



*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 la biologie moléculaire et cellulaire*

**MEMOIRE**

Pour l'obtention du Diplôme de

**MASTER**

**FILIERE : Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**OPTION : Microbiologie**

**Thème**

**Screening phytochimique et étude de  
l'activité antibactérienne et antioxydante  
des huiles essentielles d'*Allium sativum* L.  
var. la rouge locale**

**Présenté par**

**BENDJABALLAH khadidja Meriem**

**Soutenu le: 15 juin 2015**

**Jury de soutenance**

<b>Président : Mr. KHABTHANE A.</b>	<b>MCB</b>	<b>Univ. Abbes Laghrou –Khenchela</b>
<b>Examineur : Mr. ZERAIB A.</b>	<b>MAA</b>	<b>Univ. Abbes Laghrou –Khenchela</b>
<b>Rapporteur : Mme KADI K.</b>	<b>MCB</b>	<b>Univ. Abbes Laghrou –Khenchela</b>

**Promotion : juin 2015**

# Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mon chère **papa** qui malgré tout il était toujours là à me soutenir

j'espère qu'il sera fier de moi

A ma très chère **maman**

A mon chère grand-père NOUREDDINE

A ma grand-mère HASSIBA

A mes frères : AYMEN, MOHAMED et ABDNOOR

A mes sœurs : Malek, Amina et Yasmine

A mes tentes : Fouzia et Souad

A mes oncles : farouk et fouzi

A tous mes cousins et cousines

A tout mes enseignants et mes collègues

A toute ma chère famille

# Remerciements

***Nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour le courage qu'il nous a donnés pour mener ce travail à terme.***

***Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements au Mme. KADI K .qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire. J'ai été satisfait de votre qualité exceptionnelle de bonne enseignante, merci de m'avoir guidé avec patience et d'avoir consacré autant d'heures pour les corrections de ce manuscrit ; je ne peux, Madame, que sincèrement vous exprimer mon respect et mon gratitude.***

***Je tiens à remercier Mr. KHABTHANE A. d'avoir accepté la présidence du jury de mon travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.***

***Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect a Mr ZERAIB., d'avoir accepté de juger ce modeste travail, malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations. Vous trouvez ici toutes mes expressions respectueuses.***

***Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont aussi à toute l'équipe du laboratoire de l'université de KHANCHELA.***

***Je tiens à remercier également Mr et Mme HOUHA d'avoir était toujours la à me soutenir dans ce travail***

## Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales aromatiques de l'Algérie, nous nous sommes intéressés à ce travail qui consiste à mettre en évidence l'évaluation du rendement des huiles essentielles d'une plante alimentaire, condimentaire et médicinale : l'ail cultivé (*Allium sativum* L. var. la Rouge locale) ces huiles sont obtenues par l'extraction à la vapeur ainsi que l'évaluation de ses activité antioxydante et antibactérienne vis-à-vis différentes souches bactériennes.

Les résultats ont montré, un rendement en huile essentielle de 0.86%. l'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH a montré une activité antioxydante de l'huile essentielle de l'ail var. Rouge locale. L'estimation de l'activité antibactérienne des extraits bruts et des huiles essentielles sur 4 souches cliniques : *Pseudomonas Aeruginosa* (G-) *Escherichia coli* (G-) *Staphylococcus aureus* (G+) *Staphylococcus aureus* (G+) par la méthode de diffusion en disque, les résultats obtenus présentent une différence significative entre les souches testées et les différents extraits et l'interaction entre les deux. Ainsi l'effet inhibiteur le plus marqué est obtenu avec la souche *Staphylococcus aureus* par un diamètre 12mm par contre la souche *Pseudomonas Aeruginosa* a présenté une certaine résistance aux extraits testés.

**Mots clés :** *Allium sativum* L., Huiles essentielles, activité antioxydante, activité antibactérienne.

## Summary

As part of the valorisation of aromatic medicinal plants in Algeria, we looked at this work of high lighting the performance evaluation of the essential oils of plant food, condiment and medicinal: cultivated garlic (*Allium sativum* L. var local Red.) obtained by the extraction steam and is antibacterial and antioxidant activity via different bacterial strains.

The results showed an essential oil yield of 0.85%. The study of antioxidant by the method of DPPH showed antioxidant activity of the essential oil of garlic var. Local Red. The estimate of the antibacterial activity of crude extracts and essential oils of 4 clinical strains *Pseudomonas Aeruginosa* (G) *Escherichia coli* (G) *Staphylococcus aureus* (G +) *Staphylococcus aureus* (G +) by the disc diffusion method, results show a significant difference between the tested strains and the various extracts and the interaction between the two. Thus the most marked inhibitory effect is obtained with *Staphylococcus aureus* strain with a 12mm diameter by *Pseudomonas aeruginosa* against the strain showed some resistance to the tested extracts.

**Keywords:** *Allium sativum* L., Essential oils, antioxidant activity, antibacterial activity.

## ملخص

في إطار تقييم النباتات الطبية والعطرية، اهتمنا في هذا العمل و الذي يتمثل في تقييم مردود الزيوت الأساسية لنبات غذائي، تابل و طربي: الثوم (*Allium sativum* L.)، هذه الزيوت استخلصت بطريقة التبخير، اضافة الى تقييم فعاليتها ضد المؤكسدة و ضد البكتيرية ضد سلالات بكتيرية مختلفة

النتائج المتحصل عليها اثبتت أن مردود الزيوت الأساسية هو 0.86%..... أما دراسة الفعالية ضد المؤكسدة بواسطة طريقة البخار أوضحت أن زيوت نبات الثوم لها فعالية ضد مؤكسدة، و الفعالية ضد البكتيرية للمستخلصين الخام و مستخلص الزيوت الأساسية ضد أربع سلالات اكلينيكية : *Pseudomonas Aeruginosa* *Staphylococcus aureus* (G+) *Staphylococcus aureus* (G+) *Escherichia coli* (G-). بواسطة طريقة الانتشار عن طريق الأقراص، النتائج أوضحت وجود فروق معنوية بين مختلف السلالات البكتيرية المختبرة و المستخلصات و التداخل بينهما. كما أن التأثير المثبط الأعلى هو الملاحظ عند السلالة *Staphylococcus aureus* يقطر تثبيط 12 مم أما السلالة *Pseudomonas Aeruginosa* فقد بينت نوعا من المقاومة للمستخلصات المختبرة.

**الكلمات المفتاحية:** *Allium sativum* L.، الزيوت الأساسية، الفعالية ضد المؤكسدة، الفعالية ضد البكتيرية.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE I. Généralité sur <i>Allium sativum</i> L.</b>	
I. Description botanique.....	4
1.1 Classification botanique.....	5
2. Propriétés pharmacologiques et emplois.....	5
<b>CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles</b>	
I. Les huiles essentielles .....	6
1.1. Historique.....	7
1.2. Définition.....	7
1.3. Origine des huiles essentielles.....	7
1.4. Localisation et lieu de synthèse.....	7
1.5. Répartition botanique.....	8
1.6. Rôle dans la plante .....	9
1.7. Propriétés physiques .....	9
1.8. Rôle physiologique.....	9
1.9. Composition chimique.....	10
1.9.1.. Les terpenoïdes.....	10
1.10. Facteurs influençant la composition chimique.....	10
1.11. Mode d'obtention.....	13
1.11.1. Distillation.....	13
1.11.1.1. Hydrodistillation.....	13
1.11.1.2. Distillation par entraînement à la vapeur d'eau.....	14
1.11.1.3. Hydrodiffusion.....	15
1.11.2. Extraction à froid.....	15
1.11.3. Extraction assistée par micro-ondes.....	15
1.11.4. Extraction par les solvants et les graisses.....	16

1.11.5. Extraction par fluides supercritiques.....	16
1.12. Méthodes d'analyse chimique des huiles essentielles.....	17
1.13. Différentes utilisations des huiles essentielles.....	18
1. Emplois et Propriétés pharmacologiques.....	18
2. Domaine d'application des huiles essentielles.....	19
2.1. En pharmacie .....	19
2.2. En parfumerie .....	20
2.3. Dans les industries agro-alimentaires.....	20
3. Application des H.Es dans les produits alimentaires.....	20
1.15. La toxicité des huiles essentielles.....	21
1.16. Facteurs de variabilité.....	21

### **CHAPITRE III. Généralités sur les activités des huiles essentielles**

I. Activités biologiques des huiles essentielles.....	22
1. Activité antioxydante.....	22
1.1. Définition d'un antioxydant.....	22
1.2. Essais de l'activité antioxydante dans les aliments.....	22
1.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	23
2. Activité antimicrobienne.....	24
2.1. Définition d'un antimicrobien.....	24
2.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	24
2.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	25
2.2.1.1. Méthode de l'aromatogramme.....	25
2.2.1.2. Méthode de dilution.....	25
3. Rappels sur les bactéries.....	25
3.1. Les bactéries.....	25
3.2. Généralités sur les souches bactériennes testées.....	26
3.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26

3.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
3.2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	27

## **CHAPITRE IV. Matériels et méthodes**

1. Situation géographique de la zone de culture.....	28
2. Matériel expérimental .....	28
2.1. Matériel végétal.....	28
2.2. Mode opératoire et appareillage.....	29
2.2.1. Matériel technique.....	29
3. Préparation de l'extrait éthanolique (extrait brut).....	30
4. Screening phytochimique de l'ail ( <i>Allium sativum</i> L.).....	30
4.1. Réaction de caractérisation en tube.....	30
4.1.1. Mise en évidence des tanins.....	30
4.1.2. Mise en évidence des saponosides.....	30
4.1.3. Mise en évidence des flavonoïdes.....	31
4.1.4. Mise en évidence des composés réducteurs.....	31
4.1.5. Mise en évidence des alcaloïdes.....	31
5. L'extraction des huiles essentielles par l'entraînement à la vapeur.....	32
6. Etude des huiles essentielles .....	33
7. Caractères organoleptiques.....	34
7.1. Calcul du rendement.....	34
7.2. Mesure de la densité.....	35
8. Caractéristiques des H.Es.....	35
9. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	35
9.1. Souches bactériennes et milieux de culture.....	35
9.2. Tests de l'activité antibactérienne.....	36
9.2.1. Essais préliminaires.....	36
9.2.2. L'Aromatogramme ou Méthode des Disques.....	37

9.2.2.1. Préparation des disques d'aromatogramme.....	38
9.2.2.2. Application des disques.....	39
9.2.3. Incubation et Lecture.....	40
10. Evaluation de l'activité antioxydante.....	40
10.1. Paramètres de calcul de l'activité antioxydante.....	40
11. Analyse statistique des données .....	40
<b>CHAPITRE V. Résultats et discussions.....</b>	<b>41</b>
Conclusion et perspective.....	50
Références bibliographique.....	51



## Liste des figures

<b>Figure1</b> : l'ail avec la spathe membraneuse spécifique, terminée en pointe.....	3
<b>Figure 2</b> :Voies responsables de la synthèse de terpènes et phenylpropenes, les principaux métabolites présents dans les huiles essentielles des plantes.....	6
<b>Figure 3</b> : Glande simple entièrement chargée d'huile essentielle.....	8
<b>Figure 4</b> : Poiles épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan.....	8
<b>Figure 5</b> : Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles.....	10
<b>Figure 6</b> : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation.....	14
<b>Figure 7</b> : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur.....	15
<b>Figure 8</b> : Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO2 supercritique.....	17
<b>Figure 9</b> : Chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme.....	18
<b>Figure 10</b> .Réaction du DPPH*avec un antioxydant.....	23
<b>Figure. 11.</b> Paroi des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.....	26
<b>Figure 12</b> : Aspect microscopique de <i>P.aeruginosa</i> après coloration de Gram.....	27
<b>Figure 13</b> : localisation géographique de station expérimentale ITCMI .OEB .....	28
<b>Figure 14</b> .Montage d'extraction.....	33
<b>Figure15</b> .: Ensemencement par écouvillon.....	38
<b>Figure.16</b> : Schéma représentant les différentes étapes de la réalisation d'un Aromatogramme.....	39
<b>Figure 17</b> : Matériel utilisé pour l'ensemencement par écouvillonnage pince, écouvillon, disques stériles,milieu de culture en boîtes de pétri.....	40
<b>Figure18</b> : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de l' <i>Allium sativum</i> L.....	45
<b>Figure 19</b> : résultats de l'activité des extraits d' <i>Allium sativum</i> L. vis avis de <i>pseudomonasaeruginosa</i> .....	49
<b>Figure 20</b> : résultats de l'activité des extraits d' <i>Allium sativum</i> L. vis avis de <i>E.coli</i> .....	49
<b>Figure 21</b> : résultats de l'activité des extraits d' <i>Allium sativum</i> L. vis avis de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	49

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Allium sativum</i> L .....	11
<b>Tableau 2</b> . Caractères organoleptiques d' <i>Allium sativum</i> L .....	34
<b>Tableau 3</b> : les souches utilisées .....	36
<b>Tableau 4</b> : résultats du screening phytochimique de l'extrait brut d' <i>Allium sativum</i> L .....	42
<b>Tableau 5</b> : les métabolites détectées .....	43
<b>Tableau 6</b> : l'analyse de variance du diamètre de la zone d'inhibition (cm) .....	46
<b>Tableau 7</b> : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits de l' <i>Allium sativum</i> .....	47

# INTRODUCTION GENERALE

---

## INTRODUCTION GENERALE

Le monde des végétaux est plein de ressources et de vertus d'où l'homme puise non seulement sa nourriture mais aussi des substances actives qui procurent souvent un bienfait à son organisme parfois affecté de troubles insidieux [1].

La connaissance par l'homme de l'utilisation des plantes, qu'il s'agisse de plantes alimentaires, médicinales ou toxiques, est très ancienne [2]. Alors que se soigner par les plantes est un instinct, qui se retrouve d'ailleurs dans le comportement des animaux. Cette pratique a engendré d'innombrables croyances sur ce qui sauve la vie et sur les forces qui lui sont néfastes.

L'Ail *Allium sativum* L. est une plante légumineuse très riche en huiles essentielles à origine sauvage dont la production mondiale est largement réponde à travers le monde. A cause de ces propriétés alimentaires, aromatiques et médicinales [5], l'ail occupe la deuxième place parmi les espèces les plus cultivées du genre *Allium* après l'oignon. Il a des propriétés antiseptique, bactéricides, cholagogues, hypotenseur et antidiabétique ainsi il exerce également une action préventive anticancéreuse et conseillé pour lutter contre les troubles digestifs... [6] car l'allicine est responsable du pouvoir antimicrobien de l'ail principalement sur les entérobactéries, les streptocoques et staphylocoques [7]

Le regain d'intérêt aux plantes médicinales et leurs extraits telles les huiles essentielles, vient essentiellement d'une prise de conscience des malades et de leur désir profond de revenir aux moyens naturels et efficaces [3]. Car les plantes offrent un espoir de guérison dans le domaine des maladies contemporaines, et le besoin d'information sur les nouveaux produits phytothérapeutiques s'accroît [4]. Le malade tend de plus en plus à fuir les substances chimiques et à éviter les dangers qu'elles peuvent induire [5].

