



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIORAT
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES

THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT
3^{ème} Cycle
Spécialité : Génie des Procédés
Option : Génie des Procédés Chimiques et Biotechnologiques

INTITULÉ

Eco-extraction d'huiles essentielles de trois espèces végétales aromatiques en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens : étude expérimentale et modélisation

Soutenue par : **Mr. Mohamed DJERMANE**

Devant le jury

Président :	Mme. Nadia FERTIKH	Professeur	Université de Annaba
Encadrant :	Mr. Abdenabi ABIDI	MCA	Université de Annaba
Examineur :	Mr. Segni LADJEL	Professeur	Université de Ouargla
Examineur :	Mme. Nacéra ZABAT	MCA	Université de Annaba
Examineur :	Mr. Mahdi CHIHA	MCA	Université de Skikda
Examineur :	Mr. Abdelali MERAH	MCA	Université de Annaba

Année universitaire : 2018 – 2019



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES DE L'INGENIORAT
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES

THÈSE
PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT
3^{ème} Cycle
Spécialité : Génie des Procédés
Option : Génie des Procédés Chimiques et Biotechnologiques

INTITULÉ

Eco-extraction d'huiles essentielles de trois espèces végétales aromatiques en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens : étude expérimentale et modélisation

Soutenue par : **Mr. Mohamed DJERMANE**

Devant le jury

Président :	Mme. Nadia FERTIKH	Professeur	Université de Annaba
Encadrant :	Mr. Abdenabi ABIDI	MCA	Université de Annaba
Examineur :	Mr. Segni LADJEL	Professeur	Université de Ouargla
Examineur :	Mme. Nacéra ZABAT	MCA	Université de Annaba
Examineur :	Mr. Mahdi CHIHA	MCA	Université de Skikda
Examineur :	Mr. Abdelali MERAH	MCA	Université de Annaba

Année universitaire : 2018 – 2019

Remerciements

Avant tout, je dois remercier Dieu le tout puissant qui m'a donné la force et la patience pour mener à terme ce modeste travail.

*Mes plus chaleureux remerciements vont d'abord à mon directeur de thèse Monsieur **Abdenabi ABIDI** (Maître de conférences à l'Université d'Annaba), pour ses qualités humaines, ses compétences garant de ce travail particulièrement enrichissant. Il m'a guidé durant la préparation de ce travail et su trouver le compromis pour me laisser libre dans mes choix. Je souhaiterais lui témoigner, ici, de ma sincère reconnaissance pour les conseils qui m'ont éclairé et les pertinentes remarques qui m'ont boosté et fait avancé mes travaux. Encouragements et confiance ne m'ont pas quitté tout au long de ce parcours. Je lui exprime encore une fois mes vifs et sincères remerciements.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **Abdelaziz TOUBAL** (Professeur à l'université d'Annaba) pour sa pleine disponibilité notamment dans les moments difficiles. Je le remercie, également, pour ses grandes qualités humaines et son soutien moral durant les moments de contact.*

*Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à Madame **Nadia FERTIKH** (Professeur à l'université d'Annaba), pour avoir accepté de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et reconnaissance.*

*Je tiens à remercier Monsieur **Segni LADJEL** (Professeur à l'université de Kasdi Merbah Ouargla), d'avoir accepté de participer à ce jury et de se déplacer. Je tiens à vous remercier de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire de génie des procédés, de faire partager votre expérience dans le monde de la recherche scientifique.*

*J'exprime ma gratitude à Madame **Nacera ZABAT** (Maître de conférences A de l'Université d'Annaba), pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury.*

*Ma reconnaissance va également à Monsieur **Mahdi CHIHA** (Maître de conférences A de l'Université de Skikda), d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir accepté de se déplacer.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur **Abdelali MERAH** (Maître de conférences A de l'Université d'Annaba), pour son aimable participation au jury.*

*Mes profondes reconnaissances vont également aux docteurs : **Imed CHERAIF** et **Amani CHROUDA** ; du laboratoire de biochimie, Faculté de Médecine, Monastir-Tunisie. Je les remercie pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles par CPG/SM.*

*Mes infiniment remerciements vont également à Monsieur **Abdelghani DJAHOUDI** (Professeur de l'Université d'Annaba), de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Avec ses qualités humaines et son expérience il m'a fait l'honneur et donné de l'engouement à travailler avec lui. Je lui serai toujours reconnaissant pour m'avoir donné l'occasion d'apprécier certaines valeurs transmises durant nos contacts et dont je bénéficierai certainement à travers le triptyque : patience, compréhension et rigueur.*

Je tiens à remercier sincèrement toute l'équipe du laboratoire de Biomathématiques Biophysique Biochimie et de Scientométrie (LBBBS ou L3BS) de l'université de Bejaia pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire dans le cadre de la réalisation de mes études : j'exprime à tous mon respect et ma profonde gratitude.

*Mes chaleureux remerciements s'adressent à Monsieur **Noureddine GHERRAF** (Professeur à l'université d'Oum el Bouaghi) et Monsieur **Ahmed BEDDIAR** (Ingénieur Spécialisé, Formateur et ancien cadre supérieur de CTC), pour leur aide, leurs précieux conseils et leurs connaissances scientifiques qui m'ont permis d'avancer qualitativement dans mon travail.*

*Je n'oublierai pas de remercier Monsieur **Abderrahmane HMAYZIA**, herboriste à la wilaya d'Oum el Bouaghi, pour son aide et soutien efficace dans la cueillette et l'acheminement de nos espèces végétales.*

Je n'oublierai jamais mon père et ma mère qui m'ont soutenu pendant toutes ces années, chacun à sa manière, et sans qui je n'aurai pas pu aller au bout de mes projets..., Merci à tous mes frères, sœurs et à tous mes amis.

Enfin, à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la concrétisation de ce travail, je leur dit merci pour leur soutien moral et pour tout ce qu'ils ont pu faire pour moi.

ملخص

اليوم، تعتبر الزيوت الأساسية كعوامل مضادة للميكروبات على نطاق واسع. أدى الاستخدام المفرط للأدوية الاصطناعية ومقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية إلى إعادة النظر بشكل إيجابي في استخدام الزيوت الأساسية في الممارسات الطبية. هذا العمل يقوم على تبيين ثلاثة نباتات طبية من ثروتنا النباتية، والتي هي: الكاليتوس (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.)، الميرمية (*Salvia officinalis* L.) وأيضا نبات الفيجل (*Ruta chalepensis* L.). في البداية سنعطي دفعا جديدا لهذه النباتات من خلال ضبط القيم المثالية للعوامل المؤثرة في عملية التقطير (حجم الحبيبات، معدل تدفق التكثيف ووقت عملية الاستخراج) من أجل تحسين مردود الزيوت الأساسية.

أظهرت نتائج التحسين أنه بإمكاننا الوصول إلى أقصى إنتاج لمردود الزيوت من خلال ضمان شروط التقطير التالية لكل نبتة: لاستخراج الزيت الأساسي من *E. camaldulensis* (1مم، 3.4مل/دقيقة و 210دقيقة)؛ *S. officinalis* (2مم، 1.4مل/دقيقة و 210دقيقة) و *R. chalepensis* (2مم، 3.4مل/دقيقة و 204دقيقة).

إن الخصائص الفيزيائية والكيميائية المسجلة تدل على الجودة الجيدة لزيوتنا الأساسية المستخرجة بالتقطير. كما امكنتنا طريقة CPG/SM من عزل 35 مكون للزيت الطيار لنبتة *E. camaldulensis* حيث يظهر p-Cymene بنسبة 26.22٪ باعتبارها المكون الرئيسي، 34 مركبا لنبتة *S. officinalis* حيث α -Thujone (28.36٪)، وأخيرا الزيت الطيار لنبتة *R. chalepensis* يحتوي على 37 مركبا مع 2-undecanone (33.37٪).

في وقت لاحق، النشاط المضاد للمكروبات تم اختباره على خمسة عشر سلالة بكتيرية. كان النشاط المضاد للمكروبات متغيرا تبعا لطبيعة السلالة والزيوت، مع غلبة زيت *E. camaldulensis* التي حصلت على أفضل النتائج. أيضا، تقييم التآزر بين الزيوت الأساسية يسلط الضوء على العمل التآزري عن طريق الجمع بين الزيت العطري لـ *E. camaldulensis* و *S. officinalis*، وأيضا بين الزيت العطري لـ *E. camaldulensis* و *R. chalepensis*، وهذا المزيج يقلل من MICs ويحسن النشاط المضاد للكائنات المجهرية ضد السلالات التي لديها حساسية منخفضة للزيوت.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر باستعمال اختبار DPPH. من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح بان الزيوت الأساسية الثلاثة تملك قدرة مضادة إرجاعية منخفضة مقارنة مع مضادات الأكسدة القياسية الموظفة.

الخصائص البيولوجية المختلفة الملاحظة ترجع الى مدى تعقيد التركيب الكيميائي للزيوت

الأساسية.

كلمات البحث: *Ruta chalepensis* L.، *Salvia officinalis* L.، *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. عملية التقطير، الزيوت الأساسية، التحسين الأمثل، التأثير المضاد للكائنات المجهرية، التأثير المضاد للأكسدة.

RESUME

Aujourd'hui, les huiles essentielles sont considérées comme agents antimicrobiens à large spectre. L'usage excessif des médicaments de synthèse et la résistance des bactéries aux antibiotiques, ont conduit à reconsidérer favorablement l'utilisation des huiles essentielles en pratiques médicales. Le présent travail porte sur la valorisation de trois espèces végétales de notre patrimoine floristique, à savoir : *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Salvia officinalis* L. et *Ruta chalepensis* L. Dans un premier temps, par cette étude, nous donnerons un nouvel élan à ces espèces à partir de l'optimisation des paramètres (granulométrie, débit de condensation et temps d'extraction) qui influent sur le procédé d'hydrodistillation afin d'améliorer leur rendement en huiles essentielles.

Les résultats de l'optimisation ont montré que nous pouvons atteindre des rendements maximums en assurant les conditions opératoires d'hydrodistillation pour chaque espèce : l'extraction de l'HE d'*E. camaldulensis* (1mm, 3.4ml/min et 210min), *S. officinalis* (2mm, 1.4ml/min et 210min) et pour *R. chalepensis* (2mm, 3.4ml/min et 204min).

Les propriétés physico-chimiques enregistrées témoignent la bonne qualité de nos essences issues de l'hydrodistillation. Ainsi, les HEs ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). L'analyse a recensé 35 composés pour l'HE d'*E. camaldulensis* avec 26.22% de *p*-Cymene comme constituant majoritaire, 34 composés pour l'HE de *S. officinalis* dont le α -Thujone (28.36%) et finalement l'huile essentielle de *R. chalepensis* contenant 37 composés avec 2-undécane (33.37%).

Par la suite, le potentiel antimicrobien des HEs a été testé sur une quinzaine de souches bactériennes. L'activité antimicrobienne s'est révélée variable selon la nature de la souche et de l'HE avec une prédominance d'*E. camaldulensis* qui a obtenu les meilleurs résultats. L'évaluation de la synergie entre les HEs met en évidence l'action synergique en associant l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* et *S. officinalis*, ainsi que l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* et *R. chalepensis*. Cette combinaison diminue les CMI et améliore l'activité antimicrobienne des HEs vis-à-vis des souches bactériennes qui représentent une faible sensibilité.

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée à travers le test du piégeage du radical libre DPPH. D'après les résultats, les trois huiles essentielles sont dotées d'un potentiel antiradicalaire faible par rapport à l'antioxydant standard employé.

Les propriétés biologiques observées seraient liées à la complexité de la composition chimique et de la synergie entre eux.

Mots clés : *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. ; *Salvia officinalis* L. ; *Ruta chalepensis* L. ;
Hydrodistillation ; Huile essentielle ; Optimisation ; Effet antimicrobien ; Effet antioxydant.

ABSTRACT

Today, essential oils are considered as broad-spectrum antimicrobial agents. The excessive use of synthetic drugs and the resistance of bacteria to antibiotics have led to a favorable reconsideration of the use of essential oils in medicinal practices. The present work concerns the reevaluation of three medicinal plants of our floristic heritage namely: *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Salvia officinalis* L. and *Ruta chalepensis* L. Firstly, by this study, we will give a new impetus to these plants by optimizing the parameters that influence the hydro-distillation process (granulometry, condensation flow, extraction time) to improve their yield of essential oils.

The results of the optimization show that we can reach maximum yields by ensuring the hydro-distillation operating conditions for each plant: the extraction of essential oil from *E. camaldulensis* (1mm, 3.4ml/min and 210min), *S. officinalis* (2mm, 1.4ml/min and 210min) and *R. chalepensis* (2mm, 3.4ml/min and 204min).

The physicochemical properties recorded testify the good quality of our essences resulting from hydro-distillation. Thus, the essential oils were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The analysis identified 35 compounds for *E. camaldulensis* with 26.22% p-Cymene as the major constituent, 34 compounds for the essential oil of *S. officinalis* including α -Thujone (28.36%), and finally the essential oil of *R. chalepensis* containing 37 compounds with 2-undecanone (33.37%).

Subsequently, the antimicrobial potential of essential oils was tested on about fifteen bacterial strains. Antimicrobial activity was variable depending on the nature of the strain and essential oil with a predominance of *E. camaldulensis* that got the best results. Also, the evaluation of the synergy between the essential oils highlight the synergistic action by combining the essential oil of *E. camaldulensis* and *S. officinalis*, as well as the essential oil of *E. camaldulensis* and *R. chalepensis*. This combination decreases MICs and improves the antimicrobial activity of our essential oils against bacterial strains that represents low sensitivity.

In vitro, antioxidant activity was assessed through the DPPH free radical scavenging assay. Based on the results, the three essential oils have a low free radical potential compared to the standard antioxidant used.

The biological properties observed would be related to the complexity of the chemical composition and the synergy between them.

