sarangarajan R., Meera S., Rukkumani R., Sankar P., Anuradha G., 2017;** Antioxidants: Friend or Foe?, Asian Pacific Journal of Tropical Medici
- **Seidel V. (2005).** Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Edition: Humana Press (Totowa). pp.27-37.
- **Sevanian A., Nordenbrand K., Kim E., Ernester L., Hochstein P. (1990)** Microsomal lipid peroxidation: The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. Free Radic Biol Med. 8: 145-152.

Références Bibliographiques

- **Singleton V L., Rossi J A.(1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. American Journal of Technology and Viticulture.
- **Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299, 152-178
- **Sulaiman SF, Sajak AB, Ooi KL, Supriatno Seow EM. (2011).** Effect of solvents in extracting polyphénols and antioxydants of selected raw vegetables. Journal of Food composition and Analysis. 24: 506-515



- **Tardio.J, Pascual.H, Morales.R. 2002** Alimentos silvestres de Madrid, La Libreria, Madrid
- **Tamer F.M.D. (2003)** – Free Radicals, Types, Sources and Damaging Reactions. Internal Medicine Articles.
- **Tarnawski M., Depta K., Grejciun D., Szelepin B., 2006.** HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immunomodulator. J.Pharm. Biomed.Anal. 41: 182–188.
- **Tchamdja K.M. (1995).** Etude de performance d'un extracteur artisanal pour la production d'essence de citronnelle. Mémoire d'ingénieur des travaux biologiques, ESTBA, UB., 95 p

Références Bibliographiques



- **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160:1-40.
- **Villar.L, Palacin.J.M, Calvo.C, Gomez.D, Monserrat.G. 1987.** Plantas medicinales del Pirineo aragones y demas tierras oscenses, CSIC, Diputacion de Huesca, Huesca



- **Wang L., Yen JH., Liang HL., Wu1 MJ., 2003.** Antioxidant Effect of Methanol Extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.) .*Journal of Food and Drug Analysis*. 11(1): 60-66.
- **Werner J., Bauer B.R., Loliger J., 2010;** science et technologie des aliments : principes de chimie des constituants et technologie des procédés, Edition PPUR Presses Polytechniques. France. 329P.
- **White N., 1994.** Artemisinin: CUITent statut. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:3- 4.
- **Wichtl M. & Anton R. (1999) :** Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. éd. Tec et Doc.

Références Bibliographiques



- **Zhiri A., Mayaud L., Bouhdid S., Baudoux D, Abrini J, Aubert G(2010).** Evaluation de l'activité bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques. Congrès Francophone de Phytothérapie – Beyrouth
- **Zhishen J., Mengcheng T. et Jianming W. (1999).** Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials, Food Chemistry, 64: 555-