Les indications données par la phytothérapie ou l'aromathérapie, n'ont pas pour but de faire oublier ou sous-estimer l'importance de toute la profession médicale et de la médecine, à condition que celle-ci soit avant tout humaine et respecte fidèlement le serment d'Hippocrate:

*"primum non nocere": "d'abord, ne pas nuire".*

La recherche de nouveaux médicaments utilise plusieurs approches parmi lesquelles l'approche "*Ethnopharmacologique*", qui consiste à recueillir des renseignements concernant l'utilisation empirique auprès des populations, d'ethnies vivant encore près de la nature [2]. Et

## INTRODUCTION GENERALE

---

comme Hippocrate a dit un jour " *Il ne faut pas rougir d'emprunter au peuple ce qui peut être utile à l'art de guérir* ". *L'Ethnopharmacologie* ou *l'Anthropologie Médicale* visent à faire connaître l'emploi traditionnel des plantes médicinales, et valoriser rationnellement cet usage dans le cadre d'études scientifiques.

Le présent travail est consacré comme contribution à l'estimation du rendement des huiles essentielles et à l'étude du pouvoir antibactérien et antioxydants des extraits de l'ail *Allium Sativum* L. var. Rouge Locale, une plante alimentaire et médicinale utilisée depuis la nuit des temps pour traiter divers affections.

Dans le cadre de la valorisation rationnelle des plantes médicinales à usages traditionnel, notre mémoire est constitué de deux parties :

La première partie est consacrée à l'étude bibliographique et botanique de la plante *Allium sativum* L., les huiles essentielles, les activités biologiques des huiles essentielles et à la fin de cette partie un aperçu général sur les souches bactériennes testées ou utilisées pour la mise en évidence du pouvoir antibactérien des huiles extraites.

La deuxième partie : la partie expérimentale, expose la situation géographique de la zone de culture et de récolte de l'ail au niveau de l'ITCMI, puis et avant de présenter les résultats obtenus, on a décrit le matériel et la méthodologie suivie dans cette étude, ensuite on a discuté les résultats obtenus.

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE I. Généralité sur *Allium sativum* L.

---

### ***1. Description botanique***

Plante vivace herbacée, de 20 à 40 cm de haut (peut atteindre 1m [8], l'ail se compose d'un bulbe à nombreux caïeux (gousses) souterrains, rassemblés dans une même enveloppe. De feuilles planes linéaires (0.5 à 1.5 cm de largeur) partant du bulbe [9], et à gaines embarrassantes.

D'une tige sortant du bulbe et se terminant en ombelle globuleuse [10], elle peut atteindre 1.2 m de haut [9]. Avec des fleurs blanches ou rougeâtres entourées – avant la floraison [11] Parmi les "*Alliums*", l'ail possède la plus puissante et pénétrable odeur [12], les Grecs l'appelaient "*rose puante*" [13]. Le nom commun "ail" et le nom botanique "*Allium*", viennent du mot celtique "*All*" qui signifie "*qui brûle*" [14].

L'ail est originaire d'Asie centrale [11] et cultivé partout dans le monde [9]. La partie utilisée est le bulbe frais ou déshydraté, l'huile essentielle ainsi que son jus frais.

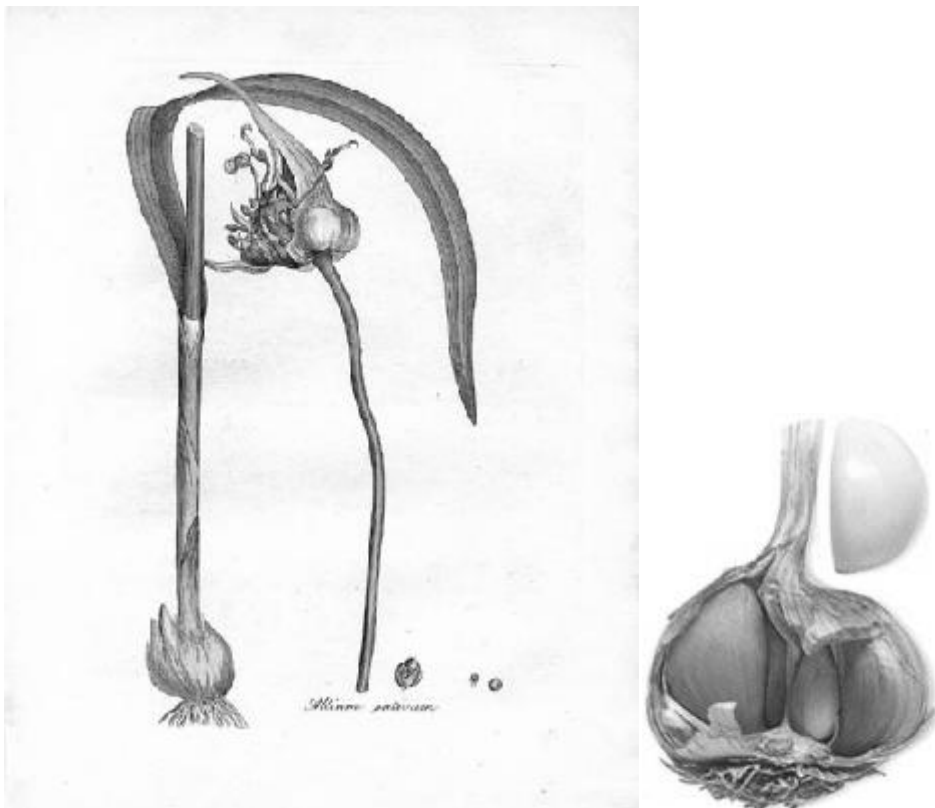


Figure1 : l'ail avec la spathe membraneuse spécifique, terminée en pointe.

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE I. Généralité sur *Allium sativum* L.

---

### 1.1 Classification botanique

L'ail (*Allium sativum* L.) est une plante bisannuelle, Elle appartient à la famille botanique des Alliacées. La partie consommée est le bulbe constitué de caïeux [15].

**Règne :** Plantae

**Sous Règne :** Tracheobionta

**Division :** Magnoliophyta

**La classe :** liliopsida

**Sous classe :** Liliidae

**Super ordre :** liliiana

**Ordre :** Liliales

**Famille :** Alliacées

**Sous Famille :** Allioideae

**Tribu :** Allieae

**Genre :** Allium

**Espèce :** *Allium sativum* L. Var. Rouge locale

Le nombre de chromosomes chez l'ail (*Allium sativum*L.) est de :  $2n=16$  [16].

### 2. Propriétés pharmacologiques et emplois

C'est une des plantes les plus étudiées et utilisées hier et aujourd'hui. Il possède des applications traditionnelles alimentaires et médicinales [17]. Durant plusieurs siècles l'ail était un principal régime alimentaire, un condiment mais aussi un médicament, et dans plusieurs cultures contre le mauvais œil [18 ].

Du fait que l'ail est riche en fructosanes jusqu'à 75% du poids sec, il est diurétique. C'est un hypotenseur dont l'effet est connu depuis longtemps chez l'homme, et a été confirmé chez l'animal. Egalement un anti athéromateux capable de faire diminuer triglycérides et

## Synthèse bibliographique

### CHAPITRE I. Généralité sur *Allium sativum* L.

---

cholestérol sanguins et d'augmenter le taux des HDL [11]. Une alimentation suffisamment riche en ail diminue l'agrégation plaquettaire et augmente l'activité fibrinolytique, d'où l'intérêt de la plante dans la prévention des thromboses [11 ,19 ].

C'est aussi un expectorant, larvicide, insecticide[ 9 ], hypoglycémiant [11 ], antiviral [20], et prévient de certains cancers [11], dont plusieurs études sur le cancer de l'estomac [21, 22, 23].

Ses propriétés antiseptiques ont été mises à profit depuis des siècles contre des maladies telles que la peste ou le choléra [24, 25 ,26]. Louis Pasteur, était le premier à avoir constaté que l'ail tue les bactéries. Durant la Première Guerre Mondiale, l'armée Britannique utilisait l'ail pour contrôler les infections. Les docteurs Russes traitaient leurs malades avec de l'ail à défaut de Pénicilline [18]. Ces activités antibactériennes et même antifongiques de l'ail ont été mis en évidence *in vitro* [27, 28,29, 30,31,32,33].

L'huile essentielle possède les mêmes usages et propriétés que l'ail frais ou ses extraits [9, 34 ]. Des études récentes montrent l'activité antimicrobienne de l'huile macérée de l'ail contre, des bactéries à gram positif et à gram négatif, des levures et même peut inhiber la croissance de la bactérie *Helicobacter pylori* responsable du cancer de l'estomac [23 , 35 , 36 ].

Les composés soufrés volatils spécialement: allicine, diallyl disulfure, diallyl trisulfure, ajoènes, vinylthiines, sont généralement considérés responsables de la plupart des activités pharmacologiques [37,38,39].

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

### 1. Les huiles essentielles

#### 1.1. Historique

L'huile essentielle est très ancienne et assez universelle, son utilisation date de plus de 7000 ans (on trouve les premières traces chez les aborigènes d'Australie avec fumigation) preuve en est un alambic en terre cuite retrouvé au Pakistan datant de cette époque. On retrouve des inscriptions datant de 4000 ans en Mésopotamie et des écrits Egyptiens datant de 3500 ans. Les Egyptiens obtenaient les huiles essentielles en pressant les plantes [41].

#### 1.2 Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent de façon quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpènes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phenylpropane d'autre part. Les composés de la dégradation d'acide gras et les composés de la dégradation des terpènes sont aussi fréquemment retrouvés dans les huiles essentielles [42, 43, 44,45].

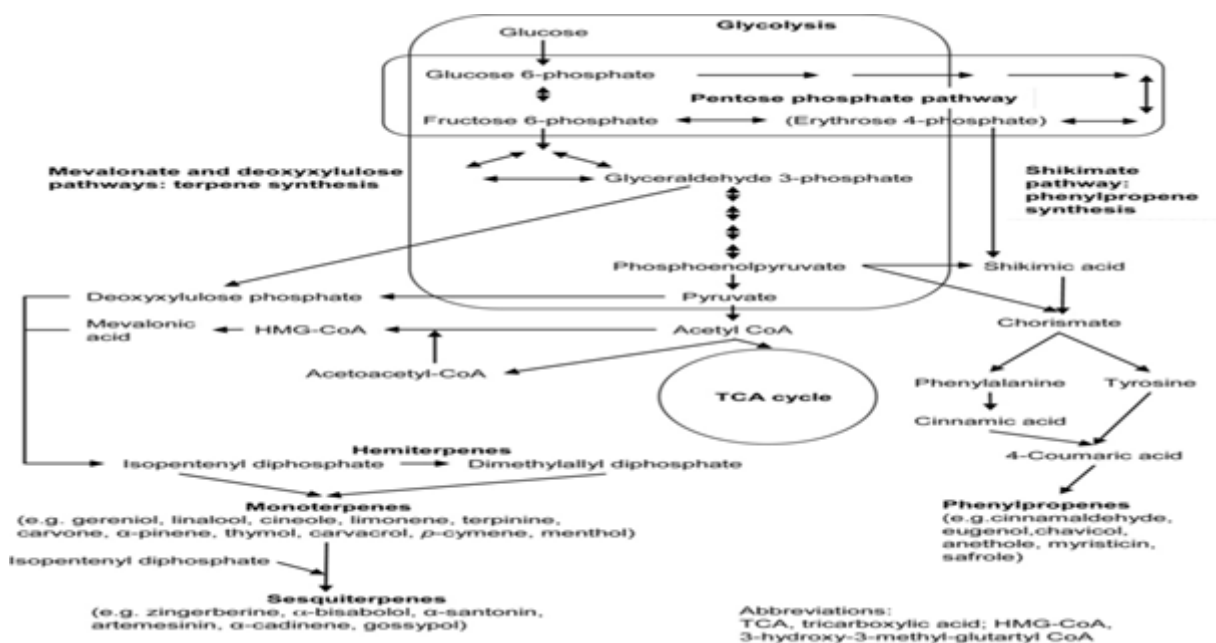


Figure 2: Voies responsables de la synthèse de terpènes et phenylpropènes, les principaux métabolites présents dans les huiles essentielles des plantes [40].



# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

### 1.3. Origine des huiles essentielles

Les plantes vertes puisent l'eau et utilisent l'énergie solaire et le gaz carbonique présent dans l'air pour synthétiser les glucides, ce processus est appelé photosynthèse, il se déroule au niveau des feuilles, plus précisément au niveau des chloroplastes qui renferment la chlorophylle, les produits issus de la photosynthèse sont (glucides, NADPH, ATP) constituent une source d'énergies, ils contribuent à la génération de nouvelles cellules, ils interviennent indirectement dans la biosynthèse de divers composés secondaires tels que les lipides, les hétérosides et les essences. Ainsi les huiles essentielles font parties des résidus du métabolisme végétal [46].

### 1.4. Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs dont tous les organes végétaux des plantes aromatiques peuvent les contenir :

- les fleurs : l'oranger, le rose et la lavande
- les feuilles très souvent: l'eucalyptus, la menthe et le thym
- les organes souterrains: les racines (vétiver) et les rhizomes (gingembre, acore)
- les fruits: le fenouil, l'anis et l'épicarpe des citrus
- les graines: la noix de muscade
- le bois et les écorces: la cannelle, le santal et le bois de rose [47].

La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées a la présence des structures histologiques spécialisée s'appelées : les glandes des huiles essentielles qui sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante [48].

**Les figures 3 et 4** représentent des glandes sécrétrices des huiles essentielles.

Il existe trois types de structure sécrétrice dans la plante:

- les poils sécréteurs des Lamiaceae
- les poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

- et les canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Astéraceae [7,47].

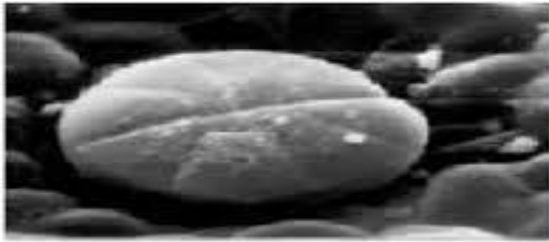


Figure 3: Glande simple entièrement chargée d'huile essentielle [48].



Figure 4: Poiles épidermiques sur le calice d'une fleur d'un origan [49].

### 1.5. Répartition botanique

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs; il y aurait selon LAWRENCE, 17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont répartis dans un nombre limité de familles. Exp: *Myrtacées, Lauracées, Rutacées, Lamiacées, Astéracées, Apiacées,*

*Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées,* les huiles essentielles peuvent avoir une origine animale annonce Frant et Damelio et donnent l'exemple de celle rencontrée dans le foie de poisson [50].