Key words: *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.; *Salvia officinalis* L.; *Ruta chalepensis* L.; Hydrodistillation; Essentials oils; Optimization; Antimicrobial effect; Antioxidant effect.

TABLE DE MATIERE

LISTE DES TABLEAUX	I
LISTE DES FIGURES	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1

PREMIÈRE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I.1 Introduction	4
I.2 Historique	4
I.3 Définition	4
I.4 Composition chimique des huiles essentielles	5
I.4.1 Terpènes	5
I.4.2 Composés aromatiques	6
I.4.3 Composés d'origine diverse	6
I.5 Procédés d'extraction des huiles essentielles	6
I.5.1 Hydrodistillation.....	6
I.5.2 Entraînement à la vapeur d'eau	7
I.5.3 Extraction par solvants volatils	8
I.5.4 Hydro-diffusion	9
I.5.5 Extraction assistée par micro-onde.....	10
I.5.6 Extraction par fluide supercritique	11
I.6 Conservation des huiles essentielles	11
I.7 Caractérisations des huiles essentielles	12
I.8 Techniques d'analyses des huiles essentielles	12
I.8.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	12
I.8.2 Spectrométrie de masse (SM).....	13
I.8.3 Analyse par couplage CPG/SM.....	14
I.9 Activités biologiques des huiles essentielles.....	14
I.9.1 Activité antioxydante.....	15
I.9.2 Activité antibactérienne.....	15
I.9.3 Activité antifongique	16
I.10 Domaines d'utilisation des huiles essentielles	16
I.10.1 Dans l'industrie agroalimentaire	16

I.10.2 En parfumerie et cosmétique	17
I.10.3 En pharmacie	17
I.10.4 En diverses industries	17
I.11 Conclusion.....	18

CHAPITRE II : PRÉSENTATION DES ESPÈCES ÉTUDIÉES

II.1 Introduction.....	19
II.2 Famille des Myrtacées et genre <i>Eucalyptus</i>	19
II.2.1 <i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.....	20
II.2.1.1 Classification systématique	20
II.2.1.2 Répartition géographique et description botanique	20
II.2.1.3 Utilisations traditionnelles	21
II.2.1.4 Composition chimique de l'huile essentielle.....	21
II.2.1.5 Propriétés biologiques	21
II.3 Famille des Lamiacées et genre <i>Salvia</i>	22
II.3.1 <i>Salvia officinalis</i> L.	22
II.3.1.1 Classification systématique	22
II.3.1.2 Répartition géographique et description botanique	23
II.3.1.3 Utilisations traditionnelles	23
II.3.1.4 Composition chimique de l'huile essentielle.....	24
II.3.1.5 Propriétés biologiques	24
II.4 Famille des Rutacées et genre <i>Ruta</i>	24
II.4.1 <i>Ruta chalepensis</i> L.	25
II.4.1.1 Classification systématique	25
II.4.1.2 Répartition géographique et description botanique	25
II.4.1.3 Utilisations traditionnelles	26
II.4.1.4 Composition chimique de l'huile essentielle.....	27
II.4.1.5 Propriétés biologiques	27
II.5 Conclusion	27

DEUXIÈME PARTIE : ECO-EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION ; MISE AU POINT, CARACTÉRISATION ET MODÉLISATION

CHAPITRE III : PROTOCOLE OPÉRATOIRE

III.1 Introduction	29
III.2 Matériel végétal	29

III.2.1	Choix du matériel végétal	29
III.2.2	Zones d'échantillonnages	30
III.2.3	Récolte des espèces végétales	31
III.2.4	Préparation du matériel végétal	31
III.3	Extraction des huiles essentielles	33
III.3.1	Choix de la méthode d'extraction	33
III.3.2	Dispositif expérimental	33
III.3.3	Mode opératoire	34
III.3.4	Rendement en huile essentielle	34
III.3.5	Etude de la cinétique d'hydrodistillation	34
III.3.6	Conservation des huiles essentielles	35
III.4	Etude analytique des huiles essentielles	35
III.4.1	Caractéristiques organoleptiques	35
III.4.2	Propriétés physico-chimiques	35
III.4.3	Analyse chimique des huiles essentielles par CPG/SM.....	38
III.4.3.1	Principe de la technique	38
III.4.3.2	Appareillages.....	39
III.4.3.3	Conditions chromatographiques.....	39
III.5	Conclusion	40

CHAPITRE IV : EXTRACTION PAR HYDRODISTILLATION ET CARACTÉRISATION SYSTÉMATIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

IV.1	Introduction	41
IV.2	Rendement en huiles essentielles	41
IV.3	Cinétique d'hydrodistillation des huiles essentielles	42
IV.4	Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites	44
IV.5	Propriétés physicochimiques des huiles essentielles extraites	45
IV.5.1	Densité relative (d^{20}).....	45
IV.5.2	Indice de réfraction (I_R)	46
IV.5.3	Indice d'acide (I_A).....	47
IV.6	Analyse chimique des huiles essentielles extraites	48
IV.6.1	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>E. camaldulensis</i>	48
IV.6.2	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>S. officinalis</i>	51
IV.6.3	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>R. chalepensis</i>	53
IV.7	Conclusion.....	56

CHAPITRE V : MODÉLISATION PARAMÉTRIQUE DU PROCÉDÉ D'HYDRODISTILLATION

V.1 Introduction	57
V.2 Théorie d'optimisation expérimentale.....	57
V.3 Méthodes classiques d'optimisation.....	58
V.4 Méthodes des plans d'expériences.....	58
V.4.1 Principe et intérêt des plans d'expériences	58
V.4.2 Plan composite	59
V.4.3 Plan Box-Behnken	60
V.4.4 Méthode de surfaces de réponse (MSR)	60
V.5 Méthode d'optimisation adoptée	61
V.5.1 Choix des paramètres étudiés.....	61
V.5.2 Choix de plan d'expérience (Box-Behnken).....	61
V.5.3 Domaines d'étude et matrice d'expériences	62
V.5.4 Modèle mathématique.....	63
V.5.5 Analyse statistique	63
V.5.6 Optimisation paramétrique.....	63
V.6 Résultats et discussions	64
V.6.1 Modélisation de l'hydrodistillation d'HE d' <i>E. camaldulensis</i>	64
V.6.2 Modélisation de l'hydrodistillation d'HE de <i>S. officinalis</i>	70
V.6.3 Modélisation de l'hydrodistillation d'HE de <i>R. chalepensis</i>	75
V.7 Conclusion	81

TROISIÈME PARTIE : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES ; EFFET DE SYNERGIE

CHAPITRE VI : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

VI.1 Introduction	82
VI.2 Antibiotiques et résistance microbienne	82
VI.2.1 Les antibiotiques naturels et synthétiques	82
VI.2.2 Résistance aux antibiotiques.....	83
VI.2.3 Risque de résistance aux antibiotiques	84
VI.3 Rôle des plantes dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques	85
VI.4 Techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i>	85
VI.4.1 Techniques de screening des huiles essentielles.....	86

VI.4.1.1	Technique de l'aromatogramme	86
VI.4.1.2	Technique de diffusion en puits	87
VI.4.1.3	Technique de diffusion en phase vapeur.....	87
VI.4.2	Techniques de détermination de la CMI des huiles essentielles.....	87
VI.4.2.1	Technique de dilution en milieu liquide	87
VI.4.2.2	Technique de dilution en milieu solide (Agar)	88
VI.5	Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites	88
VI.5.1	Origine et choix de souches bactériennes	88
VI.5.2	Milieux de culture et conservation des souches	89
VI.5.3	Préparation des suspensions bactériennes	89
VI.5.4	Screening des huiles essentielles extraites (Aromatogramme).....	89
VI.5.5	Quantification de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites.....	91
VI.6	Etude de la synergie des huiles essentielles extraites.....	93
VI.7	Résultats	94
VI.7.1	Test d'aromatogramme.....	94
VI.7.2	Détermination des CMI et du type d'activité.....	98
VI.7.3	Effet synergique entre les huiles essentielles extraites	101
VI.8	Discussion	102
VI.9	Conclusion.....	107

CHAPITRE VII : ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

VII.1	Introduction.....	109
VII.2	Activité antioxydante	109
VII.3	Radicaux libres et stress oxydatif	109
VII.4	Lutte contre le stress oxydatif	110
VII.5	Agents antioxydants	110
VII.5.1	Antioxydants primaires	110
VII.5.2	Antioxydants secondaires.....	110
VII.6	Sources des antioxydants	111
VII.6.1	Sources synthétiques	111
VII.6.2	Sources naturelles.....	111
VII.7	Techniques d'évaluation de l'activité antioxydante	111
VII.7.1	Test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)	112
VII.7.2	Test de β -carotène	113
VII.7.3	Test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	113

VII.8 Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites	113
VII.8.1 Mécanisme d'action du radical DPPH	114
VII.8.2 Courbe d'étalonnage	114
VII.8.3 Mode opératoire	115
VII.8.4 Estimation d'IC ₅₀	116
VII.9 Résultats	116
VII.9.1 Courbe d'étalonnage	116
VII.9.2 Effet scavenger du radical libre DPPH	117
VII.10 Discussion	119
VII.11 Conclusion	120
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	122
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126
ANNEXE.....	146

LISTE DES TABLEAUX

Tableau IV.1 :	Rendement en huiles essentielles extraites.	41
Tableau IV.2 :	Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites.	44
Tableau IV.3 :	Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles (NDA).	45
Tableau IV.4 :	Valeurs des densités relatives des huiles essentielles extraites.	46
Tableau IV.5 :	Valeurs des indices de réfraction des huiles essentielles extraites.	46
Tableau IV.6 :	Valeurs d'indices d'acide des huiles essentielles extraites.	47
Tableau IV.7 :	Composition chimique de l'HE d' <i>E. camaldulensis</i> issue de l'hydrodistillation.	50
Tableau IV.8 :	Composition chimique de l'HE de <i>S. officinalis</i> issue de l'hydrodistillation.	51
Tableau IV.9 :	Composition chimique de l'HE de <i>R. chalepensis</i> issue de l'hydrodistillation.	55
Tableau V.1 :	Domaines expérimentaux des paramètres étudiés.	62
Tableau V.2 :	Matrice d'expérience.	62
Tableau V.3 :	Valeurs du rendement expérimental (<i>E. camaldulensis</i>).	65
Tableau V.4 :	Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle quadratique (<i>E. camaldulensis</i>).	66
Tableau V.5 :	Coefficients de régression du modèle (<i>E. camaldulensis</i>).	67
Tableau V.6 :	Valeurs du rendement expérimental (<i>S. officinalis</i>).	70
Tableau V.7 :	Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle quadratique (<i>S. officinalis</i>).	71
Tableau V.8 :	Coefficients de régression du modèle (<i>S. officinalis</i>).	72
Tableau V.9 :	Valeurs du rendement expérimental (<i>R. chalepensis</i>).	76
Tableau V.10 :	Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle quadratique (<i>R. chalepensis</i>).	77
Tableau V.11 :	Coefficients de régression du modèle (<i>R. chalepensis</i>).	78

Tableau VI.1 :	Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	95
Tableau VI.2 :	Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Salvia officinalis</i> .	96
Tableau VI.3 :	Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> .	97
Tableau VI.4 :	Valeurs des CMI ₅₀ et types d'activité des trois huiles essentielles sur les souches testées.	99
Tableau VI.5 :	Potentiel synergique entre l'HE d' <i>E. camaldulensis</i> et de <i>S. officinalis</i> .	101
Tableau VI.6 :	Potentiel synergique entre l'HE d' <i>E. camaldulensis</i> et de <i>R. chalepensis</i> .	101
Tableau VI.7 :	Potentiel synergique entre l'HE de <i>S. officinalis</i> et de <i>R. chalepensis</i> .	101
Tableau VII.1 :	IC ₅₀ des huiles essentielles et de l'acide ascorbique.	118

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 :	Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation [34].	7
Figure I.2 :	Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.	8
Figure I.3 :	Montage d'extraction par solvant.	8
Figure I.4 :	Montage d'hydro-diffusion.	9
Figure I.5 :	Hydrodistillation assistée par micro-ondes [34].	10
Figure I.6 :	Schéma de la technique d'extraction par le CO ₂ supercritique [41].	11
Figure I.7 :	Appareillage pour une chromatographie en phase gazeuse.	12
Figure I.8 :	Schéma de couplage CPG/SM	14
Figure II.1 :	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh. [74].	20
Figure II.2 :	<i>Salvia officinalis</i> L. [92].	23
Figure II.3 :	<i>Ruta chalepensis</i> L.	26
Figure III.1 :	Espèces végétales retenues.	29
Figure III.2 :	Situation géographique des régions d'étude et localisation de zones de prélèvement (Google Earth).	30
Figure III.3 :	Echantillons après séchage.	31
Figure III.4 :	Echantillon après broyage (<i>cas d'E. camaldulensis</i>).	32
Figure III.5 :	Tamiseur vibrant ordinaire (GB/T600 3.1-1997).	32
Figure III.6 :	Echantillons- après tamisage (<i>cas d'E. camaldulensis</i>).	32
Figure III.7 :	Montage de l'hydrodistillation mise en place (<i>Clevenger</i>).	33
Figure III.8 :	Réfractomètre type ABBE.	36
Figure III.9 :	Dispositif de mesure de l'indice d'acide.	37
Figure IV.1 :	Variation de la masse cumulée de l'huile essentielle d' <i>E. camaldulensis</i> en fonction du temps d'extraction.	42
Figure IV.2 :	Variation de la masse cumulée de l'huile essentielle de <i>S. officinalis</i> en fonction du temps d'extraction.	43