### 1.6. Rôle dans la plante

La fonction biologique des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure, il est toutefois vraisemblablement qu'ils ont un rôle écologique. A l'appui de cette hypothèse, on remarquera que le rôle de certains d'entre eux a été établi expérimentalement en ce qui concerne le domaine des interactions végétales (agents allélopathiques, notamment inhibiteurs de germination); ces substances olfactives issues du métabolisme secondaire sur certains végétaux renferment beaucoup de rôles, certains sont recensés d'autres pas encore, parmi ces rôles recensés: il y a celui de l'opposition plante-plante qu'on peut considérer comme une guerre chimique, on prend le cas de *Salvia leucophylla* qui libère dans l'atmosphère le cinéole et le camphre qui est absorbé par le sol sec ceci inhibe la germination des espèces prairiales ; celles-ci ne peuvent germiner et croître que lors des pluies hivernales [51]

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

Sur le plan du métabolisme, certains terpènes linéaires ont une fonction énergétique : mis en réserve pendant le jour, ils sont dégradés pendant la nuit en acétyl-CoA. Par ailleurs, les huiles essentielles participent à l'adaptation des plantes xérophiiles à leur milieu, par la conservation de l'humidité indispensable à leur vie, cela grâce aux vapeurs aromatiques qui tendent à saturer l'air autour de la plante empêchant ; le jour, la température de l'air de monter jusqu'à un degré insupportable pour la vie végétale et la nuit de baisser de façon excessive [52].

### 1.7. Propriétés physiques

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévie la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles [53].

### 1.8. Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les H.Es en tant que métabolites secondaires. Leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante reste encore mal connu. Les H.Es peuvent avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines, par protection contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables [54].

### 1.9. Composition chimique

Sur le plan chimique, les H.Es sont des mélanges de structure extrêmement complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes (myrcène,  $\beta$ -pinène,  $\gamma$ -terpinène) et les sesquiterpènes ( $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -humulène,  $\beta$ -bisabolène etc.) [55].

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

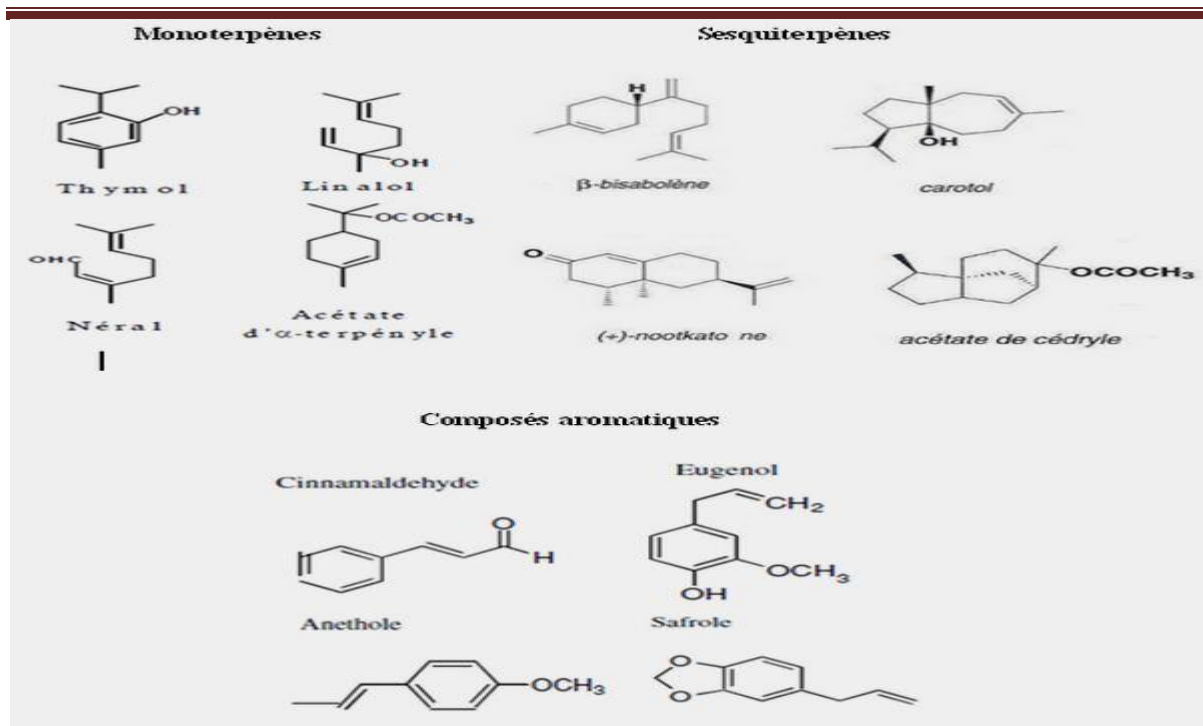


Figure 5: Structure de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles [7]

### 1.9.1. Les terpénoïdes

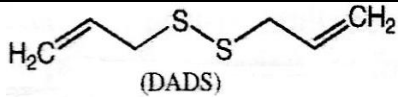
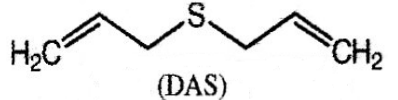

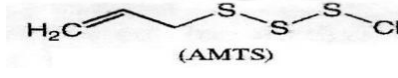
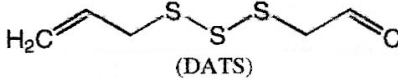
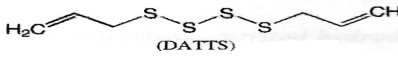
L'immense famille de composés naturels connus sous le nom de "*terpènes*", qui ont été découverts dans les huiles essentielles, se sont avérés être la source du parfum de nombre d'entre elles. La caractéristique chimique commune aux terpènes réside dans leurs structures: ce sont des multiples d'une unité à cinq atomes de carbone ayant pour base un diène conjugué dont le nom commun est "*isoprène*" (2-méthylbuta-1,3-diène). Les terpènes sont ainsi parfois désignés sous le nom de "*composés isoprénoïdes*" [37], mais de préférence "*terpénoïdes*" pour tous les composés constitués d'unités d'isoprène, sans prendre en considération les groupes fonctionnels présents [38].

Les monoterpènes et leurs dérivés (alcools, esters, acétates, ...) sont les composés les plus abondants dans les huiles essentielles, et sont responsables des saveurs caractéristiques et de l'arôme que possède la plante [39,37]. Leur étude chimique est compliquée, par la difficulté d'obtenir ces produits purs du mélange complexe dans lequel ils sont présents et les réarrangements qu'ils peuvent subir [37]. Exemple de quelques monoterpènes: menthol, alpha terpinéol, linalol, lavandulol, géranolol...

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Allium sativum* [56]

Composés chimiques	Temps de rétention (mn)	Structures
1- Diallyl disulfide	3.823	 (DADS)
2- Diallyl sulfide	4.024	 (DAS)
3- Allyl méthyl disulfide	4.588	 (AMDS)
4- Allyl méthyl trisulfide	6.868	 (AMTS)
5- Diallyl trisulfide	10.605	 (DATS)
6- Diallyl tétrasulfide	22.120	 (DATTS)
7- NI	22.200	
8- NI	23.056	

### 1.10. Facteurs influençant la composition chimique

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'H.E : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la méthode utilisée pour l'extraction ; sont d'autant de facteurs susceptibles d'exercer les modifications chimiques.

Outre la composition, ces facteurs peuvent également avoir un impact sur la teneur en H.E, par exemple : les *citrus* ont une teneur importante en H.E lorsque la température est élevée.

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

Les fleurs de *Chrysanthemum caronarum* sont riches en H.E sous l'effet de fertilisants [7].

### **1.11. Mode d'obtention**

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales.

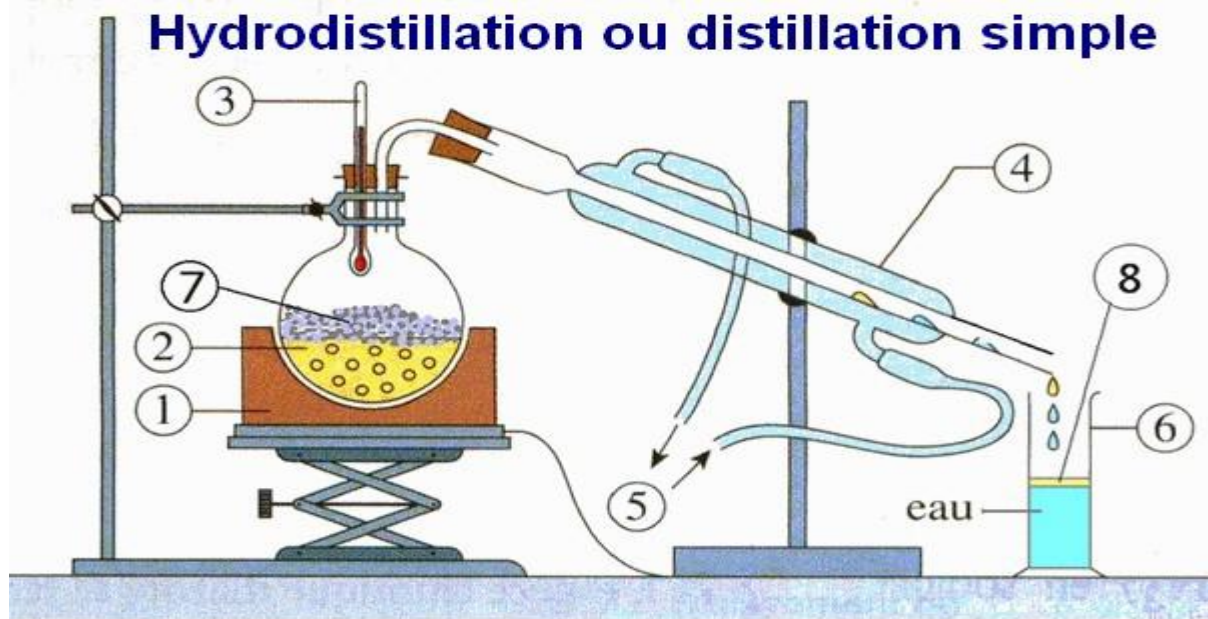
En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les H.Es, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

#### **1.11.1. Distillation**

Il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau [66].

##### **1.11.1.1. Hydrodistillation**

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'H.E se sépare de l'hydrolysate par simple différence de densité. L'H.E étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysate (figure 6). Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques [67].



- 1- Chauffe ballon    5 - Entrée et sortie d'eau  
2- Ballon            6 - Erlenmeyer  
3- Thermomètre    7 - Matière à extraire l'essence  
4- Réfrigérant      8 - La couche d'H.E

Figure 6: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation [67].

#### 1.12.1.2. Distillation par entrainement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau.

Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (figure7:).

La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'H.E en minimisant les altérations hydrolytiques [67].

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles



Figure 7 : Schéma du principe de la technique de l'entraînement à vapeur [67].

### 1.12.1.3. Hydrodiffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc, moins dommageable pour les composés volatils [67].

### 1.12.2. Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique [68].

### 1.12.3. Extraction assistée par micro-ondes

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé [69].



# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

### **1.12.4. Extraction par les solvants et les graisses**

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.), mais aussi de graisses, des huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu », et sa composition se rapproche de celle d'une H.E.

L'extraction à l'aide de solvants organiques pose de problème de toxicité et de solvants Résiduels [70].

### **1.12.5. Extraction par fluides supercritiques**

Extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction (figure: 8).

En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y'est réduit.

Toutefois, cette technique d'extraction présente un inconvénient la basse polarité du dioxyde de carbone supercritique qui le solvant d'extraction le plus employé. Au-delà du point critique ( $P= 73,8$  bars,  $T^{\circ}= 31,1^{\circ}C$ ), le  $CO_2$  possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction [66].

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

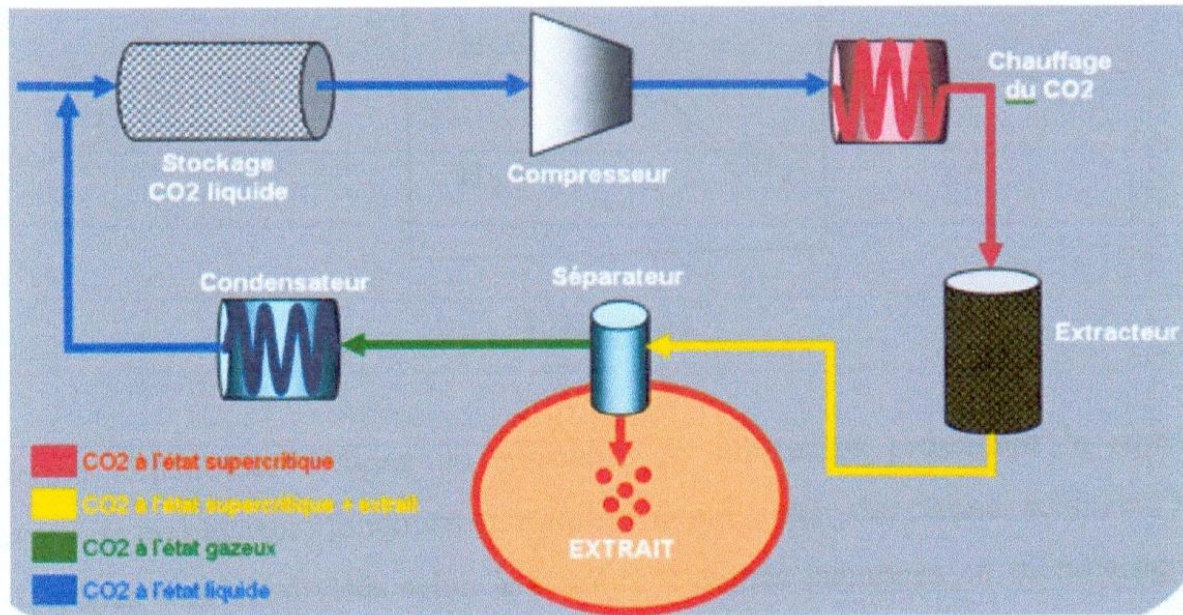


Figure 8: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique [71].

### 1.12. Méthodes d'analyse chimique des huiles essentielles

Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants [72] par :

- Chromatographie en phase gazeuse monodimensionnelle [72].
- Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG/O) [73].
- Chromatographie en phase gazeuse à deux dimensions [73].
- Chromatographie à deux dimensions heart-cutting CPG/SM [74].

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

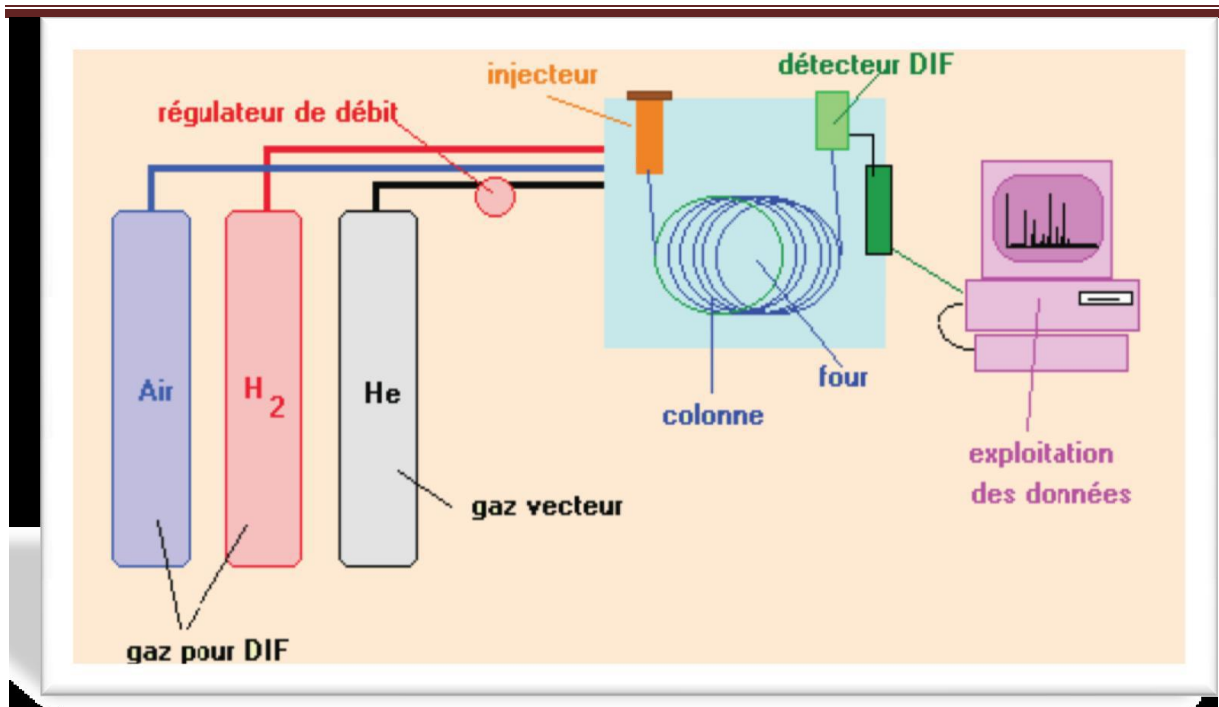


Figure 9: Chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme

### 1.13. Différentes utilisations des huiles essentielles

Outre l'emploi strictement médical des huiles essentielles, celles-ci sont utilisées dans de nombreux domaines tels que la parfumerie, la cosmétologie, l'agroalimentaire et l'industrie chimique. Deux industries se partagent ce marché mondial florissant ; il s'agit de l'industrie agroalimentaire et la parfumerie.

Les huiles essentielles sont utilisées également pour leurs différentes propriétés et effets thérapeutiques divers [57], tels que les effets anti-infectieux.

Parmi ces molécules antibactériennes les plus puissantes, nous pouvons citer: le Cavacol, le Thymol et l'Eugénol, le Géraniol, le Linalool , Térpineol menthol, l'ail ,etc.

Cette activité antivirale se retrouve surtout dans les huiles essentielles contenant des

cétones, des monoterpènes ou certains aldéhydes ; des effets calmants et antispasmodiques; les aldéhydes (citral de la verveine,...), les esters (salicylate de méthyle,...) ; des effets antiparasitaires; surtout les phénols ; des effets anti-inflammatoires; selon le type de douleurs, on peut utiliser les esters, des alcools (menthol) ou des aldéhydes (cuminal).

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

Les huiles essentielles possèdent également des propriétés insecticides et insectifuges : c'est le cas de l'huile essentielle de *Cymbopogonschoenanthus*, un biopesticide efficace contre *collasobruchus maculatus* F., prédateur de niébé [58].

### 1. Emplois et Propriétés pharmacologiques

L'intérêt pour les huiles essentielles s'est accru, et la demande est de plus en plus forte tant pour l'enseignement de l'aromathérapie que pour les traitements [59]. Beaucoup d'entre elles sont utilisées pour assaisonner et aromatiser les aliments [39]. Elles ont aussi une grande importance économique comme saveurs, parfums et solvants [38], il est fabriqué aussi des désodorisants, de l'encens et des produits pour le bain [59]. L'emploi des huiles essentielles est en particulier dans le domaine des antiseptiques externes, mais peuvent être destinées à l'aromatisation des médicaments administrés par voie orale. Elles constituent aussi le support d'une pratique de soins particulière: *l'Aromathérapie*. De même qu'elles sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme conservateurs [60], et dans l'industrie chimique [61].

Sachant que les essences n'ont pas les mêmes composants que les plantes dont elles sont issues, elles ne peuvent donc pas avoir les mêmes actions ni être employées à leur place. Par exemple, la feuille d'*Eucalyptus*, en infusion exerce un effet favorable certains chez les diabétiques, alors que l'essence de cette même plante est absolument sans effet antidiabétique.

Mais cette dernière est plus assainissante de l'atmosphère dans certains cas, que les vapeurs de décoction des feuilles [60].

Cependant plusieurs activités sont attribuées aux huiles essentielles: cholérétique, cicatrisante, neurosédatrice, spasmolytique, digestive, stomachique, antimicrobienne, antiinflammatoire [62], désinfectante du système respiratoire [63,64,65], antioxydante [66], acidifiante, tonocardiaque, oxydante des déchets du métabolisme, fluidifiante du sang, antivenimeuse, antispasmodique, pour la conservation tissulaire (embaumement vivant), pouvoir de protéolyse rapide, sédation épidermique locale, revitalisation par oxygénation et défloculation du sang [61].

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

### **2. Domaine d'application des huiles essentielles**

Actuellement les huiles essentielles trouvent des emplois dans trois secteurs principaux :

#### **2.1. En pharmacie**

Les drogues à huiles essentielles peuvent être utilisées pour leurs actions physiologiques, en particulier pour la préparation d'infusion (menthe, mélisse, verveine, camomille, fleurs d'oranges) et sous la forme galénique simple. Elles sont également utilisées pour l'obtention des huiles essentielles ou pour isolement de quelques constituants (eugénol, anéthol, pinènes) dont certains peuvent avoir un intérêt médicamenteux (en particulier dans le domaine des antiseptiques externes) mais qui, majoritairement, sont surtout destinées à l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à la voie orale ou encore comme adjuvants [75].

Il faut souligner que la majorité des constituants des huiles essentielles sont lipophiles, de ce fait, ils sont rapidement absorbés que ce soit par voie pulmonaire, voie cutanée ou voie digestive. Il convient donc d'être particulièrement vigilant [76].

S'il est évident que la plus grande prudence s'impose lorsque les huiles essentielles sont administrées par voie orale et a fortiori, en mélange, elles ne doivent pas non plus être utilisées inconsidérément par voie externe : l'agressivité de certaines d'entre elles à l'encontre des muqueuses et/ou de la peau doit inciter à ne les utiliser qu'après dilution dans un véhicule approprié. Il est impératif de ne pas laisser ces produits à la portée des enfants et il serait souhaitable qu'ils soient systématiquement délivrés dans des conditions adaptés et toujours correctement étiqueté [75].

#### **2.2. En parfumerie**

C'est le débouché des huiles essentielles, des concrètes absolues et autres résinoïdes fournis par ces drogues. L'industrie des cosmétiques et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût souvent élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier les formulations de grande diffusion des produits synthétiques [76].

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines huiles essentielles constituent des bases de parfums irremplaçables (exemple : Rose et Jasmin). [76].

A la limite de la pharmacie et des produits d'hygiène, on notera la présence des huiles essentielles dans les préparations pour bains (bains calmants, bains relaxant) on notera qu'il y'a là une possibilité d'absorption percutanée des constituants terpéniques [76].

### **2.3. Dans les industries agro-alimentaires**

Si certaines drogues sont utilisées en nature (épices et aromates), d'autres le sont sous forme d'huiles essentielles ou de résinoïdes et d'oléorésine dispersés, en capsule, complexés.

Le développement de nouvelles pratiques culinaires (plats préparés, préparation surgelées industrielles, etc), le goût pour l'exotisme, les qualités gustatives des produits d'une agriculture intensive et d'autres facteurs conduisent à une augmentation rapide de la consommation de ces aromatisants naturels. Tous les segments alimentaires sont consommateurs : boissons, confiseries, produits laitiers, produits carnés, sauces, soupes, snacks, produits de boulangerie, sans oublier la nutrition animale [76].

Depuis le début des années quatre-vingt, la part du naturel dans l'aromatisation des produits alimentaires ne cesse de croître aux dépens des compositions aromatiques de synthèse.

### **3. Application des H.Es dans les produits alimentaires**

Actuellement, les H.Es et leurs composants, représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles sont riches en composés antimicrobiens et antioxydants. Elles pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés « généralement reconnus comme GRAS » ou approuvés comme additifs alimentaires par l'administration Américaine des aliments et des médicaments, FDA (Food Drug Administration). Ils n'ont pas par conséquent pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité sans pour autant être toxique pour l'homme [79].

# Synthèse bibliographique

## CHAPITRE II .Généralités sur les huiles essentielles

---

### **1.15. La toxicité des huiles essentielles**

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres: absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaïsie, aneth, rue, anis, carvi, romarin [61].

D'autres sont à éviter durant la grossesse, ou interdites aux personnes souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques [59].

Cet aspect de la connaissance des huiles essentielles est d'autant plus important que le développement de pratiques telles que l'aromathérapie et autres, conduisent à une utilisation souvent abusive. L'automédication est dangereuse, souvent favorisée par le fait que bon nombre de ces produits sont distribués en dehors du secteur pharmaceutique [60].

### **1.16. Facteurs de variabilité**

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions tels que: l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage et la contamination par des parasites, des virus et des mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles essentielles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique [77,78].

## **1. Activités biologiques des huiles essentielles**

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques.

### **1.1 Activité antioxydante**

#### **1.2 Définition d'un antioxydant**

Le progrès de l'oxydation a comme conséquence la détérioration complète des aliments. La dégradation oxydative des constituants de nature lipidique de nos aliments présente des inconvénients à la fois aux plans organoleptique, nutritionnel, fonctionnel, économique et hygiénique [80,81,82]. La lutte contre l'oxydation des lipides représente donc un enjeu considérable pour les industriels alimentaires. Pour supprimer ou ralentir l'oxydation des lipides, deux voies sont envisageables : tenter de réduire les facteurs favorables à cette oxydation et/ou trouver un réactif qui ralentit l'oxydation : c'est le rôle de l'antioxydant [83]. Ce dernier est défini comme une substance qui, à de faibles concentrations comparées à celles des substrats oxydables, prévient significativement ou retarde l'initiation du processus d'oxydation [83].

#### **Essais de l'activité antioxydante dans les aliments**

Quelques récentes publications ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que quelques antioxydants synthétiques [85]. Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique [84].

Des études de l'équipe du Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit...) où l'application par



## Synthèse bibliographique

### CHAPITRE III. Généralités sur les activités des huiles essentielles

vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [79].

#### Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant (huile essentielle). Selon la bibliographie, les méthodes les plus utilisées sont celles de la réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•), de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, de la chélation des métaux et de blanchiment du  $\beta$ -carotène dans l'acide linoléique.

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•) est un radical organique stable, coloré et centré sur l'azote le maximum de son absorption se situe vers 515 nm dans le méthanol et l'éthanol [87]. Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH•, ce qui conduit au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH-H) et au radical R•.

Le DPPH• a une couleur violette ou rouge pourpre mais cette couleur disparaît lorsqu'il est réduit par un capteur de radicaux (figure :10 ) [86].

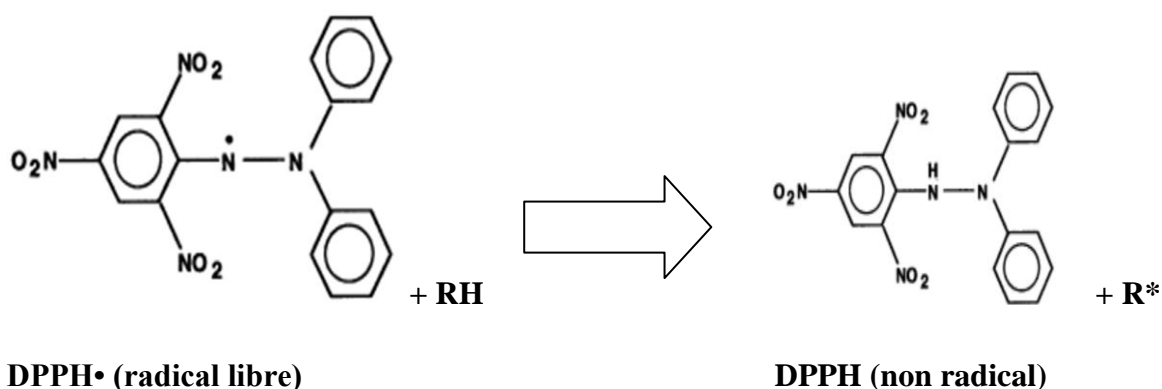


Figure10 .Réaction du DPPH• avec un antioxydant [88;89].

Le rapport DPPH•/antioxydant doit être adapté à la stœchiométrie du composé (nombre de radicaux réduits par molécule d'antioxydant) et le DPPH• doit être en excès. Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser ; il permet de comparer un grand nombre de composés ou un seul composé à plusieurs dilutions.

## Synthèse bibliographique

### CHAPITRE III. Généralités sur les activités des huiles essentielles

---

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH•, pour une concentration en extrait donné et un temps donné. Le test de réduction du DPPH• permet aussi de calculer la CE50 [90]. La valeur CE50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH• [90].

#### **Activité antimicrobienne**

##### **2.2.1 Définition d'un antimicrobien**

L'essor de la chimie a permis l'apparition de nouvelles substances antimicrobiennes. Ces dernières sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens et antifongiques [91]. Ces substances synthétiques ont été employées couramment.

Cependant, en raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs chimiques, la recherche des additifs naturels, particulièrement d'origine végétale, a notamment augmenté ces dernières années. Par conséquent, le développement des produits naturels possédant une activité antibactérienne s'avère nécessaire et utile [92].

Les huiles essentielles sont connues pour posséder l'activité antimicrobienne et certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants [93;94].

#### **Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne**

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles.

Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans des livres [95], des mémoires de Magister et thèses de Doctorat [96 ;97] ainsi que dans différentes publications [98 ;99 ;100]

Ces aperçus édités prouvent qu'il n'y a pas une seule méthode qui est employée par tous les chercheurs pour déterminer quelle est la meilleure méthode pour des analyses *in vitro*.

#### **Evaluation de l'activité antibactérienne**

## Synthèse bibliographique

### CHAPITRE III. Généralités sur les activités des huiles essentielles

---

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe. La majorité de chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon [101]. Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas l'équipement de laboratoire sophistiqué ; cependant, elles ne sont pas sans inconvénients [102].

#### **Méthode de l'aromatogramme**

La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable (10-25mL), déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman (6-8mm), préalablement imprégnés de quantités connues d'HE (5-30 $\mu$ L), sont alors placés en surface de la gélose [102 ;97]. Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition [102].

#### **Méthode de dilution**

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme [99 ;100].

L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de 2 concentrations : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

#### **Rappels sur les bactéries**

##### **Les bactéries**

Une bactérie est un microbe formé d'une seule cellule, visible au microscope, appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal. Comme toute cellule, les bactéries sont constituées d'un noyau, isolé ou diffus, un protoplasme contenant des granulations et des vacuoles, une paroi parfois d'une capsule. [103].