Figure IV.3 :	Variation de la masse cumulée de l'huile essentielle de <i>R. chalepensis</i> en fonction du temps d'extraction.	43
Figure IV.4 :	Chromatogramme d'analyse de l'huile essentielle d' <i>E. camaldulensis</i> par CPG/SM.	49
Figure IV.5 :	Chromatogramme d'analyse de l'huile essentielle de <i>S. officinalis</i> par CPG/SM.	52
Figure IV.6 :	Chromatogramme d'analyse de l'huile essentielle de <i>R. chalepensis</i> par CPG/SM.	54
Figure V.1 :	Plan composite pour deux facteurs.	59
Figure V.2 :	Design Box-Behnken à trois facteurs et trois niveaux.	60
Figure V.3 :	Représentation du rendement prévu d'HE de d' <i>E. camaldulensis</i> en fonction du rendement expérimental.	66
Figure V.4 :	Surfaces de réponse pour montrer l'effet des paramètres d'hydrodistillation sur le % du rendement en huile d' <i>E. camaldulensis</i> : (a) temps d'extraction et granulométrie ; (b) débit de condensation et temps d'extraction ; (c) débit de condensation et granulométrie.	68
Figure V.5 :	Profil de prévision des conditions optimales de l'hydrodistillation d' <i>E. camaldulensis</i> .	69
Figure V.6 :	Représentation du rendement prévu d'HE de <i>S. officinalis</i> en fonction du rendement expérimental.	72
Figure V.7 :	Surfaces de réponse pour montrer l'effet des paramètres d'hydrodistillation sur le % du rendement en huile de <i>S. officinalis</i> : (a) temps d'extraction et granulométrie ; (b) débit de condensation et temps d'extraction ; (c) débit de condensation et granulométrie.	73
Figure V.8 :	Profil de prévision des conditions optimales de l'hydrodistillation de <i>S. officinalis</i> .	74
Figure V.9 :	Représentation du rendement prévu d'HE de <i>R. chalepensis</i> en fonction du rendement expérimental.	77
Figure V.10 :	Surfaces de réponse pour montrer l'effet des paramètres d'hydrodistillation sur le % du rendement en huile de <i>R. chalepensis</i> : (a) temps d'extraction et granulométrie ; (b) débit de condensation et temps d'extraction ; (c) débit de condensation et granulométrie.	79

Figure V.11 :	Profil de prévision des conditions optimales de l'hydrodistillation de <i>R. chalepensis</i> .	80
Figure VI.1 :	Première découverte clinique des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique.	83
Figure VI.2 :	Technique de l'aromatogramme.	86
Figure VI.3 :	Technique de diffusion en phase vapeur « micro-atmosphères ».	87
Figure VI.4 :	Coulage du milieu MH et ensemencement des suspensions bactériennes.	90
Figure VI.5 :	Schéma descriptif de la technique suivie, pour la quantification de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (CMI), et leurs types d'activité.	92
Figure VI.6 :	Zones d'inhibition d'huile essentielle d' <i>E camaldulensis</i> vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> (2) et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (1).	94
Figure VI.7 :	Sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle d' <i>E camaldulensis</i> .	94
Figure VI.8 :	Sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>S. officinalis</i> .	96
Figure VI.9 :	Sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle de <i>R. chalepensis</i> .	97
Figure VI.10 :	Lecture des CMI des huiles essentielles.	98
Figure VI.11 :	Concentrations minimales inhibitrices des trois huiles essentielles, vis-à-vis des souches testées.	99
Figure VI.12 :	Type d'effet antimicrobien des trois huiles essentielles vis-à-vis des souches testées.	100
Figure VII.1 :	Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques	111
Figure VII.2 :	Forme libre et réduite du DPPH.	112
Figure VII.3 :	Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (R-H).	114
Figure VII.4 :	Matériel d'évaluation de l'activité antioxydante.	115
Figure VII.5 :	Courbe d'étalonnage (activité antioxydante).	116

- Figure VII.6 :** Virement de la couleur violette à la couleur jaune lors de la réduction du DPPH (influence de la concentration de l'antioxydant). 117
- Figure VII.7 :** Activité antiradicalaire des huiles essentielles d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis* (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD). 117
- Figure VII.8 :** Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD). 118

LISTE DES ABREVIATIONS

Symbole	Désignation
A :	Absorbance.
AAPH :	2,2'-azobis (2amidinopropane) dihydrochloride.
AGP :	Angiosperms Phylogeny Groupe.
ANOVA :	Analyse de variance.
ATCC:	American Type Culture Collection.
Bcc :	Effet bactéricide.
Bcs :	Effet bactériostatique.
BGP :	Bacille à Gram positif.
BHA :	Butylhydroxyanisole.
BHT :	Butylhydroxytoluène.
BLSE :	βeta-lactamase à spectre élargie (positive).
CGP :	Cocci à Gram Positif.
Cip :	Ciprofloxacine résistant.
CMI :	Concentration minimale inhibitrice.
CMIs :	Concentrations minimales inhibitrices.
cp :	Nombre de réplifications.
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse.
CPG/SM :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
CV :	Coefficient de variance.
DMSO :	Diméthylsulfoxyde.
DPPH :	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
d^{20} :	Densité relative à 20°C.
$d\theta$:	Densité à la température de mesure.
EC ₅₀ :	Equivalent concentration to 50% of reduced DPPH.

EOR :	Espèces oxygénées réactives.
Exp :	Expérience.
FIC :	Fractional inhibitory concentration.
FICI :	Fractional inhibitory concentration index.
FRAP :	Ferric Reducing Antioxidant Power.
GC/MS :	Gas chromatography/Mass Spectrometry.
HD :	Hydrodistillation.
HE :	Huile essentielle.
HEs :	Huiles essentielles.
I _A :	Indice d'acide.
IC ₅₀ :	Inhibitory concentration to 50% of reduced DPPH.
IK :	Indice de Kovats.
I _R :	Indice de réfraction.
I ₂₀ :	Indice de réfraction à 20°C.
I _θ :	Indice de réfraction à la température de mesure.
K :	Nombre de paramètres.
KpC ⁻ :	Klebsiella pneumoniae carbapenemase (négative).
KpC ⁺ :	Klebsiella pneumoniae carbapenemase (positive).
m _h :	Masse d'huile essentielle en gramme.
MH :	Mueller-Hinton.
Ms :	Masse du matériel végétal utilisé en gramme.
MSR :	Méthode de surfaces de réponses.
M' :	Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.
N :	Nombre des expériences.
NDA :	New Directions Aromatics.
NF :	Non Fermentaire.
N° :	Numéro.
OEB :	Oum el Bouaghi.

P :	Pression.
p -value :	Probabilités de la signification du risque.
R^2 :	Coefficient de détermination multiple.
RHE :	Rendement en huile essentielle.
SM :	Spectrométrie de masse.
SM-IE :	Spectrométrie de masse en mode impact électronique.
T :	Température.
T.A :	Type d'activité antibactérienne.
TBHQ :	Tert-butylhydroquinone.
TR :	Temps de rétention.
UV :	Ultra-violet.
VC :	Vitamine C.
V_{KOH} :	Volume d'hydroxyde de potassium en millilitre.
x_1 :	Diamètre des particules.
x_2 :	Débit de condensation.
x_3 :	Temps d'extraction.
Y :	Rendement théorique en huile essentielle (réponse).
\emptyset :	Diamètre d'inhibition.
θ :	Température de mesure.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis l'aube de l'humanité, les plantes permettent à l'homme non seulement de se nourrir, se vêtir, se loger, se chauffer, se parfumer ...mais aussi de maintenir son équilibre, soulager ses souffrances, préserver et soigner les maladies qui nuisent à sa santé. Par ailleurs, les plantes aromatiques et médicinales jouent un rôle économique considérable dans le secteur des industries de l'agroalimentaire, de la parfumerie, des cosmétiques, ...et de la pharmacie. En effet, les plantes représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent : alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, tanins, vitamines et huiles essentielles.

L'Algérie est riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines. Ces plantes sont, donc, la source de produits à forte valeur ajoutée. En effet, notre étude s'articule autour de la valorisation de ces espèces végétales. Le choix des espèces est basé sur leurs utilisations fréquentes dans les traditions locales médicinales. Ce qui justifier la revalorisation et la redécouverte du patrimoine national. De ce fait, nous nous sommes focalisés sur l'un de leurs métabolites secondaires : les huiles essentielles (HEs).

Les huiles essentielles sont l'un des principes actifs naturels de plantes aromatiques obtenues par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur à partir de plantes entières ou de certaines parties, telles que les fleurs, les fruits, les feuilles, les racines, les écorces et les graines [1]. La majorité des plantes médicinales ne contiennent qu'une petite quantité en huiles essentielles avec un rendement massique d'environ 1% [2]. Même avec ce rendement très faible elles présentent une importance industrielle et une valeur marchande importante grâce à leurs activités à large spectre, y compris l'activité antivirale, antimicrobienne, anti-inflammatoire et antioxydante [3,4]. En effet, l'amélioration du rendement et de la qualité des huiles essentielles devient une exigence primordiale.

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour l'extraction des huiles essentielles, à savoir : l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur, l'extraction par solvant, extraction par fluide supercritique, etc. dont la qualité et la quantité en huile essentielle dépendent des conditions et de la technique d'extraction utilisée [5,6]. Aujourd'hui, et sous le terme de « **Eco-extraction** », il n'y a pas lieu à l'extraction simple. Il est donc nécessaire de choisir la bonne technique d'extraction et d'optimiser ses paramètres afin d'obtenir un rendement élevé et une huile de bonne qualité. Parmi les techniques d'extraction, l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau sont les plus utilisées en raison de leur simplicité pratique

avec un rapport qualité d'huile et prix de processus intéressant, et sont peu néfastes pour l'environnement. Par conséquent, elles sont généralement préférées pour l'extraction d'huile essentielle à partir de graminées [7,8].

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'application de la méthodologie de surfaces de réponse (MSR) qui est basée sur exploitation des plans d'expériences, pour étudier d'une part le procédé d'hydrodistillation et, d'autre part, modéliser le rendement d'extraction afin de l'améliorer et obtenir une extraction efficace. L'application de cette méthode (MSR) nous permet de modéliser le phénomène étudié. Ceci est un moyen efficace pour optimiser le dispositif expérimental ou le processus étudié [9]. Cette méthode est utilisée dans divers domaines tels que les industries, l'agriculture, la médecine, l'analyse, l'électronique, etc. dont l'objectif principal est d'optimiser, développer et améliorer la réponse de système [10,11]. Elle présente plusieurs propriétés, tels que : l'optimisation du temps du procédé, de la quantité des réactifs et des produits [12].

Une fois les huiles essentielles obtenues en terme qualitatif et afin de prémunir la falsification des HEs et éviter les confusions entre les différentes espèces, la caractérisation des huiles essentielles est nécessaire par la détermination de leurs propriétés organoleptiques et physico-chimiques ainsi que l'identification de leurs constituants par analyses chimiques. En revanche, quel que soit le domaine d'utilisation des HEs (agroalimentaire, parfumerie, cosmétique et/ou industrie pharmaceutique), une parfaite connaissance de leurs propriétés est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Donc, une connaissance détaillée de leurs propriétés biologiques et pharmacologiques mènera à une utilisation appropriée.

Actuellement, plusieurs travaux ont envisagé l'utilisation de ces composés bioactifs comme alternatives aux multiples substances synthétiques. En effet, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des agents antioxydants synthétiques utilisés comme additifs dans l'industrie agro-alimentaire, sont à l'origine de l'engouement causé pour les plantes caractérisées par leurs propriétés biologiques. Le terme «biologique» comprend toutes les activités que ces mélanges des composés complexes exercent sur l'organisme.

Les différentes activités biologiques des HEs ne sont pas seulement évaluées à travers leur constituant principal (majoritaire), mais ces activités dépendent aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique [3]. De ce fait, et afin d'évaluer les propriétés biologiques de nos huiles essentielles, nous proposons d'étudier leur effet antimicrobien et antioxydant individuellement et en combinaison par association des huiles essentielles. Autrement dit, nous cherchons d'élargir le spectre de synergie entre leurs

différents constituants, et cette action nous laisse penser obtenir de bon résultats en termes d'activités biologiques.

L'objectif de notre étude est la valorisation de la biodiversité de notre région à travers l'étude des huiles essentielles de trois espèces végétales (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Salvia officinalis* L. et *Ruta chalepensis* L.). La valorisation de ces espèces englobe plusieurs aspects : la modélisation du rendement d'hydrodistillation des huiles essentielles, le criblage phytochimique et l'évaluation de leur activité antimicrobienne et antioxydante.

Notre manuscrit est scindé en trois parties englobant sept chapitres :

La première partie consacrée à l'étude bibliographique est divisée en deux chapitres :

- Le premier, donne un aperçu sur les huiles essentielles, leurs compositions et leurs domaines d'applications ;
- Le deuxième, est dédié à une description botanique générale des espèces étudiées (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Salvia officinalis* L. et *Ruta chalepensis* L.), leurs répartitions géographiques et leurs propriétés biologiques.

Dans la deuxième partie, nous détaillerons au troisième chapitre, le matériel utilisé et les méthodes suivies pour l'extraction, la caractérisation et l'analyse par CPG/SM afin de quantifier et d'identifier la composition chimique des huiles essentielles. Les résultats obtenus, ainsi que leur discussion et interprétation sont présentées dans le quatrième chapitre. Le cinquième chapitre sera réservé à la présentation de la méthodologie de surfaces de réponse appliquée, aux résultats de modélisation du rendement et à l'optimisation des paramètres d'hydrodistillation des huiles essentielles de trois espèces végétales étudiées.

Dans la troisième partie, nous avons axé notre recherche sur la mise en évidence *in vitro* de l'effet antimicrobien et antioxydant de nos huiles essentielles. En effet, le sixième chapitre aborde une étude de l'effet antimicrobien des HEs vis-à-vis d'une quinzaine de souches bactériennes. Le potentiel antioxydant des HEs a été évalué par le test du piégeage du radical libre DPPH et présenté dans le septième chapitre.

Finalement, le manuscrit est clos par une conclusion générale récapitulant l'essentiel des résultats obtenus au cours de notre étude et avec les perspectives attendues.