Synthèse bibliographique  
CHAPITRE III. Généralités sur les activités des huiles essentielles

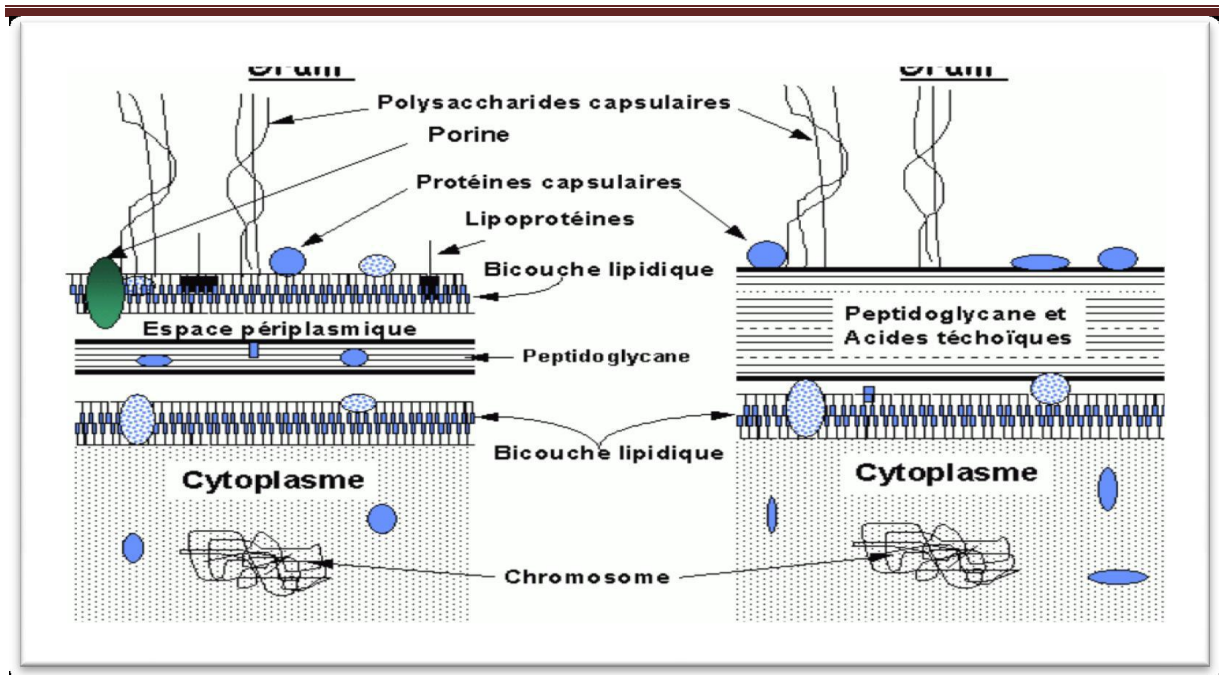


Figure. 11. Paroi des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif [103].

La classification en bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif reflète des différences fondamentales basées sur leurs propriétés de perméabilité aux colorants, liée à la nature de leurs composants de surface. Les différences les plus importantes sont dues à la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif et d'une épaisse membrane de Muréine chez les bactéries à Gram positif. Ces dernières retiennent le violet de gentiane, par contre les bactéries à Gram négatif se décolorent. Ces micro-organismes peuvent encore être divisés en bacilles et cocci[104].

### Généralités sur les souches bactériennes testées

#### *Staphylococcus aureus*

*Staphylocoques* est un genre appartenant au groupe des cocci à Gram-positif, et il pousse en amas [105]. C'est un germe aérobic-anaérobic facultatif [106]. Les *staphylocoques* peuvent provoquer des abcès locaux. Ils font partie des bactéries pathogènes les plus résistantes et sont difficiles à éliminer de l'environnement humain. Ils sont à l'origine de nombreuses infections nosocomiales [104, 105, 106].

## Synthèse bibliographique

### CHAPITRE III. Généralités sur les activités des huiles essentielles

---

#### *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est un germe appartenant au groupe des bacilles à Gram négatif (mobiles, aérobies), il pousse facilement sur les milieux usuels, cette espèce se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ces colonies [105, 106]. Ce germe est considéré comme germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales [106].

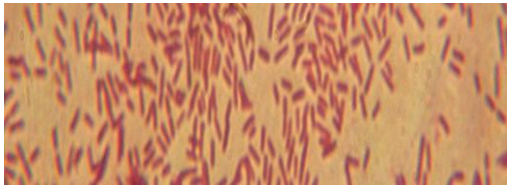


Figure 12 : Aspect microscopique de *P.aeruginosa* après coloration de Gram

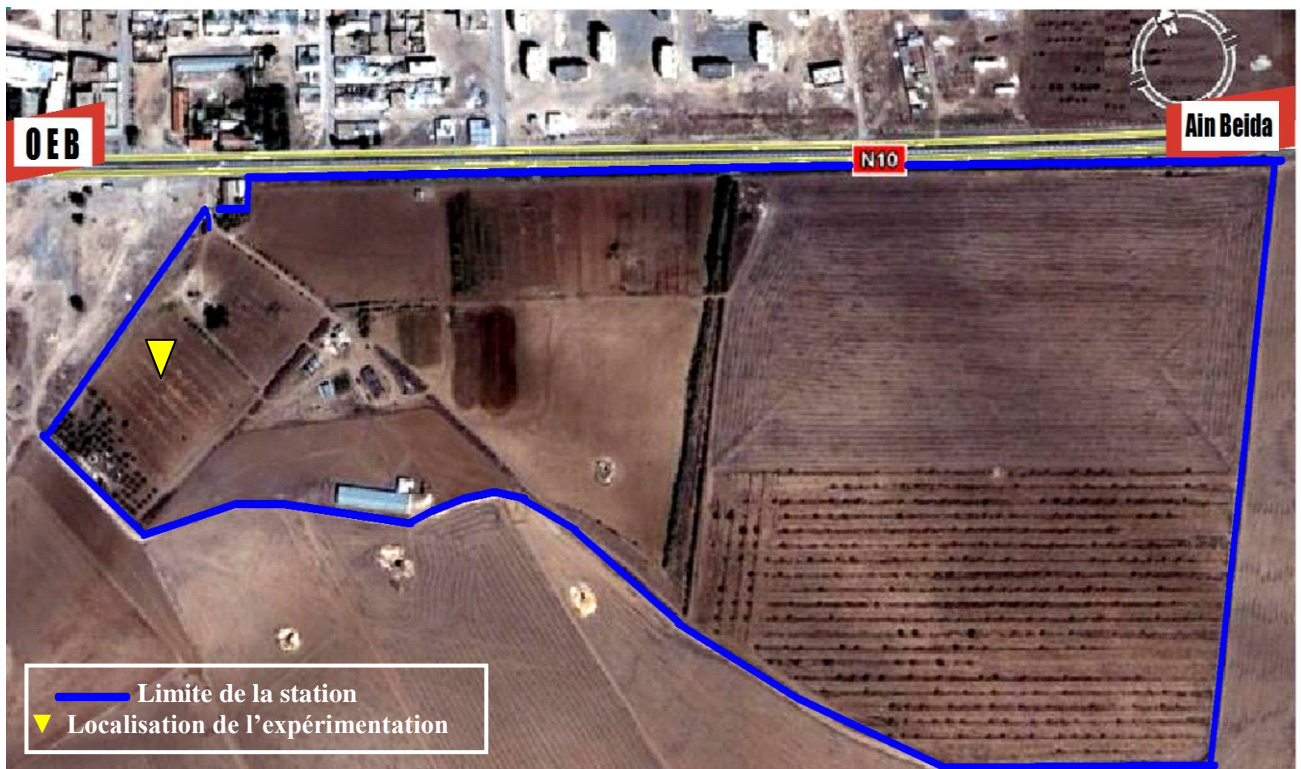
#### *Escherichia coli*

*E. coli* est une bactérie qui fait partie de la famille des Enterobacteriaceae, germe que l'on trouve le plus communément dans les intestins de l'homme et des animaux à sang chaud.

Le plus souvent les souches d'*E. coli* qui colonisent l'appareil gastro-intestinal sont des commensaux inoffensifs. Toutefois à l'intérieur de l'espèce on trouve au moins quatre types de souches pathogènes [106].

## 1. Situation géographique de la zone de culture

La parcelle d'ail retenue pour cette étude se trouve au niveau de la station régionale de l'institut technique des cultures maraîchères et industrielles (ITCMI), localisée à Bir Rogâa à proximité de la route nationale N°10 reliant Oum El Bouaghi et Ain El Beida. Elle est distante de 16Km à l'ouest du chef lieu de la wilaya et de 10 Km à l'est de la ville d'Ain El Beida (figure13).



(Image prise par satellite, 2014)

Figure 13: localisation géographique de station expérimentale ITCMI .OEB

## 2. Matériel expérimental

### 2.1. Matériel végétal

Sous les conditions contrôlées, L'essai a été mis en place en plein champ dans la station de l'ITCMI d'Oum El Bouaghi avec une variété d'ail (*Allium sativum* L.), c'est la Rouge locale. Le matériel végétal utilisé (les bulbes) provient de la récolte de l'année précédente (2013-2014).

Partie expérimentale  
CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

## **2.2. Mode opératoire et appareillage**

### **2.2.1. Matériel technique**

Balance électriques, étuve, rota vapeur, Spectrophotomètre UV-VIS

#### **Verrerie**

Fioles, tube à essais, entonnoirs, pipette pasteur, bécher, Ampoule à décanter 250 ml, ballon ,burette graduée ,boites pétri

#### **Produits chimiques**

\*Ethanol (CH<sub>3</sub>-OH)

\*Chloroforme (CHCl<sub>3</sub>)

\*Acétone

\*Chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub>

\*Hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH10%)

\* acide acétique (AcOH)

\*HCl

\*Hydroxyde de sodium (NaOH).

\*Reactif de mayer

\*Reactif de Wagner

\*acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

\*DPPH

## **3. Préparation de l'extrait éthanolique (extrait brut)**

La matière végétale placée dans un récipient en verre est macérée deux fois dans une solution Eth aqueux (70%) 7:3 pendant deux nuits, après la première et la deuxième filtration sur

## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

papier filtre, le filtrat est évaporé sous vide à sec en utilisant un rotavapeur à la température 45-50°C. Extrait brut sec destiné au screening phytochimique et à l'activité antibactérienne est récupéré par l'éthanol.

#### 4. Screening phytochimique de l'ail (*Allium sativum* L.)

##### 4.1. Réaction de caractérisation en tube

Elle est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur la plantes.

##### 4.1.1. Mise en évidence des tanins

A 2 ml de la solution à tester, ajouter 2 à 3 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> à 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire et un précipité (laisser reposer quelques minutes) [109].

##### 4.1.2. Mise en évidence des saponosides

**Test 1** : 5 ml de la solution à tester sont bien mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides [109].

**Test 2** : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques [110].

##### 4.1.3. Mise en évidence des flavonoïdes

5 ml de l'extrait butanolique sont traités avec quelques gouttes d'AlCl<sub>3</sub> (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune [110].

##### 4.1.4. Mise en évidence des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani. A 1 ml de l'extrait ajouter 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl<sub>3</sub> et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl<sub>3</sub>. La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases,



## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) [110].

Parmi les composés réducteurs on note les coumarines, la mise en évidence de ces dernières se fait selon la méthode décrite par [111]. Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques minutes. Ajouter 0,5 ml de NH<sub>4</sub>OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.

#### 4.1.5. Mise en évidence des alcaloïdes

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. L'extrait sec, ajouter 5 ml d'HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d'I<sub>2</sub> solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels [111].

#### 5. L'extraction des huiles essentielles par l'entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter [67]. Durant le passage de la vapeur d'eau à travers la plante, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action des vapeurs pour former un mélange eau et huile essentielle en deux phases, une phase organique et une phase aqueuse.

L'avantage de cette technique est d'éviter certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant affecter la qualité des huiles essentielles.

Le distillat recueilli subit un relargage par l'ajout de quelques cristaux de chlorure de sodium (le NaCl ayant plus d'affinité à l'eau que l'huile essentielle incite celle-ci à flotter, puisque les huiles essentielles sont moins denses que l'eau).

Le distillat est ensuite transvasé dans une ampoule à décanter où l'huile essentielle est séparée de l'eau par une extraction liquide-liquide au moyen de diéthyléther (de formule brute

## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

), température d'ébullition 50°C, très volatil et très inflammable).

- **Phase organique:** huileuse et très odorante appelée " huile essentielle" contenant la majorité des composés odorants.

- **Phase aqueuse:** odorante appelée " eaux aromatiques" contenant que très peu des composés odorants [17, 94,106].

On agite vivement l'ampoule à décanter en tenant bien le bouchon, il se produit alors une surpression, on ouvre le robinet pour la dégazer (cela en la tenant renverser col bas robinet en haut), on place l'ampoule sur un support (statif + anneau) puis on enlève le bouchon et on laisse décanter après quoi on récupère la phase organique.

A noter que l'extraction des H.Es était réaliser au niveau du laboratoire physico-chimique de Ain m'lila

Partie expérimentale  
CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

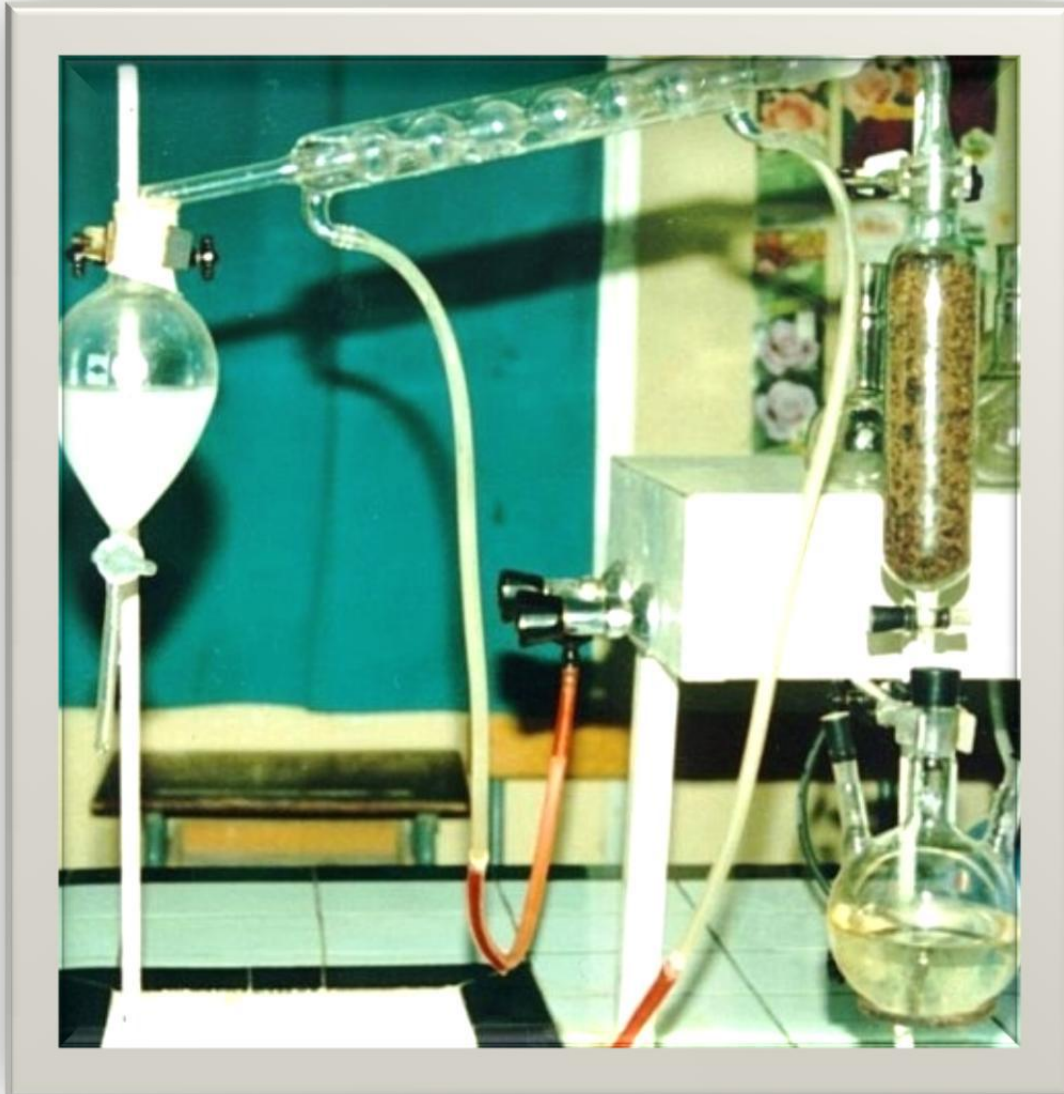


Figure 14. Montage d'extraction

Pour éliminer toute trace d'eau dans la phase organique on lui ajoute du sulfate de magnésium anhydre et on laisse agir pendant 15 min. Après filtration sur papier filtre la phase organique exempte d'eau est constituée de l'huile essentielle plus le solvant, ce dernier est éliminé grâce à une distillation dans un évaporateur rotatif.

L'huile essentielle ainsi récupérée est conservée à basse température, à l'abri de la

## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

lumière dans un flacon en verre, hermétiquement clos pour éviter toute dégradation.

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport de la masse huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale.

#### 6. Etude des huiles essentielles

D'après les normes internationales ; les huiles essentielles doivent subir différents tests pour confirmer leurs qualités.

#### 7. Caractères organoleptiques

Les caractères organoleptiques des huiles essentielles d'*Allium sativum* L. obtenues par hydrodistillation sont présentés dans le tableau ci-dessous

Tableau :2 . Caractères organoleptiques d'*Allium sativum* L

Plante	Caractères organoleptiques		
HE d' <i>Allium sativum</i> L. Var. la Rouge locale	Aspect	Couleur	Odeur
	Liquide limpide	Jaune pale	Dégage une forte odeur d'ail caractéristique

#### 7.1. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport de la quantité d'huile recueillie après hydrodistillation sur la quantité de la plante à traiter exprimé en pourcentage par AFNOR (1986), [32].

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R = PB / PA \times 100$$

R : rendement de l'huile essentielle en %

## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

PB: quantité de l'huile essentielle en g

PA : quantité de la plante en g

#### 7.2. Mesure de la densité

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

### 8. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### 8.1. Souches bactériennes et milieux de culture

Les tests de l'activité antibactérienne ont été réalisés en deux étapes au niveau du

Laboratoire de biologie de l'université de khanchela. Les bactéries utilisées dans ce travail sont: Des souches de référence dans le tableau suivant:

Tableau 3 : les souches utilisées

<b>Microrganismes testés</b>
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> (G-) ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i> (G-) ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+) ATCC 43300
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+) ATCC 25923

Ces bactéries sont conservées et maintenues en vie par des repiquages continus, sur divers milieux de culture solides et liquides, selon les espèces. Pour assurer la survie des bactéries et tester les huiles essentielles, un seul milieu de culture est utilisé Gélose Muller – Hinton, utilisée pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

#### **8.2. Tests de l'activité antibactérienne**

Ces procédés ont été réalisés suivant plusieurs références [112 ; 113 ; 114] , et modifiées si nécessaire selon les moyens existants.

##### **8.2.1. Essais préliminaires**

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'un extrait passe par l'étape des disques, qui est simple et pas coûteuse, et la plus utilisée en routine dans les laboratoires de bactériologie pour les tests de sensibilité aux antibiotiques.

Le but de ces expériences initiales est la recherche du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.

##### **8.2.2. L'Aromatogramme ou Méthode des Disques**

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits aromatiques.

##### **L'inoculum**

- A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland (illustré dans le control de l'inoculum) ou à une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

##### **L'ensemencement**

Le milieu de culture utilisé est Muller – Hinton, qui est le milieu le plus employé pour les

## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

tests de sensibilité aux agents antibactériens.

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (il évite la contamination du manipulateur et de la paillasse).

L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétri à chaque fois, sans oublier de faire Pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la

périphérie de la gélose. Dans le cas de l'ensemencement de plusieurs boîtes de Pétri il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

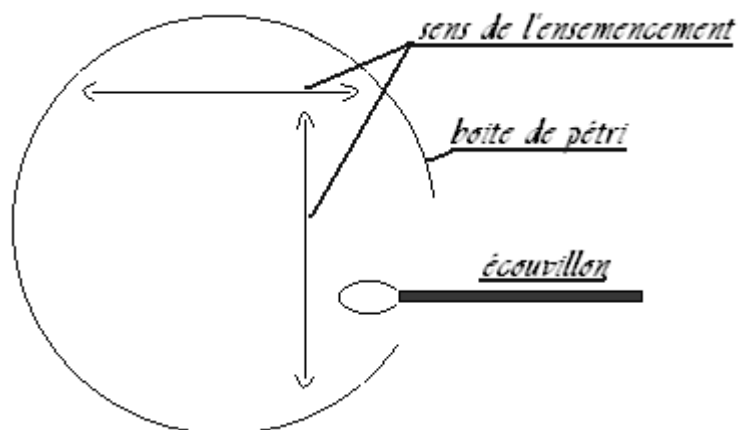


Figure15 .: Ensemencement par écouvillon.

#### 8.2.2.1. Préparation des disques d'aromatogramme

Les disques sont fabriqués à partir de papier Watman n°3 (ou autre type de papier buvard), avec un diamètre de 6mm, suivant le diamètre de l'emporte-pièce.

Ensuite ils sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave.

## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

Entre-temps, les agents antibactériens *Pseudomonas A*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (1 et 2) sont préparés avec les doses suivantes:

\* l'huile essentielle est diluée dans l'éthanol à 1/4 : v/v d'huile dans l'alcool; ces doses sont établies selon les expériences préliminaires.

Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées, les disques imbibés de chaque extrait sont disposés sur la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen.

#### 8.2.2.2. Application des disques : [108]

- Nous avons utiliser une pince stérile pour appliquer les disques à la surfaces des milieux déjà ensemencés à raison d'un seul disque de chaque extrait et du témoin par souche cible et par boîte de pétri . Sans oublier de marquer le compartiment du témoin.

- les boites de pétri sont placées à 4°C pendant 2 heurs puis incubé à 37°C.

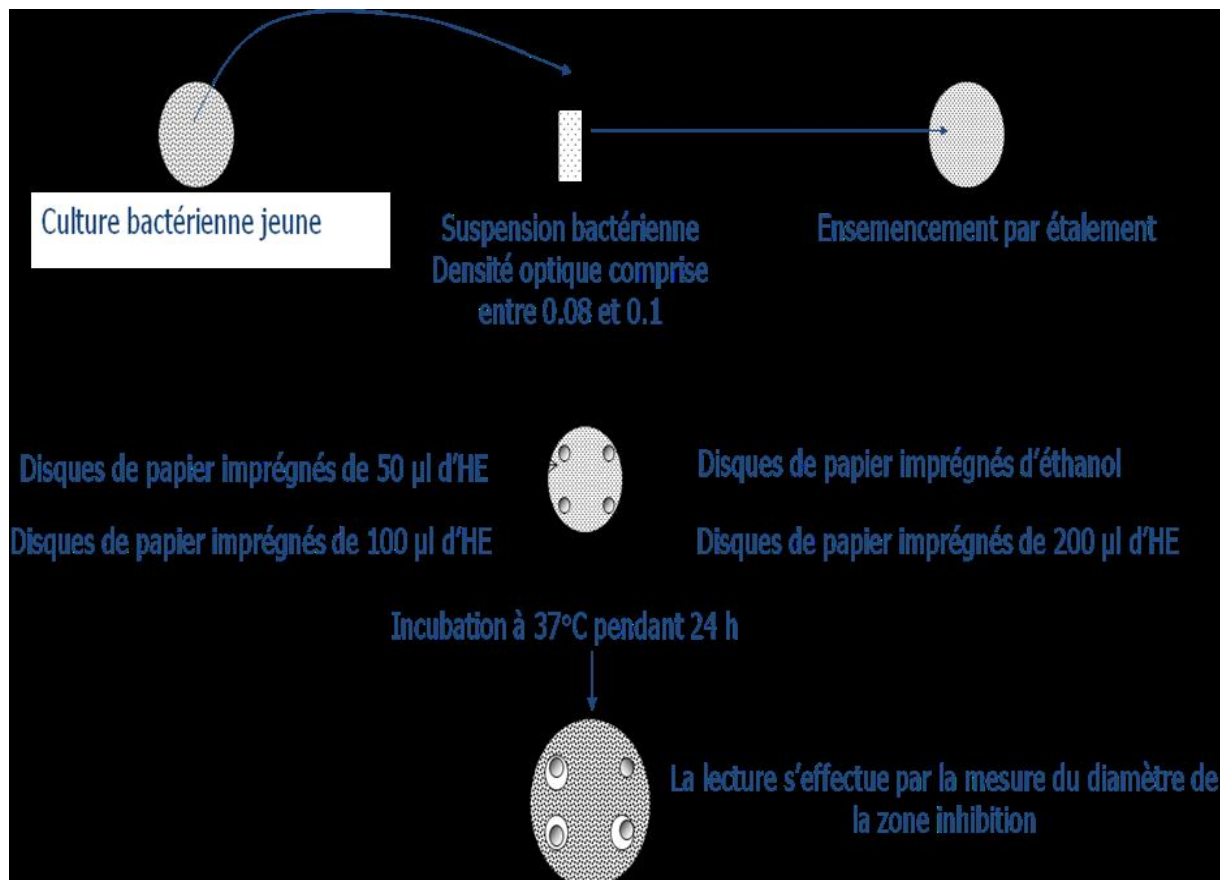


Figure.16: Schéma représentant les différentes étapes de la réalisation d'un Aromatogramme



## Partie expérimentale

### CHAPITRE IV. Matériel et méthodes

---

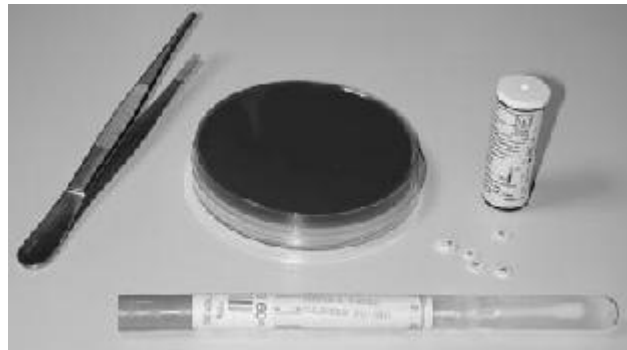


Figure 17: Matériel utilisé pour l'ensemencement par écouvillonnage pince, écouvillon, disques stériles, milieu de culture en boîtes de pétri.

#### 8.2.3. Incubation et Lecture

Après de 18 à 24 heures à 37°C d'incubation, pour toutes les boîtes, les diamètres de la zone claire d'inhibition autour des disques ont été mesurés.

#### 9. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH\*. Le test de DPPH est réalisé selon la méthode décrite par Bruits et Bucar [107] ; où 30µl de chacune des solutions méthanoliques des HE testées à différentes concentrations (200µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml et 1000µg/ml) sont mélangées avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%). Après 30 min, l'absorbance est lue à 517nm.

##### 9.1. Paramètres de calcul de l'activité antioxydante

Pourcentage d'inhibition : Pourcentage d'inhibition du DPPH (I%) est calculé de la manière suivante [107] :  $I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol),

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.  $IC_{50}$  : Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante [107].

**10. Analyse statistique des données**

Les analyses de variance des résultats de l'activité antibactérienne ont été réalisées par le logiciel statistique MINITAB. Les différences considérées hautement significatives à  $p < 0.01$ .



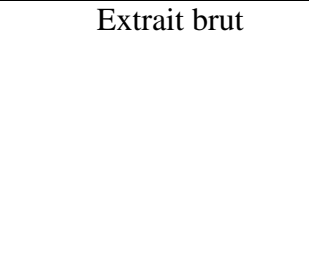
## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

#### 1- Screening phytochimique de l'*Allium sativum* L.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre huile essentielle. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette. Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé (bulbes) sont mentionnés dans le tableau.

Tableau 4 : résultats du screening phytochimique de l'extrait brut de l'*Allium sativum* L.

Recherche	Résultats	
<b>Les tanins</b>	Apparition d'une coloration bleue noir(+)	Extrait brut 
<b>Les saponosides</b>	Formation d'une mousse persistante(+)	Extrait brut 
<b>Les flavonoïdes</b>	Apparition d'une couleur jaune (+)	Extrait brut 

## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

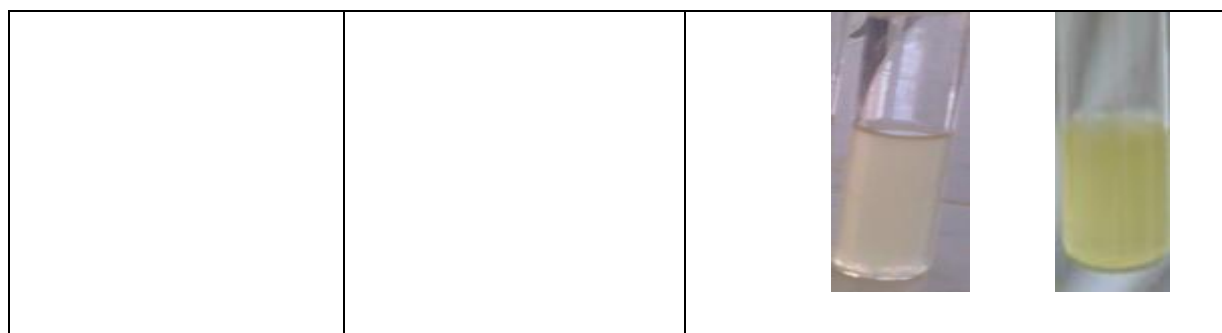


Tableau5 : les métabolites détectés

	<b>Tanin</b>	<b>Saponoside</b>	<b>Tri terpènes</b>	<b>Coumarine</b>	<b>Composés réducteurs</b>	<b>Alcaloïdes</b>
<b><i>Allium sativum</i> L.</b>	+	+	+	+	+	-

+ : test positif

- : test négatif de méthanol

L'existence des tanins dans les extraits est certifiée en présence de la solution de chlorure, par l'apparition d'une coloration bleu noir, pour les tanins galliques ou vert pour les tanins cathéchiques. Ce test révèle la richesse d'*Allium sativum* en tanins galliques.