PREMIÈRE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I.1 Introduction

Depuis les temps les plus reculés, le monde végétal offre les éléments nécessaires à la survie de l'espèce humaine. En effet, les plantes demeurent la principale source de principes actifs ; les huiles essentielles, isolées à partir de plantes, constituent l'un de ces principes actifs les plus importants en raison de leurs multiples et diverses applications. Par conséquent, dans ce chapitre nous présentons les huiles essentielles en détail comme l'un des meilleurs éléments actifs des plantes aromatiques, à savoir : leur origine, compositions chimiques, techniques d'extraction, diverses activités biologiques et pharmacologiques, ainsi que leurs principaux domaines d'application.

I.2 Historique

Le terme huiles essentielles (HEs) dérive de « quinta essentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenus par distillation ; il signifie la fragrance et la quintessence de la plante [13].

Ces essences végétales sont largement distribuées dans le règne végétal et n'existent que chez les végétaux supérieurs. En effet, elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces, réparties en 60 familles botaniques, comme par exemple, chez les Lamiacées (lavande, basilic, menthe, ...), les Myrtacées (eucalyptus, ...), les Lauracées (cannelle et sassafras), ...et les Apiacées (coriandre, cumin, fenouil, persil, ...) [14]. Elles se trouvent dans tous les organes de la plante : racines, fruits, graines, fleurs, feuilles, écorces, bois, etc...

Les huiles essentielles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent regroupées en canaux ou en poches sécréteurs, et sont ensuite transportées dans les différentes parties de la plante, lors de la croissance de cette dernière [15].

Beaucoup de travaux sont réalisés dans ce sens, du fait de l'importance incontestable des huiles essentielles dans divers secteurs économiques, comme par exemple, l'industrie de la parfumerie, du cosmétique, de l'alimentaire, de la pharmaceutique et particulièrement, la branche de l'aromathérapie qui utilise leurs propriétés bactéricides et fongicides [16].

I.3 Définition

L'huile essentielle est un extrait pur et naturel provenant des plantes aromatiques [17,18]. Elle concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs [19]. Il faut ainsi une très grande quantité de plantes fraîches pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles [20].

Les huiles essentielles sont des mélanges de produits naturels de composition très complexe, odorantes, thermolabiles et très volatiles, issues de plantes aromatiques et médicinales, par hydrodistillation ou distillation à la vapeur à partir de plantes entières ou de certaines parties, à savoir : les fleurs, les fruits, les feuilles, les racines, les écorces et les graines [21].

Elles se différencient des huiles grasses, par leurs propriétés physiques et leur composition, du fait qu'elles se volatilisent à la chaleur et que leurs arômes sur le papier sont passagères [22].

Les huiles essentielles ont, à toute époque, occupé une place importante dans la vie quotidienne de l'homme qui les utilisait autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner.

I.4 Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des essences est complexe et peut varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et le mode d'extraction [23].

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices, et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs [24,25].

Ces essences peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois et/ou les graines [26].

Les HEs sont un mélange de constituants qui appartiennent à trois catégories de composés : terpéniques, aromatiques et diversés.

I.4.1 Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques ; ce sont des polymères de l'isoprène de formule brute (C₅H₈). Les huiles essentielles contiennent particulièrement des monoterpènes, des sesquiterpènes et peu souvent de diterpènes [27]. Les terpènes sont de structures très diverses (acycliques, monocycliques, bicycliques, ...) et la plupart contiennent des fonctions chimiques des matières organiques.

I.4.2 Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivent du phénylpropane (C₆-C₃). Ils sont moins fréquents que les terpènes. Cette classe comprend des composés odorants comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole. Ils sont fréquemment rencontrés dans les HES d'Apiacées (cumin, fenouil, persil, etc...) et sont caractéristiques de celles de la vanille, de l'estragon, du basilic, du clou de girofle [28].

I.4.3 Composés d'origine diverse

Ce sont des produits résultant de la transformation de molécules non volatiles entraînaibles par la vapeur d'eau. Il s'agit de composés issus de la dégradation d'acides gras et de terpènes. Les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînaibles lors de l'hydro distillation, carbure acide (C₃ à C₁₀), alcools, aldéhydes (octanal, décanal ...), esters, lactones, produits azotés ou soufrés [23].

I.5 Procédés d'extraction des huiles essentielles

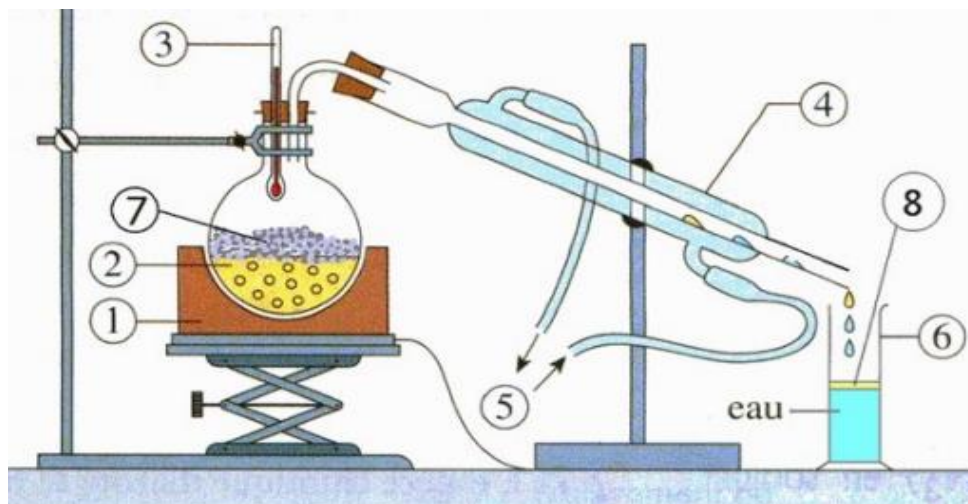
Le choix d'une technique d'exploitation des plantes aromatiques doit être adapté aux composés spécifiquement recherchés. La méthode dépend du type de produit souhaité, ou de la nature chimique des molécules recherchées [29], du rendement en huile, et à la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées [30]. Les huiles essentielles peuvent être obtenues tout simplement par hydrodistillation ou expression à froid, comme les agrumes [31]. De nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production ont été développées, comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression [32], et l'extraction assistée par ultrasons ou micro-ondes [33].

I.5.1 Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus anciennement employée pour extraire les huiles essentielles. Le procédé consiste à immerger le matériel végétal dans un récipient rempli d'une quantité adéquate d'eau. Le tout est ensuite porté à l'ébullition.

La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. L'huile essentielle (HE) forme avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique, et ensuite, les vapeurs sont condensées au moyen d'un réfrigérant. Dans un autre récipient de collecte, l'HE se sépare de l'eau par différence de densité. L'huile étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolysate (figure I.1).

Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques [34]. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe généralement utilisé pour l'extraction des HEs, est le Clevenger.



- | | |
|-------------------|--|
| 1- Chauffe ballon | 5- Entrée et sortie d'eau de refroidissement |
| 2- Ballon | 6- Eprouvette graduée |
| 3- Thermomètre | 7- Matière à extraire l'essence |
| 4- Réfrigérant | 8- Couche de l'huile essentielle |

Figure I.1 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation [34].

I.5.2 Entraînement à la vapeur d'eau

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau est une technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. Le principe de la distillation à la vapeur d'eau consiste à faire passer la vapeur d'eau à travers la plante à une température adéquate pour détruire les cellules végétales, libérer les molécules aromatiques et les entraîner dans un serpentin de refroidissement. Là, les vapeurs refroidies retournent à l'état liquide, formant un mélange « eau + huile essentielle ». Recueillies dans un essencier, l'huile essentielle et l'eau florale se séparent par simple différence de densité (figure I.2). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [35].

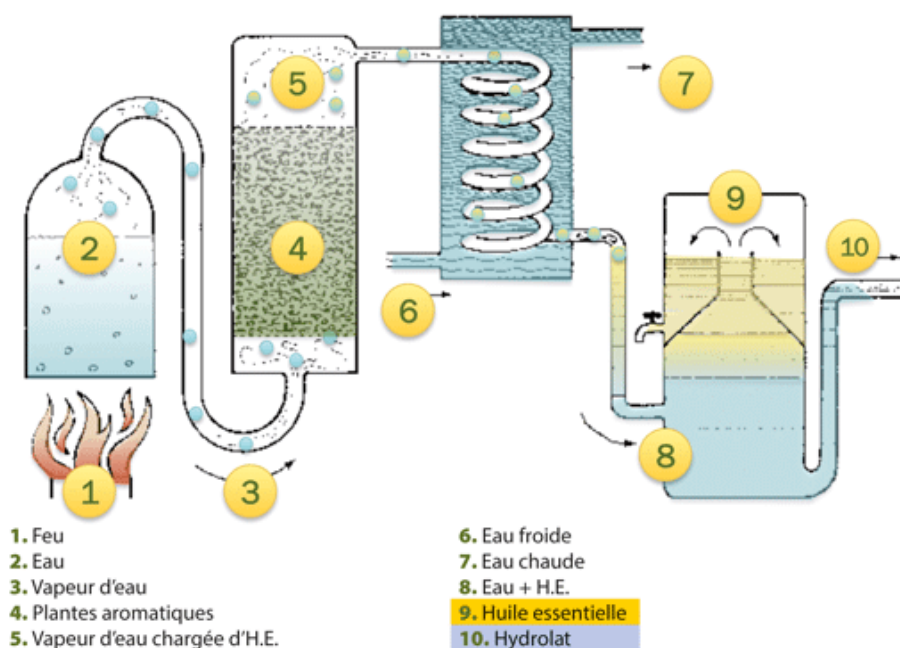


Figure I.2 : Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau.

I.5.3 Extraction par solvants volatils

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur, un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique (figure I.3).

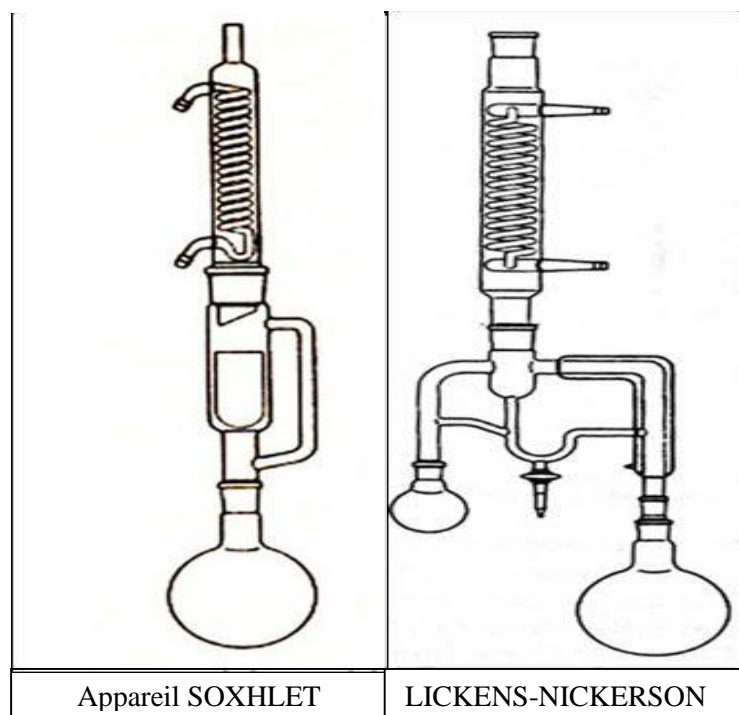


Figure I.3 : Montage d'extraction par solvant.

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone [36]. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, à la lumière ou à l'oxygène ; sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson.

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 bon nombre de composés non volatils, tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances [29].

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement. Pourtant, les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation, et cette technique évite l'action hydrolysant de l'eau ou de la vapeur d'eau.

I.5.4 Hydro-diffusion

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 de la matrice végétale (figure I.4).

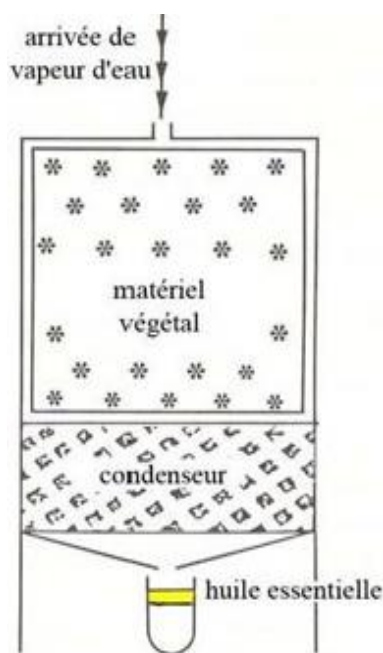


Figure I.4 : Montage d'hydro-diffusion.

L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide, donc moins dommageable pour les composés volatils. Cependant, l'huile essentielle obtenue avec ce procédé contient des composés non volatils, ce qui lui vaut une appellation spéciale : « essence de percolation » [37,38].

De plus, l'hydro-diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur.

I.5.5 Extraction assistée par micro-onde

L'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 (figure I.5). Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages, tels que le gain de temps d'extraction, l'utilisation de petites quantités de solvant et un rendement d'extraction élevé [39].

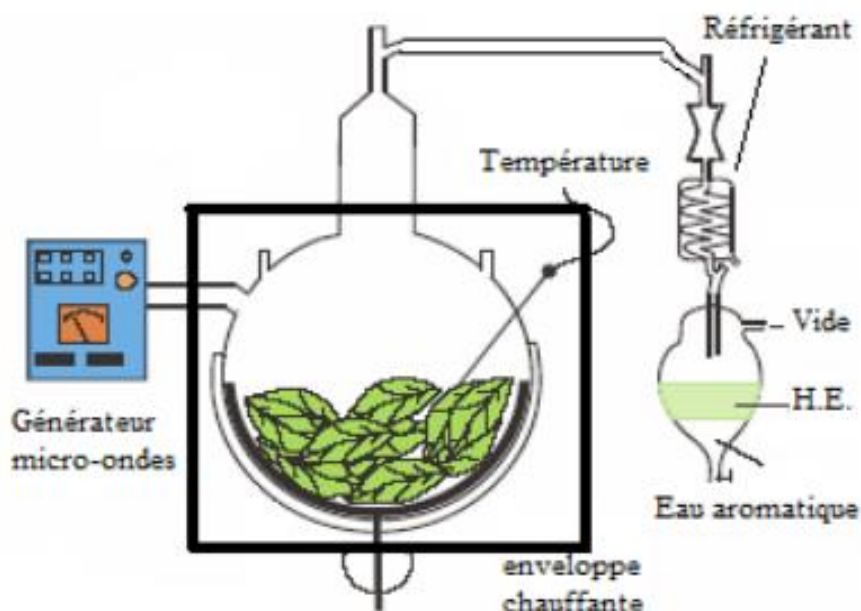


Figure I.5 : Hydrodistillation assistée par micro-ondes [34].

Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages, tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite.

I.5.6 Extraction par fluide supercritique

L'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 I.6). En outre, tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou l'isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction diminue. Au-delà du point critique ($P=73,8$ bars, $T=31,1^{\circ}\text{C}$), le CO_2 possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz, ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction [40].

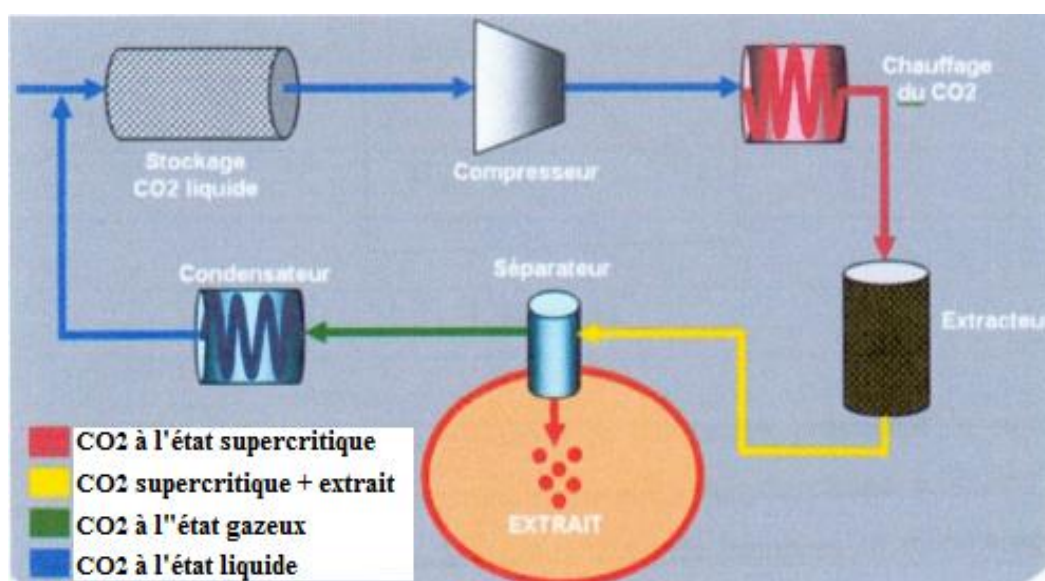


Figure I.6 : Schéma de la technique d'extraction par le CO_2 supercritique [41].

I.6 Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se conservent plusieurs années. Elles ont même tendance à se bonifier avec le temps. Il est recommandé de les stocker dans des flacons en verre sombre, de manière à les protéger de la lumière. Il faut aussi éviter les forts écarts de température et le contact avec l'air, bien refermer les flacons après usage car les arômes s'évaporent dans l'atmosphère. Tenir les flacons hors de portée des enfants, et les flacons doivent être stockés en position verticale, car en position horizontale, il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (les huiles ont une action corrosive sur le plastique). Dans ces conditions, les huiles essentielles se conservent plusieurs années.

I.7 Caractérisations des huiles essentielles

L'importance des huiles essentielles dans divers domaines (pharmacie, cosmétique, parfumerie...) nous amène à vérifier leur qualité. La caractérisation d'une huile consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) ;
- Déterminer ses indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide) ;
- Obtenir son profil chromatographique et une quantification relative des différents constituants.

I.8 Techniques d'analyses des huiles essentielles

Les propriétés physico-chimiques sont des indices propres et constants d'une substance pure. Elles sont toujours mesurées, mais elles sont indiquées à titre indicatif, car la complexité des huiles essentielles ne permet pas de détecter les fraudes uniquement grâce aux propriétés physico-chimiques. L'analyse physico-chimique reste indispensable et la mieux adaptée pour connaître la composition exacte d'une huile essentielle, et donc la plante de laquelle elle est extraite.

L'analyse quantitative et qualitative des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques et méthodes. Parmi ces méthodes, nous parlerons sur les méthodes micro-analytiques qui permettent l'identification et le dosage des produits même à l'état de traces. Ces méthodes consistent en l'utilisation des techniques de séparation et d'analyse des structures chimiques.

I.8.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Il s'agit d'une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilissables sans dégradation (non-thermolabiles). Son pouvoir de séparation dépasse celui de toutes les autres techniques, du moins pour les HEs (figure I.7).

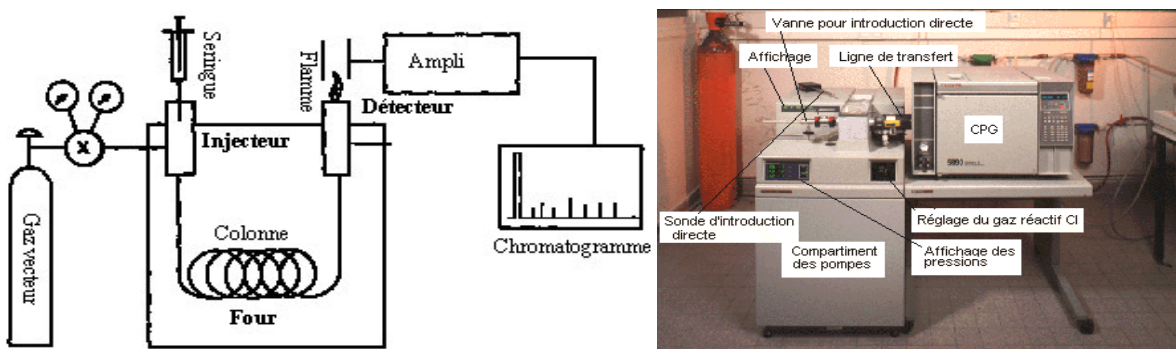


Figure I.7 : Appareillage pour une chromatographie en phase gazeuse.

La chromatographie en phase gazeuse chromatographie en phase gazeuse est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation qui augmentent plus son intérêt [42].

La technique a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants des mélanges très complexes contenant jusqu'à 200 composés [43]. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne qui renferme une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules [44].

I.8.2 Spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse (mass spectrometry ou MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse, et cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces (quelques nano grammes de mélange). Le principe de la spectrométrie de masse est le suivant [45] :

- Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé.
- Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques, puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés.
- Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur.
- L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

I.8.3 Analyse par couplage CPG/SM

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (figure I.8) est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier exactement de nombreuses substances. La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM.

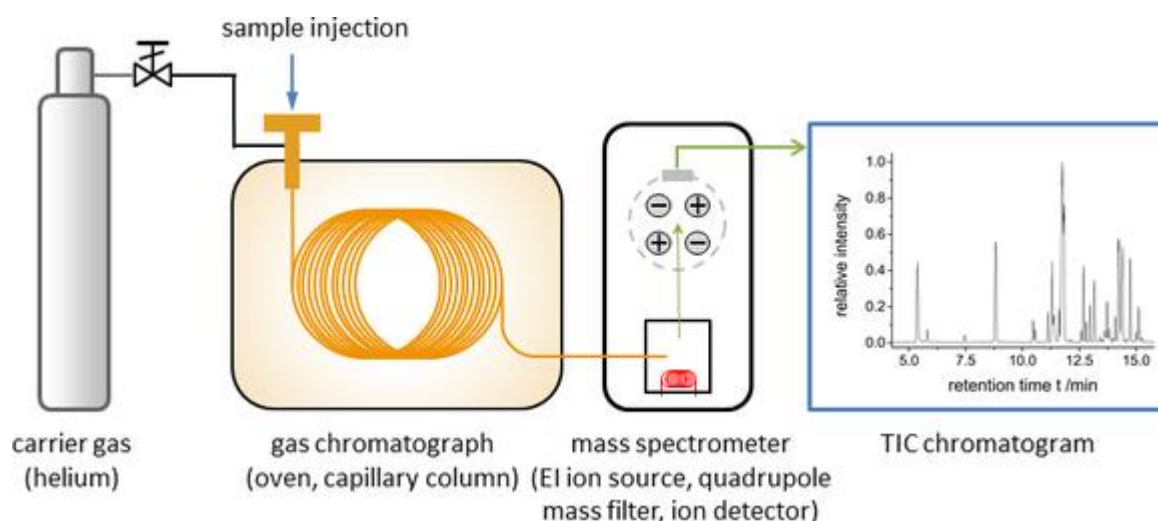


Figure I.8 : Schéma de couplage CPG/SM.

Le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est très employé dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé, et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation [46].

I.9 Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles, par leurs propriétés nombreuses et variées, sont utilisées dans différents secteurs : en parfumerie, en cosmétologie, en conserverie, en pâtisserie, dans les industries pharmaceutiques, dans la fabrication des mastics, des condiments et insecticides. Ceci a été prouvé par plusieurs études [47-50].

Depuis longtemps, les HEs sont utilisées en thérapeutique. Les applications thérapeutiques des HEs sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain [51]. L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables [52].

De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques : sirop, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telles que : la verveine, le thym, la menthe et autres. Elles ont une action anti-inflammatoire, antiseptique, antibactérienne, insecticide et antioxydante [53].

I.9.1 Activité antioxydante

Les antioxydants sont des substances capables de protéger l'organisme contre les effets du stress oxydatif [54]. On distingue trois types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques, les enzymes de réparation, et les antioxydants non enzymatiques. Les substances naturelles dont les huiles essentielles, sont considérés comme étant des antioxydants non enzymatiques.

L'activité antioxydante peut être primaire ou préventive (indirecte) ; cette dernière est capable de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène [55]. Par contre, les antioxydants à action directe sont capables de donner des électrons à l'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, empêchant ainsi la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs capables de passer leurs électrons aux espèces oxygénées réactives (EOR) et les éliminer [56].

Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques [57]. Les effets antioxydants des HEs et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyles dans leur structure chimique [58].

I.9.2 Activité antibactérienne

L'une des premières mises en évidences in vitro de l'activité antibactérienne des HEs date de la fin du XIX^{ème} siècle, lorsque Buchholtz a étudié la croissance des propriétés inhibitrices de l'huile des graines de carvi et de l'huile de thym en 1875. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XX^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser [59]. Dès lors, plusieurs recherches ont démontré le pouvoir antimicrobien de certaines essences sur une large palette de micro-organismes, y compris sur des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Néanmoins, le mécanisme d'action des HEs sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles. La variabilité des constituants des huiles suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action [60].

I.9.3 Activité antifongique

De plus en plus, les essences sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme arômes et également comme conservateurs alimentaires. Les huiles essentielles agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures. Comme pour l'effet antibactérien, le pouvoir antifongique est attribué à la présence de certaines fonctions chimiques dans la composition des HEs. Plusieurs travaux ont révélé que le pouvoir inhibiteur était essentiellement dû à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire [61].

I.10 Domaines d'utilisation des huiles essentielles

En raison de leurs diverses propriétés, les huiles essentielles sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels, comme en pharmacie par leurs pouvoirs antidiabétique, analgésique, apéritif, antispasmodique et antiseptique. En alimentation, par leur activité antioxydante et leur effet aromatisant. En parfumerie et en cosmétique, par leur propriété odoriférante.

I.10.1 Dans l'industrie agroalimentaire

Les huiles essentielles jouent un rôle capital dans l'aromatisation des aliments. En effet, elles donnent la saveur aux condiments (poivre, gingembre) et aux aromatisants (menthe, anis, oranger, thym, laurier). A faible dose, certaines substances ont un effet favorable sur la digestion, ce qui explique leur utilisation en liquoristerie (essence d'anis ou de badiane). Les huiles essentielles entrent donc, pour leurs diverses propriétés, dans la composition des arômes employés de manière fréquente aujourd'hui dans tous les produits alimentaires comme les plats cuisinés ou prêts à l'emploi [62].

Actuellement, l'industrie agroalimentaire utilise les huiles essentielles dans les préparations surgelées, non seulement pour rehausser le goût mais aussi pour empêcher les contaminations alimentaires qui se développent (effet antimicrobien).

I.10.2 En parfumerie et cosmétique

Les propriétés odoriférantes des huiles essentielles amènent à une consommation importante en parfumerie et en cosmétique. A la cosmétologie et le secteur des produits d'hygiène, on notera la présence des HEs dans les préparations dermo-pharmacologiques bains « calmant » ou « relaxant », et leur emploi dans les rouges à lèvres, les shampoings et les dentifrices. Ce sont surtout les huiles essentielles de lavande, de citron et de citronnelle qui sont utilisées. On notera qu'il y a une possibilité d'adsorption percutanée des composés terpéniques [63].

Actuellement, on préfère utiliser des produits naturels qui sont censés ne pas avoir d'effets secondaires graves par rapport aux produits de synthèse. En effet, il ne faut pas oublier que « naturel » ne signifie pas non toxique.