Les saponosides dont leurs présence est confirmé par l'apparition d'une mousse persistante en, montrent, comme indique le tableau leurs présence dans l'extrait d'*Allium sativum* L.

Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface est présente et indique la présence des triterpènes hétérosidiques.

Le tableau illustre également les taux d'existence des flavonoïdes dans l'extrait brute d'*Allium sativum* L. En effet, ces composés sont présents dans l'extrait étudié mais avec une quantité variée. Cette constatation est témoignée par l'apparition d'une coloration jaune plus ou moins intense dans le milieu réactionnel.

La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique)

## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

---

Tandis que pour les alcaloïdes on remarque une pauvreté extrême et aucune absence de turbidité ou de précipitation indique leurs présences

#### **2-Calcul du rendement**

L'hydrodistillation des bulbes d'*Allium sativum* L. var. la Rouge locale provenant après la culture en plain champ au niveau de la station de l'ITCMI sous les conditions contrôlées, a donnée un rendement en huile essentielle égal à **0.85%**. Ce rendement est assai bien en comparaison d'une part, avec celui obtenu par Benkeblia N [119], qui a travaillé sur la même espèce de la région de Mostaganem dont il a trouvé un rendement qui est de 0.86% et avec celui obtenu par Hacise ferogullari H et al. en 2005 qui est de 0.14% [120], cette équipe a porté également sur la plante d'*Allium sativum* originaire de Turquie et d'autre part, avec d'autre plantes des différents genres beaucoup cités dans la littérature [44] pour leur exploitation industrielle comme source des huiles essentielles comme: anise (1-3%), lavande (0.8- 2.8%), menthe poivrée (0.5-1%), rose (0.1-0.35%). Le rendement obtenu dans ce travail peut être expliqué par l'influence de la région d'origine et la nature de la plante sur la sécrétion de l'huile essentielles ou encore il est du au protocole d'extraction qui a été suivi au cours de notre étude.

#### **3- Mesure de la densité**

La mesure de la densité relative de cette huile essentielle a révélé une densité égale à **1.028**, elle est supérieure à celle de l'eau ce qui a permis à l'huile de se descendre au dessous de l'eau lors de l'extraction. Elle est supérieure à celle de l'eau ce qui explique son déplacement au dessous de l'eau lors de l'extraction par entrainement a la vapeur d'eau, cette valeur de la densité est similaire à celle trouvé par Ross Z.M. et al. en 2001 (1.037) [118].

#### **4-L'activité antioxydante des huiles essentielles**

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des plantes a été réalisée par le piégeage du radical libre DPPH, Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH sont représentés dans la Figure 18.

## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

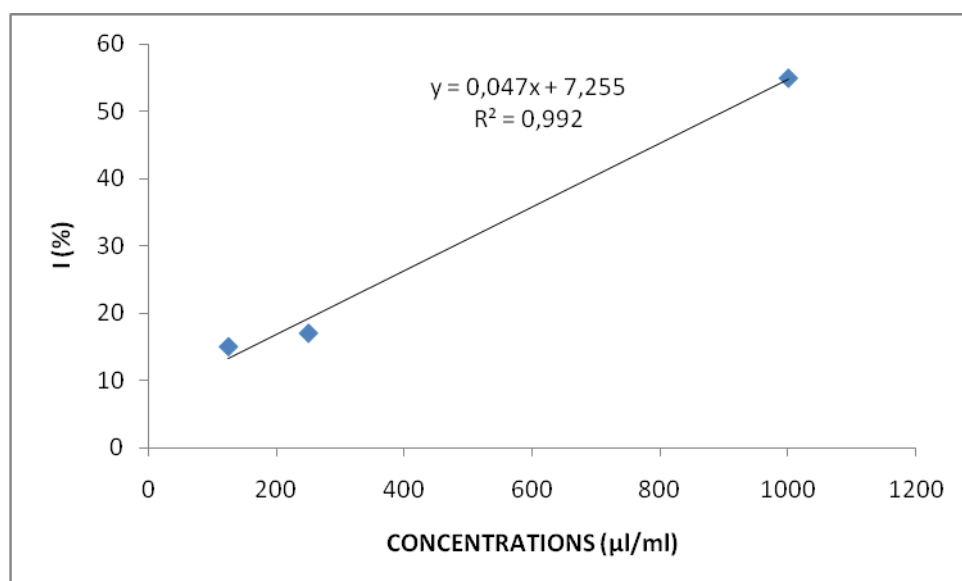


Figure18 : Pourcentage d'inhibition des huiles essentielles de l'*Allium sativum* L.

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle de l'*Allium sativum* L.

Le paramètre : Pourcentage d'Inhibition de calcul de l'activité antioxydante est **IC<sub>50</sub> = 909,46 µl/ml** et la concentration rationnelle **IC<sub>50</sub>% = 9.1 µl/ml**

Ces résultats montrent que l'huile essentielle de *Allium sativum* L. possède une activité antioxydante. Cette activité est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH·, l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène [31].

C'est une activité très efficace comparé a celle de l'acide ascorbique avec un IC<sub>50</sub> de 7.50 µg/ml et celle de l' alphanatocophérol qui ramène la stabilité au DPPH avec un IC<sub>50</sub> de 26 µg/ml [123].

Cette Activité est peut être due à la présence de deux composés majoritaires qui sont :

l'allyl méthyl trisulfide: 34.61% et le diallyldisulfide: 31.65% de l'huile essentielle de l'*Allium sativum* L. A la meilleure reconnaissance des auteurs, le diallyldisulfide constitué souvent le composant dominant de l'huile essentielle d'*Allium sativum* .Ce n'est pas uniquement les

## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

composés majoritaires des HEs qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres [25].

#### 5-L'étude de l'activité antibactérienne

Les résultats de l'analyse de variance de l'activité antibactérienne sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : l'analyse de variance du diamètre de la zone d'inhibition (cm)

source	DDL	SC	CM	F	P
Souches	3	55.56	18.52	7.47	0.001
Extraits	3	1409.56	469.85	189.52	0.000
Interaction	9	126.02	14.00	5.65	0.000
Erreur	32	79.33			
Total	47	1670.48			

L'analyse de variance des résultats de l'activité antibactérienne en fonction des extraits et des souches testées présente une différence significative entre les extraits testés ( extraits brut, l'huile essentielle, test négatif et test positif) avec  $p=0.000$ , et une différence significative entre les souches testées avec *Pseudomonas Aeruginosa* (G-) *Escherichia coli* (G-) *Staphylococcus aureus* (G+). *Staphylococcus aureus* (G+)  $p=0.001$ , ainsi que l'interaction entre les souches et les extraits(  $p=0.000$ ).

Les diamètres des zones d'inhibition des 4 souches sous l'action de la solution mère de l'huile essentielle sont représentés dans le tableau7 .

## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

Tableau 7 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition en (mm) des extraits de l'*Allium sativum* L.

Microorganismes	Diamètre des zones d'inhibition de l' <i>Allium sativum</i> L. (mm)			
	HE	EB	T(+)	T(-)
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> (G-) ATCC 27853	-	-	12.3	-
<i>Escherichia coli</i> (G-) ATCC 25922	10	-	10.6	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+) ATCC 43300	9	-	12.3	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+) ATCC 25923	12	-	13.6	-

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'*Allium sativum* par la méthode de diffusion en disque vis-à-vis les souches suivantes: *Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a révélé une activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les souches testées avec des diamètres d'inhibition varie entre 9 et 12mm par contre l'extrait brut n'a montré aucun effet sur les souches testées donc elles ont présenté une résistance contre cet extrait.

D'après les résultats nous constatons que l'huile essentielle d'*Allium sativum* L. a montré une activité presque similaire à celle de l'antibiotique (12 cm), car la souche *Staphylococcus*



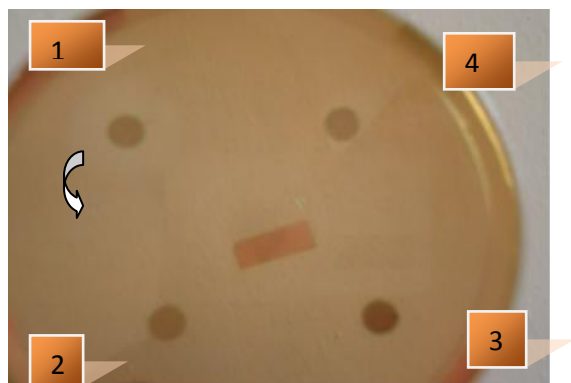
## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

*aureus* ATCC 25923 a présenté les meilleurs résultats de l'activité, donc c'est la souche la plus sensible des souches testées et par contre la souche *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 27853 a montré la meilleure résistance des souches sans aucune zone d'inhibition égale à 0 mm.

D'après ces résultats nous pouvons dire que la zone d'inhibition d'une huile essentielle peut être affectée par sa volatilisation, sa solubilité et par son degré de diffusion dans la gélose. Ceci peut donc expliquer les diamètres importants de la zones d'inhibition révélées dans nos résultats et qui se rapprochent des résultats de l'antibiotique utilisé comme test positif et nous pouvons déduire que la zone d'inhibition d'une huile essentielle dépend de l'espèce bactérienne testée, *Pseudomonas aeruginosa*, est l'espèce la plus connue par sa résistance à la plupart des huiles essentielles .

Bien que la méthode de diffusion soit simple, rapide et applicable à tout type de substance antimicrobienne et tout micro-organisme, elle porte toujours des difficultés notamment dans l'interprétation des résultats des huiles essentielle vu que dans ce cas les zones d'inhibition doivent être affectées par plusieurs facteurs tels que : la mauvaise diffusion des huiles essentielles dans la gélose à cause de leur nature hydrophobe, leur volatilisation et la capacité limité des disque à absorber un volume suffisant de l'extrait à examiner de ce fait.



1 : test+

2 : l'activité des H.E

3 :l'activité de l'E.B

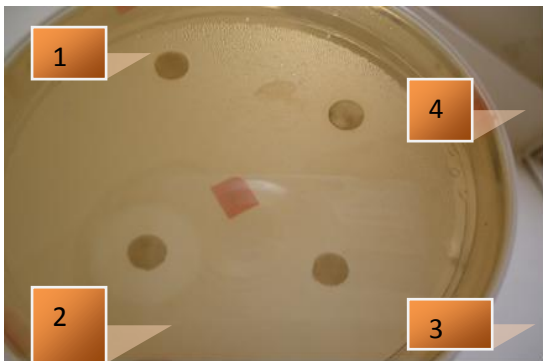
4 : test-

Figure 19 : Résultats de l'activité des extraits d'*Allium sativum* L. vis a vis de *pseudomonas aeruginosa*

## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

---



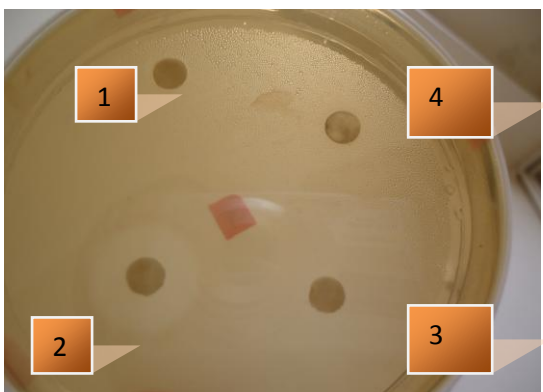
1 : test+

2 : l'activité des H.E

3 : l'activité de l'E.B

4 : test-

Figure 20: Résultats de l'activité des extraits d'*Allium sativum* L. vis a vis de la souche *E.coli*



1 : test+

2 : l'activité des H.E

3 : l'activité de l'E.B

4 : test-

Figure 20: Résultats de l'activité des extraits d'*Allium sativum* L. vis a vis de la souche *Staphylococcus aureus*

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle peut être attribuée principalement à son constituant majoritaire, par exemple les alcools terpéniques qui sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes car ils sont solubles dans les milieux aqueux et ils provoquent d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes [115].les alcools possèdent une activité bactéricide plutôt que bactériostatique [116].

## Partie expérimentale

### CHAPITRE V . Résultats et discussion

---

Au cours des dernières décennies, les chercheurs ont publié plus de 2 000 travaux scientifiques [121] portant sur le potentiel thérapeutique de l'ail (*Allium sativum L*) qui est l'une des plantes les plus répondues dans la médecine traditionnelle et la plus largement citée dans la littérature pour ses propriétés médicinales. L'huile essentielle d'*Allium sativum L* constitue l'extrait le plus connu principalement par son pouvoir antibactérien qui est attribué notamment aux composés sulfides qui les contient [122].

## Conclusion et perspectives

---

### Conclusion et perspectives

Notre travail fait partie d'un long et important axe de recherche dont le but est de valoriser davantage nos ressources locales, notamment l'utilisation des plantes aromatiques et médicinales dans plusieurs domaines, parmi lesquels la technologie agro-alimentaire, l'amélioration des différentes qualités des aliments ainsi que leur conservation. Dans cet axe, nous continuons le travail sur l'une des plantes à usage traditionnel alimentaire et médicinale, qui est l'ail *Allium sativum* L.

Les résultats du criblage préliminaire a montré que l'*Allium sativum* L. contient du **Tanin Saponoside ,Triterpenes, Coumarine ,Composés réducteurs** et aussi des **Alcaloides**.

Notre étude a montré que l'huile essentielle d'*Allium sativum* L. est de couleur jaune pâle, avec une odeur des agréable et un goût fort.

Le rendement en huile essentielle obtenu par l'extraction à la vapeur d'eau de plante est bien d'environt 0,1% (0.86%), comparé avec le rendement en huiles essentielles d'autre plantes.

L'huile essentielle d'*Allium sativum* L. présente un effet antibactérien intéressant vis-à-vis des *Escherichia coli* (G-) et deux différentes souches de *Staphylococcus aureus* (G+) .

Alors que cette huile s'est révélée inactive contre les *Pseudomonas Aeruginosa* .Cette méthode a été limité au criblage des activités antibactériennes qui doit être complété ensuite par une détermination de la CMI.

Le Pourcentage d'Inhibition de calcul de l'activité antioxydante est  $IC_{50} = 909,46 \mu\text{l/ml}$  et la concentration rationnelle  $IC_{50}\% = 9.1 \mu\text{l/ml}$

Nous espérons que ces études vont être achevées pour bien cibler les molécules principales responsables de ces effets antimicrobiens, ce qui fait appel à des techniques de purification et d'identification via l'étude photochimique et les analyses spectrales. La relation intime qui lie la structure chimique et l'activité des huiles essentielles de l'ail constitue le fondement de l'aromathérapie scientifique et doit être étudiée dans d'autres travaux. Tel que l'application pratique dans l'industrie alimentaire pour réduire les impacts indésirables sur propriétés sensorielles et de prolonger la durée de conservation de l'aliment.