I.10.3 En pharmacie

Les huiles essentielles ont un grand intérêt en pharmacie et sont utilisées sous la forme de préparations galéniques, et dans la préparation d'infusion (verveine, thym, menthe, mélisse, fleurs d'orange...etc.). Toutefois, il faut souligner que la majorité des constituants de ces derniers sont lipophiles, c.-à-d., rapidement absorbés que ce soit par voie pulmonaire, par voie cutanée ou par voie digestive. Elles sont utilisées contre des bactéries variées ainsi que des champignons et levures. Citons les HEs du thym, du girofle, de la lavande et d'eucalyptus. Le thymol, constituant principal de l'huile essentielle de thym, est 20 fois plus antiseptique que le phénol. L'huile essentielle de *Melaleuca* a prouvé cliniquement son action antiseptique, antimicrobienne et antioxydante [64].

I.10.4 En diverses industries

Ce sont surtout des industries chimiques qui utilisent des isolats (substances pures isolées des huiles essentielles) comme matières premières pour la synthèse de principes actifs médicamenteux, de vitamines et de substances odorantes. Citons ainsi l'utilisation des isolats linalool, D-limonène dans des shampoings et sprays insecticides pour les chats et les chiens [65].

L'huile essentielle de *Melaleuca*, issue de la distillation de feuilles d'un arbre Australien, le « Australien tea-tree », a une forte utilisation dans ce pays. Elle est intégrée a des produits de lavage et utilisée comme ingrédient pour des préparations à but thérapeutique tels que le traitement d'allergies, de piqûres d'insectes, de boutons et des irritations. Elle est incorporée à des désodorisants et des antiparasitaires externes. Cette

huile a démontré des propriétés antibactériennes et antifongiques. Elle est également incorporée à des vaporisateurs pour inhalation et à des produits d'hygiène buccale [66].

I.11 Conclusion

Les différents aspects développés dans cette étude bibliographique sur les substances bioactives, notamment les huiles essentielles, indiquent que ces essences végétales diverses et multiples représentant un intérêt économique et jouent un rôle important dans les industries agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétologique. Ces substances de composition chimique complexe (composés terpéniques, aromatiques et autres...), peuvent être isolées à partir des différents organes de plantes (feuilles, fruits, fleurs, graines, etc.) par des techniques traditionnelles ou des procédés innovants. Il a été montré que les nouvelles méthodes sont beaucoup plus rentables du point de vue rendement et temps d'extraction.

CHAPITRE II : PRÉSENTATION DES ESPÈCES ÉTUDIÉES

II.1 Introduction

L'Algérie regorgeant d'une richesse floristique importante grâce à sa situation géographique. Les plantes aromatiques et médicinales ont l'aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires en réponse aux stress biotiques et abiotiques qu'ils peuvent subir. Ces métabolites secondaires possèdent diverses propriétés biologiques. Les huiles essentielles ou essences, font partie de ce groupe de métabolites avec les alcaloïdes et les phénols [67].

La recueille des d'informations générales sur les espèces végétales à étudier est nécessaire afin d'accomplir ce travail. En effet, ce chapitre est une revue bibliographique représentative des trois espèces retenues dans notre étude (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Salvia officinalis* L. et *Ruta chalepensis* L.).

II.2 Famille des Myrtacées et genre *Eucalyptus*

La famille des Myrtacées comprend environ 140 genres et plus de 3000 espèces dont un grand nombre est aromatique. Le principal genre est l'*Eucalyptus* (près de 600 espèces) [68].

L'aspect général des plantes de cette famille va du petit arbuste à l'arbre de très grande taille (jusqu'à 120 mètres de haut pour certains eucalyptus). Les espèces sont souvent productrices d'huiles essentielles. Leur distribution géographique est essentiellement dans les régions équatoriales, subtropicales, tropicales voire tempérées. Les espèces de cette famille présentent un large éventail d'habitats notamment le bassin méditerranéen, l'Amérique du sud et l'Australie où la partie tempérée de ce continent abrite une grande diversité d'espèces.

Les *Eucalyptus* sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100m de hauteur, originaire d'Australie ; l'*Eucalyptus* fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen [69]. La plupart des *Eucalyptus* ont des feuilles persistantes comme les autres membres de la famille des Myrtacées. Les feuilles d'*Eucalyptus* sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre.

De nombreux *Eucalyptus* sont utilisés dans le monde afin de produire du bois de service : poteaux, bois de mine, bois de feu, perches et bois de construction. Ainsi, plusieurs pays ont rapidement intégré les usages médicaux des feuilles d'*Eucalyptus* dans leur pharmacopée : Chine, Inde, Sri Lanka, Afrique du Sud, Île de la Réunion, Europe...etc. [70].

II.2.1 *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.

L'introduction des *Eucalyptus* en Algérie fut par les français en 1860. L'espèce pionnière semble être l'*E. camaldulensis*, mais d'autres espèces furent introduites dans des placettes d'essais notamment à Reghaia, Bouchaoui et El-Alia dans la région d'Alger [71].

II.2.1.1 Classification systématique

Le nom le plus connue de cette espèce en Algérie est le "Calitouss". La classification scientifique réalisée par l'AGP (Angiosperms Phylogeny Groupe) sur le genre *Eucalyptus* a permis de déterminer la systématique suivante [72] :

Règne :	<i>Plantae</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida – Dicotylédones</i>
Sous –classe :	<i>Rosidae</i>
Ordre :	<i>Myrtales</i>
Famille :	<i>Myrtaceae</i>
Genre :	<i>Eucalyptus</i>
Espèce :	<i>Camaldulensis</i>
Nom botanique :	<i>Eucalyptus Camaldulensis</i> Dehnh.

II.2.1.2 Répartition géographique et description botanique

E. camaldulensis est une plante de la famille des Myrtacées. Généralement appelée "gomme de la rivière rouge", *E. camaldulensis* est un arbre du genre *Eucalyptus*. C'est une espèce de plantation dans de nombreuses parties du monde, mais il est originaire d'Autriche où il est répandu surtout au bord de cours d'eau navigables. L'arbre d'*E. camaldulensis* est d'environ 24-40m de haut avec un tronc robuste, les feuilles sont persistantes, l'écorce est lisse, gris blanc ou chamois (figure II.1) [73].



Figure II.1 : *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. [74].

II.2.1.3 Utilisations traditionnelles

L'*E. camaldulensis* est très utilisé par notre population dans le rhume et les états grippaux. L'infusion (feuilles) d'*E. camaldulensis* est utilisée pour le soulagement des courbatures, des douleurs, des maux de tête sévères et les morsures de serpent [75]. La plante est également soupçonnée d'être efficace dans la gestion de l'hypertension artérielle [76]. Elle a également été rapportée pour avoir des propriétés antibactériennes et antifongiques [77].

La gomme de cette plante bouillie avec de l'eau et du sucre, devenue une boisson liquide, est utilisée pour traiter les affections pulmonaires, comme une anesthésie générale et pour les maux de dents [73].

Une infusion de l'écorce est utilisée pour le lavage de certains yeux, l'ophtalmie et elle est efficace dans le traitement de la diarrhée [73].

Au Nigeria, et dans certaines parties de l'Afrique sub-saharienne, l'usage médicinale d'*E. camaldulensis* comprennent l'utilisation de son huile comme un remède contre la toux et le froid [73].

II.2.1.4 Composition chimique de l'huile essentielle

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* issue de l'hydrodistillation par Cruz et ses collaborateurs [78], a révélé le 1,8-cinéole (43%), l'alpha-pinène (5.5%), le bêta-pinène (3.4%), le p-cymène (5.2%), le terpinène-4-ol (3.1%) et le globulol (4.1%) comme étant les composés majoritaires.

Le 1,8-cinéole (45.71%) et le p-cymène (17.14%) ont été identifiés comme étant les principaux composés de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* issue de l'hydrodistillation, et le 8,14-cedranoxide (43.79%) et l'elémol (6.3%), les composés majoritaires de la même huile essentielle obtenue par extraction supercritique de dioxyde de carbone [79].

En outre, il est rapporté que les principaux composants de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* sont : éthanol (25.36%), l'eucalyptol (13.73%), le β -caryophyllène (11.55%) et le carvacrol (9.05%) [80].

II.2.1.5 Propriétés biologiques

L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* a une activité anti-acétylcholinestérase avec une concentration inhibitrice (IC₅₀) de 18,98 μ g/ml [81]. Elle présente un excellent effet inhibiteur à la fois sur les larves de *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* [82] et une activité antiparasitaire [83], en particulier sur les Trypanosomes Bruce et les Trypanosomes Evans [84].

D'autres études ont également montré que cette huile essentielle est insecticide, [85-88] mais aussi antimicrobienne *in vitro* et *in vivo* [89].

II.3 Famille des Lamiacées et genre *Salvia*

La famille des lamiacées connue également sous le nom des labiées, environ 258 genres pour 6900 espèces plus ou moins cosmopolites ; mais dont la plupart se concentrent dans le bassin méditerranéen, tels que le thym, la lavande et le romarin [90]. Elle est divisée en deux principales sous-familles : les Stachyoideae et les Ocimoideae.

Les lamiacées sont des herbacées ayant la consistance et la couleur de l'herbe, parfois sous-arbrisseaux ou ligneuses [90]. Une grande partie de ces plantes sont aromatiques riches en huile essentielle, d'où leur intérêt économique et médicinal. Entre autres, un grand nombre de genres de la famille des Lamiacées sont des sources de terpénoïdes, flavonoïdes et iridiodés glycosylés.

La *Salvia* est le plus grand genre de cette famille et comprend près de 900 espèces [91]. Les plantes de ce genre poussent partout dans le monde et l'espèce de *S. officinalis* L. est originaire du Moyen-Orient et de la Méditerranée [92].

II.3.1 *Salvia officinalis* L.

II.3.1.1 Classification systématique

En Algérie, elle est connue sous le nom vernaculaire "Mirmia", selon Cronquist (1981) [93] *S. officinalis* appartient au :

Règne :	<i>Plantae</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida – Dicotylédones</i>
Sous –classe :	<i>Asteridae</i>
Ordre :	<i>Lamiales</i>
Famille :	<i>Lamiaceae</i>
Genre :	<i>Salvia</i>
Espèce :	<i>Officinalis</i>
Nom botanique :	<i>Salvia officinalis</i> L.

II.3.1.2 Répartition géographique et description botanique

S. officinalis est originaire du pourtour du bassin méditerranéen. Elle pousse dans les zones tempérées ; son habitat type se situe dans les pelouses basophiles méso-méditerranéennes, méso-xérophiles, et elle est introduite de l'Asie occidentale [94].

S. officinalis est un sous arbrisseau buissonnant et formant une touffe pouvant atteindre 80cm de haut. Les feuilles sont opposées, pétiolées à la base, de 3 à 10cm de long sur 3cm de large. Elles sont de couleur vert grisâtre, d'aspect velouté ; les bords du limbe sont légèrement crénelés. Les fleurs, de couleur bleu violacé, sont groupées par 3 à 5 (figure II.2) [95].



Figure II.2 : *Salvia officinalis* L. [92].

II.3.1.3 Utilisations traditionnelles

S. officinalis est l'une des plantes les plus utilisées, vu ses propriétés importantes ; elle est considérée comme un stimulant pour les gens anémiques, aussi pour les personnes stressées et déprimées, et conseillée pour les étudiants en période d'examen. Pour usage externe, elle est appliquée en gargarisme contre les inflammations de la bouche, les abcès, et aussi pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies [94].

Les infusions de la sauge sont appliquées pour le traitement de plusieurs maladies de la circulation sanguine et les troubles digestifs ainsi que les problèmes du système nerveux [96]. Cette herbe aromatique est employée dans la cuisine, pour son goût puissant, légèrement amer et camphré [97].

II.3.1.4 Composition chimique de l'huile essentielle

Plusieurs travaux ont été menés sur la composition chimique de l'HE de *S. officinalis*. D'après Kahina (2013) [98], généralement toutes les huiles issues de cette plante sont constituées principalement de : Cétones terpéniques (cis-thujone 28.82%, camphre 15.07% et trans-thujone 3.78%) ; Monoterpènes (α-pinène 6.45%, camphène 5.73%, limonène 5.05%, myrcène 2.86%, *p*-cymène 1.99%, β-pinène 1.58% et ζ-terpinène 1.50%) ; des Oxydes terpéniques (1,8-cinéole 8.44%), des Monoterpénols (bornéol 2.12%, linalol 1.36%, terpinèn-4-ol 0.65% et α-terpinéol 0.30%), des Esters terpéniques (acétate de bornyle 1.51%) et de Sesquiterpènes (α-humulène 4.21%, β-caryophyllène 2.97%) ; Sesquiterpénols (viridiflorol 0.65%).

II.3.1.5 Propriétés biologiques

S. officinalis est largement utilisée dans la médecine populaire pour son huile essentielle riche en composés biologiquement actifs offrant des bénéfices à cette plante et jouant un rôle important dans le traitement de diverses maladies.

Des études antérieures ont démontré que les extraits de sauge avaient des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antidiabétiques, anticancéreux, antimutagènes, virucides, cytotoxiques et anti-inflammatoires [99-102].

Toutes ces propriétés seront très efficaces dans le développement de nouveaux médicaments naturels pour prévenir, contrôler et traiter de nombreux problèmes mineurs de santé, ainsi que de plus graves problèmes, comme le diabète, la maladie d'Alzheimer et le cancer [103].

II.4 Famille des Rutacées et genre *Ruta*

La famille des Rutacées a été décrite initialement en 1782 par Durande, puis par De Jussieu en 1789. Elle comprend près de 1500 espèces regroupées en 150 genres environ. Cette famille est plus ou moins cosmopolite, avec une forte concentration dans la zone intertropicale et dans les régions tempérées de l'hémisphère Sud (Australie, Afrique du Sud) [104].