## Références bibliographiques

---

- 1 -Baba-Aissa F (2000) Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS Algérie.
- 2-Bernadet M (2000) Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles, Editions Dangles.
- 3- Bremness L (1998) Les plantes aromatiques et Médicinales. Bordas Editions.
- 4- Sévenet T, Tortora C (1994) Plantes, molécules et médicaments. Nathan, CNRS Editions Paris.
- 5-Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deesalle –Féat T., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. 2001. Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12.
- 6-Beloued A., (1998) – Plantes médicinales d'Algérie. O.P.U., Alger. 277 p.
- 7-Bruneton J (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisier.
- 8- Bezanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torck M et Troutin F (1990) Plantes médicinales des régions tempérées. Maloine édition.
- 9- Block E (1992) The organosulfurchemistry of the genus *Allium*. Implications for the organic chemistry of sulphur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31 (9) 1135-1178.
- 10- Burdock GA (Ed) (1995) Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. Volume I, 3e Edition CRC Press.
- 11- Leung Albert Y (1980) Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. Wiley-Interscience Publication New York.
- 12- Richard H, Loo A (1992) Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts. *In* Richard H (coordonnateur) Epice et Aromates. Tec et Doc - Lavoisier, apria.

## Références bibliographiques

---

- 13- SatiadevSeetohul (1998) L'ail condiment et médicament. *PROSI Magazine* – N° 351.
- 14- Shankaranarayana ML, Raghavan B, Abraham KO and Natarajan CP (1982) Sulphur Compounds in Flavours. *In* Morton ID and Macleod AJ (Ed) Food Flavours, part A Introduction. Elsevier Scientific Publishing Company.
- 15-FRITSCH R et FRIESEN N., 2002. Allium crop sciences: Evolution, Domestication and Taxonomy. Ed. HD, Pp 15-23.
- 16-PERON J.Y., 2006. Productions légumières. Ed. Lavoisier, France. Pp140.
- 17- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S and Itakura Y. (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition*. 131, 955s-962s.
- 18- Bezanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torck M et Troutin F (1990) Plantes médicinales des régions tempérées. Maloine édition.
- 19- Block E, Ahmed S, Jain MK, Crecely RW, Apitz-Castro R and Cruz MR (1984) (E,Z)-Ajoene: A potent antithrombotic agent from garlic. *Journal of the American Chemical Society*. 106, 8295-8296.
- 20- Bruneton J (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Techniques et Documentations Lavoisier.
- 21- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12, 564-582.
- 22- Elnima EI, Ahmed SA, Mekkawi AG and Mossa JS (1983) The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie*. 38 (11) 747-748.
- 23- Jonkers D, Van Den Broek E, Van Dooren I, Thijs C, Dorant E, Hageman G and Stobberingh E. (1999) Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43, 837-839.
- 24- Leung Albert Y (1980) Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. Wiley-Interscience Publication New York.

## Références bibliographiques

---

- 25- Naganawa R, Iwata N, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T and Suzuki A. (1996) Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2269-2273.
- 26- O'gara EA, Hill DJ and Maslin DJ (2000) Activities of garlic oil, garlic powder and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2269-2273.
- 27- Ohta R, Yamada N, Kaneko H, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T and Suzuki A. (1999) *In vitro* inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 43, 1811-1812.
- 28- Ross ZM, O'gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV and Maslin DJ (2001) Antimicrobial Properties of garlic oil against Human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 475-480.
- 29- Shaath NA, Flores FB, Osman M, Abd-ElAal M (1995) The essential oil of *Allium sativum L.*, Liliaceae (Garlic). In Charalambous G (Ed.), Food Flavors: Generation, Analysis and Process influence. Elsevier Science.
- 30- Tsao SM and Yin MC (2001) In-vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47, 667-670.
- 31- Tsao SM and Yin MC (2001) In-vitro antimicrobial activity of diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *J. Med. Microbiol.* 50(7) 646-649.
- 32- Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD and Hughes BG. (1992) *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Medica*. 58, 417-423.
- 33- Winkler G, Iberl B and Knobloch K (1992) Reactivity of Allicin and its transformation products with sulphhydryl groups, disulfide groups and human blood. *Planta Medica*. 58 (Supplement Issue 1) A665.

## Références bibliographiques

---

- 34- Yoshida H, Iwata N, Katsuzaki H, Naganawa R, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T and Suzuki A (1998) Antimicrobial activity of a compound isolated from an oil-macerated garlic extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62(5) 1014-1017.
- 36- Yoshida H, Katsuzaki H, Ohta R, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T and Suzuki A (1999) Antimicrobial activity of the thiosulfinate isolated from oil-macerated garlic extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(3) 591-594. *arch.* 150(2) 167-172.
- 37- Robinson T (1991) The organic constituents of higher plants. The chemistry and interrelationships. Cordus Press, MA, USA.
- 38- Loza-Tavera Herminia (1999) Monoterpenes in Essential oils: Biosynthesis and Properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* 464, 49-62.
- 39- Johnson AW (2003) Invitation à la chimie organique. Editions De Boeck, Paris Bruxelles.
- 40- Benchaara Chaouki, Henry Greathead B, 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. p96-100.
- 41- Yuerdon, M. *la médecine naturelle au service de votre beauté et santé* 2004, 2-3, Edition suisse
- 42- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – Techniques et documentations, 3<sup>ème</sup> Edition, Lavoisier.
- 43- Hajhashemi V., Ghannadi A., Sharif B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia*. *J. Ethnopharmacol*; 89: 67–71.
- 44- Perry N.S., Bollen C., Perry E.K., Ballard C. (2003). *Salvia for dementia Therapy*. review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav*; 75: 651–659.
- 45- Silva J., Abebe W., Sousa S.M., Duarte V.G., Machado M.I.L., Matos F.J.A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol*; 89: 277–283.
- 46- Narishetty, S.T.K.; Panchagnula, R. *Journal of controlled release*. 2004, 95, 367-379
- 47- Hurtel J-M. (2006). Huiles essentielles et Médecine. Aromathérapie et santé.



## Références bibliographiques

---

- 48- Sharma S., Sangwan N.S., Sangwan R.S. (2003). Developmental process of essential oil glandular trichome collapsing in menthol mint. *Current science*; 84 (4-25): 544-558.
- 49- Porter N. (2001). Essential oils and their production. *Corp AND Food Research*. N°39
- 50-Frank, S.D.; Amelio, Sr.; Botanicals, D. *A phytocosmetic desk reference C.R.C.* 1990, Press Boca Raton, London, 5-6
- 51-Guinard, J.L. *Biochimie végétale*. Masson, 1996, Paris, 255
- 52-Balaiche, P. *traité de phytothérapie et aromathérapie*. 1979, Tome 1, Maloine S.A., Paris, 915
- 53-Bruneton, J., 2008. *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 2eme éd., Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, p 1188.
- 54-BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D., & IDAOMAR M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- 55-CROTEAU R., KUTCHAN T.M. & LEWIS N.G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, 1250-1268.
- 57-Anton J.C., Weniger B., Anton R., 2006. Huiles essentielles in Actifset additifs en cosmétologie. 3ème édition, Lavoisier Tec et Doc, Paris. P 189-229.
- 58-Oussalah M., 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on *Pseudomonas putida* growth, a bacterial spoilage. *Meat Science*, vol 73, p 236-244.
- 59- Bremness L (1998) *Les plantes aromatiques et Médicinales*. Bordas Editions.
- 60- Smith-Palmer A, Stewart J and Fyfe L. (1998) Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 26, 118-122.
- 61- Bruneton J (1999) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentations Lavoisier.
- 62- Bernadet M (2000) *Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles*, Editions Dangles.

## Références bibliographiques

---

- 63- Inouye S Takizawa T and Yamaguchi H (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 47, 565-573.
- 64- Inouye S, Yamaguchi H and Takizawa T (2001) Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 7, 251-254.
- 65- Dorman HJD, Figueiredo AC, Barroso JG and Deans SG (2000) In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*. 15, 12-16.
- 66- PIOCHON M. (2008). Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada.
- 67- LUCCHESI M.E. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.
- 68- ROUX D. (2008). Conseil en aromathérapie. 2<sup>ème</sup> édition, *Pro-Officina.*, 187.
- 69- HEMWIMON S., PAVASANT P. & SHOTIPRUX A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54, 44-50.
- 70- HERNANDEZ-OCHOA L.R. (2005). Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné « Solvant/ Actif ». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France.
- 71- POURMORTAZAVI S.M. & HAJIMIRSADEGHI S.S. (2007). "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis" *Journal of Chromatography A*, 1162, 2-24.
- 72- Arpino P., Prevot A., Serpinet J., Tranchant J., Vergnol A., Wittier P. , 1995. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse . Ed. Masson, Paris.

## Références bibliographiques

---

- 73-Dugop ,mondello ,favoin, cicerot l.,rodriguezzeno ,N.A.,andDugo, 2005. Chracterization of cold pressedMexicanDancy tangerine oils.Journal Flavourfragr.vol 22 p60-66.
- 74-Dunn Michael, Robert Shellie, Paul Morrison, Philip Marriott, 2004.Rapid sequentialheart-cutmultidimensionalgaschromatographicanalysis .Australian Centre for Research on Separation Science, journalof Applied Sciences (AppliedChemistry),vol10 p456-459.
- 75-Paris M, et alAbrégé de matière médicale, pharmacogenosie. 1981,Tome I, Masson, Paris, 339
- 76- Brunton,J. *Pharmacogenosiephytochimie plante médicinales*. 1999,3eme édition, Tec & Doc et EM inter, 1120
- 77- Smallfield B. (.2003). Introduction to growingherbs for essential oils, medicinal and culinarypurposes. Corp and Food Research. N°45. P4.
- 78- Svoboda K.P., Hampson J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and otherrelated pharmacological activities. BiologyDepartment, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA65HW.
- 79-CAILLET S. & LACROIX M. (2007). Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS - Institut Armand - Frappier, Université de Laval (Québec).
- 80-Alais C., Linden G. et Miclo L., 2003. Biochimie alimentaire, DUNOD. 5ème édition de l'abrégé. 59p.
- 81-Alais C., Linden G. et Miclo L., 2008. Biochimie alimentaire, DUNOD. 6ème édition, paris. pp. 67-71.
- 82-Rashid ch A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J. and Arshad M., 2010. Quantitative determination of antioxidantpotential of *Artemisiapersica*. *AnaleleUniversităŃiiidin București – Chimie (serienouă)*, vol. 19 N°1, pp. 23-30.
- 83-Beirão A.R.B. and Bernardo-Gil M.G., 2006. Antioxidantsfrom*Lavandulaluisieri*. 2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering. Portugal ; 8p.

## Références bibliographiques

---

- 84-Hussain A.I., 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. *Doctorale thesis*, Pakistan ; 257p.
- 85-Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S., 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: pp.1070-1078.
- 86-Hubert J., 2006. Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines. *Thèse de doctorat*. N° 2435. Institut National Polytechnique de Toulouse, 64p.
- 87-Portes E., 2008. Synthèse et Etudes de tétrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. *Thèse de doctorat*. N° 3695. Université Bordeaux I, 244p.
- 88-Prakash A., 2001. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories analytical progress*. Vol. 19, N°2. 2p.
- 89-Molyneux P., 2004. Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* Vol. 26 N° 2. 212p.
- 90-Simionatto E., Bonani V.F.L., Morel A.F., Poppi N.R., Júnior J.L.R., Stuker C.Z., Peruzzo G.M., Peres M.T. and Hess S.C., 2007. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil
- 91-CE, 2001. Commission Européenne : proposition de la commission en matière de lutte contre la résistance microbienne. Bruxelles. *In* Kechkar M., 2008.
- 92-Rožman T. and Jeršek B., 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, Vol. 93 ; N° 1, pp.51-58.
- 93-Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum*
- 94-L. essential oils. *Food Chemistry*; pp.135-140.

## Références bibliographiques

---

Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007.

Chemical and biological characteristics of *Cuminumcyminum* and *Rosmarinusofficinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: pp.898-904.

95-Ahmad A.M., Khokhar I., Ahmad I., Kashmiri M.A., Adnan A. and Ahmad M., 2006b. Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of *Thymus serpyllum*. *Internet Journal of Food Safety*, Vol. 5, pp.56-60.

96-Rhayour K., 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacteriumphlei* et *Mycobacteriumfortuitum*. *Thèse de doctorat*. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 170p.

97-Kechkar M., 2008. Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. *Mémoire de magister*. Université Mentouri Constantine, Algérie. 99p.

98-Baydar H., Sagdic O., Ozkan G., and Karadogan T., 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15: pp.169-172.

99-Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., 2010. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Menthapulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 6 (3): pp. 191-198.

100-Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennd K.N., Kanko C., Ahibo C. & Casanovad J., 2008. Etude chimique et activité anti diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. Vol.24, №1, pp. 94-103.

101- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp.223-253.

102- Wilkinson J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapitre VIII.

pp.157-165. In Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.

## Références bibliographiques

---

- 103-Mogode D, « Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* Vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad » .Université de Bamako ,2005.
- 104- Liolios C.C., Gortzi O., Lalas S., Tsaknis J., Chinou I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*; 112: 77-83.
- 105- Nauciel, C., *Bactériologie médicale*, 2000, Masson .Ed.Paris.
- 106- Avril, J.L.; Dabernat, H.; Denis, F.; Monteil, H., *Bactériologie clinique*, 2000, 3.Ed. Ellipses,Paris.
- 107- Bourgeois C.M., Mesle J.F. (1996). *Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et la qualité des aliments*. p420.
- 108- Billerbeck V.G. (2003). Détermination des CMI et QMI des produits air pharma sur des souches bactériennes multi résistantes. Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Microbiologie industrielle. Toulouse.
109. Karumi Y., Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O. (2004) Identification of Active Principles of *M. balsamifera* (Balsam Apple) Leaf Extract. *J. Med. Sci.* 4 (3), 179-182.
- 110-Edeaga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O. ( 2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*. 4 (7):685-688.
- 111-Benmehdi. H; 2000. valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire de magistère en chimie organique appliquée. Département de chimie faculté des sciences Université Tlemcen.
- 112-Janssen AM, Scheffer JJC and Baerhein Svendsen A (1987) Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Medica*. 53, 395-398.
- 113-Rahal K, et un groupe de collaborateurs (2003) Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'Echelle Nationale Selon les recommandations de l'OMS, 3e Edition.
- 114-Boulaïbal F (1993) *Microbiologie S1 Clinique*. Office des Publications Universitaires

## Références bibliographiques

---

(OPU), Alger.

115-Filippi, V., C. Ronsmans, et al. (2006). "Maternal health in poor countries: the broader context and a call for action." *Lancet* 368: 1535 - 1541.

116-Hogg JW., SJ Terhune, and N. Pichitakul., 1972. Essential oils and their constituents. IX. The oils of *Ocimum sanctum* and *Ocimum basilicum* from Thailand. *Flavor Ind.*, Jan. vol 3 p. 47-49.

118-Ross ZM., O'Gara E.A., Hill D.J., Sleightholme H.V., Maslin D.J. (2001).

Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*; 67(1):475-480.

119-Benkeblia N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*; 37:263-268.

120-Haciseferogullari H., Ozcan M., Demir F., Calisir S. (2005). Some nutritional and Technological properties of garlic. *Journal of Food Engineering*; 68: 463-469.

121- Lilia L., Méndez L., François C. (2008). Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. *Food Chemistry*; 111: 56-60.

122- Camille D. (1998). *Microbiologie, 90 heures de travaux pratique, enseignement.*

123- Khoudali et al. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (3) (2014) 887-898 ISSN : 2028-2508 CODEN: JMESC