Les Rutacées sont caractérisées par des poches sécrétrices d'un type qui n'est rencontré dans aucune autre famille dites schizolysigènes [105]. Ces poches, d'origine épidermique, sont toujours superficielles et libèrent leur contenu, une huile essentielle, à la moindre pression.

Le genre *Ruta* comprend 8 espèces d'arbustes, de sous-arbrisseaux et de vivaces herbacées à souche ligneuse, caducs ou persistants, vivant dans les lieux secs et rocailleux,

de la région méditerranéenne, et du nord-est de l'Afrique jusqu'au sud-ouest de l'Asie. Les fleurs et le feuillage aromatiques, sont le principal attrait des rues. Les feuilles sont alternes, parfois opposées, ovales, larges, arrondies et pennatiséquées ou pennées. Les fleurs, jaunes, fimbriées ou dentées, à quatre ou cinq pétales, s'épanouissent en cymes terminales [106].

Le genre *Ruta* est représenté en Algérie par 4 espèces : *R. montana* ; *R. chalepensis* ; *R. angustifolia* et *R. latifolia*. Les espèces diffèrent entre elles par l'allure des feuilles, de la grappe fructifère, des bractées et des sépales [107,108].

II.4.1 *Ruta chalepensis* L.

II.4.1.1 Classification systématique

Cette espèce végétale est connue en Algérie sous le nom vernaculaire "Fidjel". Cette plante appartient à la systématique suivante [109-111] :

Règne :	<i>Plantae</i>
Division :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida – Dicotylédones</i>
Sous –classe :	<i>Rosidae</i>
Ordre :	<i>Rutales</i>
Famille :	<i>Rutaceae</i>
Genre :	<i>Ruta</i>
Espèce :	<i>Chalepensis</i>
Nom botanique :	<i>Ruta chalepensis</i> L.

II.4.1.2 Répartition géographique et description botanique

R. chalepensis est originaire de la région méditerranéenne, et du Nord-Est de l'Afrique jusqu'au Sud-Ouest de l'Asie. Cette espèce pousse spontanément dans les rochers, les lieux arides, les vieux murs, les collines sèches et elle est abondante dans les terrains calcaires des régions méditerranéennes [108]. Elle est présente dans les Rocailles, pâturages et pelouses du Tell. En Algérie, elle est rencontrée dans les zones montagneuses de l'intérieur sur l'Atlas Saharien et les pelouses arides [112].

Ruta chalepensis est une plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1m [113]. Les feuilles de 6 à 12 cm de long, sont aromatiques, ovales, larges, pennatiséquées, bleu-vert et elles présentent de nombreux lobes oblongs, lancéolés ou aborales. En été, s'épanouissent des fleurs de 1 à 2cm de diamètre, en coupe, de couleur

jaune foncé, portant quatre ou cinq pétales frangés de longs poils. Elles sont réunies en cymes lâches (figure II.3) [106].



Figure II.3 : *Ruta chalepensis* L.

II.4.1.3 Utilisations traditionnelles

En Algérie, *R. chalepensis* est très utilisée à des fins diverses : Fébrifuge, antivenimeux local, contre les nausées et les vomissements, dans les constipations, dans le paludisme, pour soigner les anémies [114], le rhumatisme, contre les douleurs gastriques, les vers intestinaux [113], dans les accouchements difficiles, les maux des yeux et des oreilles, dans l'asthme, les névroses [114].

La rue est une plante ornementale des jardins, elle est considérée comme mellifère et sa présence éloigne les vipères. Elle repousse les insectes [115] et est utilisée contre la gale et les parasites de la tête [110].

R. chalepensis est antispasmodique, calme les douleurs, les spasmes ainsi que les troubles d'origine nerveuse. Traditionnellement, elle était utilisée dans les cas d'épilepsie et de convulsions. Elle est sédative et intervient en cas de nervosisme et d'hystérie. Les feuilles fraîches écrasées en application externe soulagent la sciatique. Les feuilles, utilisées à petites doses, sont vermifuges. Aussi, elles ont des vertus toniques, stimulantes et elles sont souvent utilisées comme sternutatoires (provoquent des éternuements) [98].

Le feuillage a parfois un usage médicinal. Ne consommer aucune partie de la rue, la plante entière étant toxique. Eviter de toucher le feuillage, sous peine de provoquer une réaction cutanée, se traduisant par des taches brunes (indolores) qui foncent au soleil [116].

II.4.1.4 Composition chimique de l'huile essentielle

La composition chimique des huiles essentielles varie avec le lieu de récolte. Il a été rapporté que le 2-undécanone est le constituant majoritaire de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* de provenance de l'Argentine (38.1%), de la Turquie (66.5%), de l'Iran (52.5%) et de l'Inde (4.3-67.8%), quant à l'HE de l'Arabie Saoudite, le pourcentage en 2-undécanone est inférieur ou égal à 4.5%. Cependant, l'huile essentielle de provenance d'Italie contient deux composants majoritaires : le 2-nonanone (49.9 %) et le 2-undécanone (30.0 %) [117]. Donc, les composés les plus rencontrés pour cette huile essentielle sont le 2-nonanone et le 2-undécanone [118].

II.4.1.5 Propriétés biologiques

R. chalepensis s'est largement répandue dans le monde à cause de ses propriétés ornementales et médicinales. L'HE de *R. chalepensis* possède des propriétés abortives. Selon certains auteurs, les propriétés pharmacologiques de l'HE de *R. chalepensis* sont liées à la présence de furocoumarines : éther méthylique de l'ombelliférone, xanthotoxine [98].

Toutes les sources de l'ethnobotanique fondamentale ont été examinées pour l'information au sujet des usages et de l'importance de cette plante. Les applications les plus fréquentes sont en rapport avec les vertus médicinales, vétérinaires ou protectrices. Les résultats montrent une haute correspondance des usages médicaux principaux liées aux propriétés pharmaceutiques de la plante, à savoir : emménagogue, abortifacient digestif, améliorer la circulation du sang, traiter le rhumatisme, traiter des infections, des inflammations et pour soulager la douleur [119].

L'huile essentielle est stupéfiante : c'est elle qui détermine une légère phase d'excitation puis rapidement une ivresse lourde avec obtusion sensitivo-sensorielle, tristesse et somnolence. À très fortes doses, elle est véritablement toxique. Le principe toxique est la méthylnonylcétone [114].

II.5 Conclusion

L'étude bibliographique menée sur les trois espèces végétales retenues nous a permis de bien connaître leurs aspects botaniques tels que la description morphologique et la répartition géographique, afin de les ramener facilement. Ainsi, la connaissance de leurs aspects biologiques, qui vont nous permettra de comprendre les effets de chaque espèce végétale et d'orienter nos tests suivant la bonne direction. Cette étude montre que les trois espèces végétales (*Eucalyptus camaldulensis*, *Salvia officinalis* et *Ruta chalepensis*) sont

réparties et très utilisées dans la médecine traditionnelle dans le monde et particulièrement en Algérie. Il ressort de cette étude que ces espèces se ressemblent plusieurs propriétés biologiques et pharmacologiques, à savoir : l'effet antioxydant, antimicrobien, antalgique, anti-inflammatoire...etc.

**DEUXIÈME PARTIE : ECO-EXTRACTION PAR
HYDRODISTILLATION : MISE AU POINT,
CARACTÉRISATION ET MODÉLISATION**

CHAPITRE III : PROTOCOLE OPÉRATOIRE

III.1 Introduction

La médecine traditionnelle demeure le recours principal pour une grande majorité des populations pour résoudre leurs différents problèmes notamment de santé. Les plantes médicinales et aromatiques constituent une grande partie de ressources des principes actifs utilisés dans la phytothérapie. En effet, ce travail consiste principalement à la valorisation des plantes médicinales qui poussent dans la région semi-aride de l'Est Algérien.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les zones de prélèvement des espèces végétales à étudier (*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis*) ainsi que les étapes de préparation des matières végétales jusqu'à l'extraction et l'obtention des huiles essentielles, ainsi que les différentes techniques adoptées pour la caractérisation et l'analyse chimique des huiles essentielles extraites.

III.2 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre étude est représenté par trois espèces végétales à savoir : *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Salvia officinalis* L. et *Ruta chalepensis* L. (figure III.1). Ces espèces végétales poussent dans la région d'Oum el Bouaghi (OEB) et très utilisées par la population locale pour ses soins.



Figure III.1 : Espèces végétales retenues.

III.2.1 Choix du matériel végétal

Dans cette étude, le choix des espèces végétales repose sur plusieurs critères tels que : leur abondance, leurs propriétés thérapeutiques et qualités médicinales reconnues depuis longtemps chez la population, le manque de travaux sur ces espèces, surtout l'*Eucalyptus camaldulensis* et *Ruta chalepensis* au niveau national et notamment au niveau de notre région d'OEB.

Dans cette étude, nous donnerons une nouvelle vie à ces espèces en procédant à l'optimisation des paramètres d'extraction et l'augmentation du rendement en HE. Ainsi, l'étude de leur synergie en l'associant pour améliorer leurs propriétés biologiques pour des nouvelles application.

III.2.2 Zones d'échantillonnages

Sur la base de renseignement des herboristes locaux, nous avons retenu deux régions géographiques à l'Est-Algérien, ayant presque le même relief avec un climat semi-aride et s'étalant sur deux zones (figure III.2) : Wilaya d'Oum el Bouaghi et la Wilaya de Sétif.

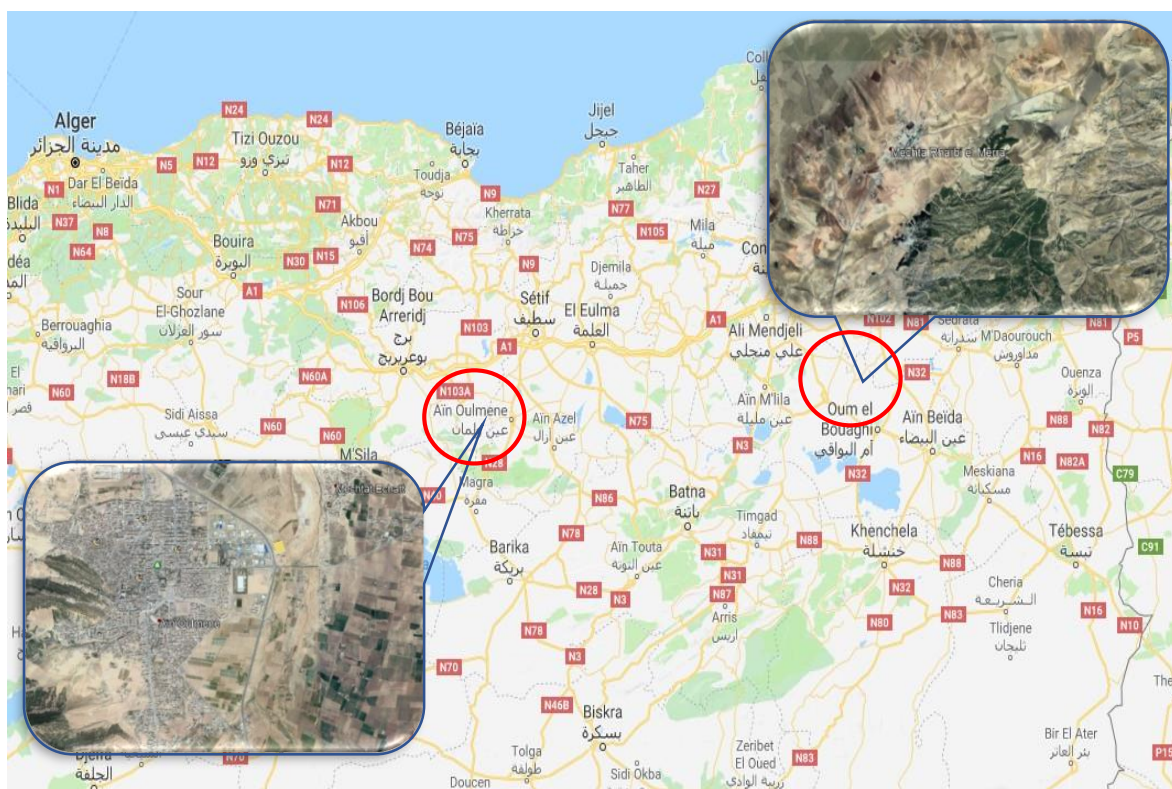


Figure III.2 : Situation géographique des régions d'étude et localisation de zones de prélèvement (Google Earth).

Notre échantillon de *Salvia officinalis* a été recueilli à partir des plantes cultivées dans la région de "Ain Oualmen" à 33Km de Sétif dont les coordonnées géographiques sont les suivantes : latitude 35°55'24'' Nord, longitude 5°17'51'' Est, et une altitude de 925m.

Les deux autres espèces (*Eucalyptus camaldulensis* et *Ruta chalepensis*) ont été ramenées de la wilaya d'Oum el Bouaghi, exactement au niveau de la daïra de "Ain Dais" dont les coordonnées géographiques sont : latitude 36°03'34'' Nord, longitude 6°58'30'' Est et une altitude de 841m.

III.2.3 Récolte des espèces végétales

Nous avons récolté les parties aériennes de *S. officinalis* au printemps 2016. Les feuilles d'*E. camaldulensis* et les parties aériennes de *R. chalepensis* ont été récoltées au mois de décembre de la même année.

III.2.4 Préparation du matériel végétal

Les différentes étapes de préparation des échantillons aux expériences se présentent de la manière suivante :

- **Mondation** : pour débarrasser la matière première des parties inutiles afin de garder seulement les parties aériennes valables de la plante.
- **Séchage** : Le séchage consiste à éliminer progressivement l'humidité des plantes. Une plante humide devient une proie facile des bactéries et des champignons, qui l'attaquent et provoquent une altération de ses principes actifs. C'est pourquoi, après chaque récolte, le matériel végétal est nettoyé (débarrassé des impuretés) ensuite laissé sécher. Nos spécimens fraîchement récoltés, ont été séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré (figure III.3).



Figure III.3 : Echantillons après séchage.

Les échantillons ont été disposés par fines couches et remués de temps à autre. Après séchage, ces espèces ont été récupérées dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction des huiles essentielles.

- **Broyage** : le broyage a été effectué à l'aide d'un moulin à café de 15 à 20 secondes jusqu'à l'obtention d'une poudre (*cas d'E. camaldulensis*) (figure III.4).



Figure III.4 : Echantillon après broyage (*cas d'E. camaldulensis*).

- **Tamissage** : la poudre obtenue après broyage a été soumise à un tamisage à travers un système de tamis vibrant (figure III.5) qui sert à séparer les particules selon les tailles désirées (*cas d'E. camaldulensis*) (figure III.6).



Figure III.5 : Tamiseur vibrant ordinaire (GB/T600 3.1-1997).



Figure III.6 : Echantillons après tamisage (*cas d'E. camaldulensis*).

III.3 Extraction des huiles essentielles

III.3.1 Choix de la méthode d'extraction

Il existe plusieurs procédés pour l'extraction des huiles essentielles et le choix de la méthode reste pertinent surtout par la qualité des huiles extraites. Dans le but d'obtenir des HEs facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse, et afin d'éviter l'apparition des produits indésirables hydrosolubles dans l'huile recueillie, la méthode de choix reste l'hydrodistillation vue qu'elle est la plus employée à l'échelle industrielle. C'est aussi la plus simple et la moins coûteuse avec une reproductibilité facilement contrôlable [120].

III.3.2 Dispositif expérimental

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation, à l'aide d'un appareillage de type *Clevenger* (figure III.7) à la pression atmosphérique.



Figure III.7 : Montage de l'hydrodistillation mise en place (*Clevenger*).

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1 : Thermomètre | 5 : Colonne de réfrigération |
| 2 : Colonne de distillation | 6 : Ampoule à décanter |
| 3 : Ballon | 7 : Réservoir d'eau |
| 4 : Chauffe ballon | 8 : Pompe à eau |

III.3.3 Mode opératoire

Le principe de la technique d'hydrodistillation se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. Cent grammes (100g) de matériel végétal sec sont placés dans un ballon en verre (2L). On y ajoute une quantité suffisante d'eau de robinet (1500ml) sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition et le phénomène de stagnation. Ensuite, le mélange est porté à l'ébullition à l'aide d'une chauffe ballon avec réglage du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction.

Les vapeurs chargées de l'huile essentielle passent à travers le tube vertical (colonne de rectification), puis dans la colonne de refroidissement où aura lieu la condensation. Le distillat (huile + eau) est récupéré dans une ampoule à décanter pour la séparation du mélange par différence de densité. Le temps d'extraction est mesuré à partir de l'obtention de la première goutte de distillat dans l'ampoule.

III.3.4 Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et donné par la formule suivante :

$$\text{RHE}(\%) = \frac{M'}{M_s} \times 100$$

RHE : rendement en huile essentielle.

M' : masse de l'huile essentielle obtenue en gramme.

M_s : masse de la matière végétale utilisée en gramme.

III.3.5 Etude de la cinétique d'hydrodistillation

L'étude de la cinétique d'extraction a pour but de déterminer le temps nécessaire au bout duquel il n'est plus rentable de poursuivre l'extraction qui est qualifié par le rendement maximum. La cinétique est donc le suivi de l'évolution de la quantité d'huile essentielle extraite en fonction du temps. Son illustration lors de l'extraction de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis* par hydrodistillation, se traduit par le suivi de la variation de la masse des huiles essentielles en fonction du temps et ce jusqu'à l'extraction de la quasi-totalité de l'huile essentielle.

III.3.6 Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles récupérées ont été séchées avec du chlorure de calcium (CaCl_2) pour éliminer toutes traces d'eau. La conservation de ces essences exige certaines précautions indispensables. L'instabilité relative des molécules constitutives de ces huiles rend leur conservation délicate [121]. Trois facteurs interviennent dans l'altération des huiles essentielles :

1. La température : obligation du stockage à basse température (entre 4°C et 8°C).
2. La lumière : stocker dans l'obscurité et dans des flacons opaques, bruns de préférence.
3. L'oxygène : les flacons doivent être hermétiquement fermés.

Dans ces conditions la durée de conservation admise est de 2 à 5 ans.

III.4 Etude analytique des huiles essentielles

Afin d'évaluer la qualité et la composition de nos extraits, nous avons réalisé une étude analytique en déterminant d'abord les caractéristiques organoleptiques et les propriétés physico-chimiques et enfin en procédant à une analyse chimique.

III.4.1 Caractéristiques organoleptiques

L'analyse sensorielle est une source d'information essentielle qui reflète les attentes et les tendances des consommateurs. L'analyse a été effectuée en observant et en inhalant directement l'huile essentielle. L'évaluation des propriétés organoleptiques constitue généralement une partie des études visant à analyser les facteurs qui affectent la qualité des HEs. La couleur des huiles essentielles est un paramètre très important pour certaines applications et elle est déterminée directement par la vue.

III.4.2 Propriétés physico-chimiques

Ces propriétés constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité des huiles essentielles [122,123]. Nous avons conduit nos essais selon des protocoles reconnus dans la littérature [124].

A) Densité relative à 20°C (d^{20})

C'est le rapport du poids d'un certain volume d'huile, au poids du même volume d'eau distillée à la température 20°C . La masse des huiles essentielles a été déterminée par la pesée de 1ml à l'aide d'une balance électronique de précision à une température bien définie.

Pour déterminer la densité de notre essence à 20°C on utilise l'équation suivante [70] :

$$d^{20} = d\theta + 0.00068 * (\theta - 20^{\circ}\text{C})$$

Où :

d^{20} = Densité relative à 20°C.

$d\theta$ = Densité à la température de mesure.

θ = Température de mesure.

0,00068 : Constante de variation de la densité quand la température varie de 1°C.

B) Indice de réfraction (IR)

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux, de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante [121].

Utiliser un réfractomètre permet la lecture directe d'indices de réfraction dont les valeurs sont comprises entre 1.300 et 1.700. L'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20°C, une valeur de 1.333, pour l'eau distillée. L'appareil utilisé pour mesurer l'indice de réfraction de nos huiles essentielles est le réfractomètre d'Abbe qui a un usage assez recommandé (figure III.8).



Figure III.8 : Réfractomètre type ABBE.

Après nettoyage de l'appareil, on place 2 ou 3 gouttes d'huile essentielle au milieu du prisme. Ensuite, on regarde dans l'oculaire et la mesure se fait en tournant les boutons de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule. Finalement, on note la valeur de l'indice et la température de mesure.

Une formule empirique permet d'évaluer l'indice de réfraction d'un liquide à 20°C quand on l'a mesuré à une température légèrement différente [70] :

$$I_{20} = I_{\theta} + 0.00045 * (\theta - 20^{\circ}\text{C})$$

Où :

I_{20} : indice de réfraction à 20°C.

I_{θ} : indice de réfraction à la température de mesure.

θ : température de mesure.

0,00045 : Constante de variation de l'indice d'acide quand la température varie de 1°C.

C) Indice d'acide (IA)

C'est le nombre de milligramme d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle. Les acides libres sont neutralisés par une solution d'éthanol titrée de KOH, c'est-à-dire la mesure de l'indice acide est réalisée par titrage (figure III.9).

1g d'huile essentielle est introduit dans un bécher de 25ml ; on ajoute 5ml d'éthanol absolu à 99,8° et 3 gouttes de l'indicateur coloré phénophtaléine. Ensuite, on neutralise la solution obtenue avec l'hydroxyde de potassium 0,1N.



Figure III.9 : Dispositif de mesure de l'indice d'acide.

A la fin, on prend le volume exact de KOH consommé pour calculer l'indice d'acide par la relation suivante :

$$I_A = (5,61 * V_{\text{KOH}}) / m_h$$

I_A : indice d'acide.

V_{KOH} : volume d'hydroxyde de potassium en millilitre.

m_h : masse d'huile essentielle en gramme.

III.4.3 Analyse chimique des huiles essentielles par CPG/SM

L'analyse chimique des HEs est une opération complexe nécessitant la mise en œuvre de plusieurs techniques, telle que l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse CPG couplée à la spectrométrie de masse SM. Cette technique d'analyse est généralement désignée sous le terme abrégé de "GC/MS" pour "Gas chromatography/Mass Spectrometry".

Le couplage (CPG/SM), est la technique la plus utilisée dans le domaine des HEs, qui permet d'effectuer simultanément la séparation, l'identification et la mesure quantitative des différents constituants des essences extraites.

Nous avons déterminé la composition chimique des HEs par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), au niveau du laboratoire de biochimie de la faculté de médecine, Monastir, Tunisie.

III.4.3.1 Principe de la technique

Le principe est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange à l'égard de deux phases ; une phase stationnaire et une phase mobile. Cette technique est basée sur la répartition des constituants entre une phase stationnaire et une phase gazeuse. La phase stationnaire est constituée d'un liquide à base de silicone qui imprègne une matière solide inerte et granuleuse, l'ensemble est contenu dans une colonne en acier ou en verre de 1 à 3m de long généralement enroulé sur elle-même, et de 2 à 4mm de diamètre. La phase mobile est un gaz vecteur inerte comme l'azote, l'hélium ou l'argon.

La colonne est maintenue à une température élevée par l'intermédiaire d'un four. Sous l'effet de la température, les constituants se volatilisent et deviennent séparables. La base de la séparation correspond à la différence des coefficients de partage des composés volatiles entre la phase stationnaire et la phase gazeuse. Un système de détection permet de créer un signal à la sortie de chaque molécule de la colonne ; ce signal se traduit par l'enregistrement des pics correspondants à chaque constituant.

La CPG est couplée à un spectromètre de masse (SM) ; le couplage se base sur la comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence, permettant son identification.

III.4.3.2 Appareillages

L'identification des constituants chimiques de nos huiles essentielles a été effectuée par une chaîne chromatographique en phase gazeuse (HP 5890-SERIE II) équipée d'une colonne capillaire HP5 MS (30m de longueur, 0,25mm de diamètre interne et de 0,25µm d'épaisseur de film) couplée à un spectromètre de masse (HP-MSD 5972).

L'hélium est utilisé comme gaz vecteur dans l'analyse des trois HEs. Ainsi, les spectres ont été enregistrés à une énergie d'émission de 70eV, et l'analyse spectrale des composés a été faite par une comparaison avec leurs homologues à l'aide des bibliothèques WILEY275. Cependant, les conditions chromatographiques se différencient d'une huile à une autre.

III.4.3.3 Conditions chromatographiques

A) Conditions chromatographiques d'analyse de l'HE d'*E. camaldulensis*

L'hélium a été introduit dans la colonne avec un débit de 1ml/min. 1µl de l'huile a été injecté en mode simple. La température d'injection et du détecteur est la même (280°C). La température de la colonne a été programmée de 40°C à 250°C à raison de 3°C/min.

B) Conditions chromatographiques d'analyse de l'HE de *S. officinalis*

Le gaz vecteur (l'hélium) est introduit avec un débit de 1ml/min, dont le volume de l'HE injecté est de 1µl en mode simple. La température de l'injecteur et du détecteur sont respectivement 250°C et 280°C. La température du four a été programmée à 40°C pour 5min, puis augmentée progressivement à 250°C à raison de 2°C/min, maintenue isotherme à 250°C pendant 15min, ensuite élevée à 270°C à raison de 10°C/min.

C) Conditions chromatographiques d'analyse de l'HE d'*R. chalepensis*

1µl de l'huile essentielle de *R. chalepensis* a été injecté en utilisant le mode simple. L'hélium est introduit avec un débit de 0,5ml/min. Les conditions analytiques sont les suivantes : température de l'injecteur à 250°C, température du four maintenue isotherme à 60°C pendant 8min, puis élevée de 60 à 280°C à raison de 2°C/min ; La température du détecteur est de 290°C.

III.5 Conclusion

Le travail expérimental réalisé au cours de ce chapitre nous a permis d'approfondir les notions et maîtriser les techniques de valorisation des huiles essentielles, à savoir :

- Dominer la manipulation d'un montage d'extraction par hydrodistillation de type *Clevenger* ;
- Maîtriser les différentes techniques de caractérisation des huiles essentielles telles que l'analyse sensorielle (caractérisation organoleptique) ;
- Détermination des propriétés physico-chimiques ;
- L'identification des constituants chimiques. Ce qui nous a permis de comprendre le principe de fonctionnement et d'analyse par CPG/SM.

**CHAPITRE IV : EXTRACTION PAR
HYDRODISTILLATION ET CARACTÉRISATION
SYSTÉMATIQUE DES HUILES ESSENTIELLES**

IV.1 Introduction

Le travail expérimental réalisé au cours de cette étude concerne l'extraction et la caractérisation des huiles essentielles de trois espèces végétales étudiées (*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis*). Il consiste à choisir la méthode d'extraction à travers une comparaison des techniques d'extraction existants dans la littérature et ce choix sera justifié par l'estimation du rendement et du temps nécessaire de l'extraction, suivi par l'étude analytique des huiles essentielles obtenues. Dans ce chapitre nous allons présenter et discuter tous les résultats acquis à propos de leurs rendements, leurs caractéristiques organoleptiques, leurs propriétés physicochimiques et leurs compositions chimiques.

IV.2 Rendement en huiles essentielles

Les rendements massiques en huiles essentielles d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis* issues de l'hydrodistillation, ont été résumés dans le tableau IV.1 dans des intervalles selon les conditions opératoires d'extraction.

Tableau IV.1 : Rendement en huiles essentielles extraites.

Huiles essentielles	<i>E. camaldulensis</i>	<i>S. officinalis</i>	<i>R. chalepensis</i>
Rendements (%)	0.34–0.51	0.41–0.9	0.49–0.81

Il ressort de ces résultats que l'*E. camaldulensis* a la plus petite quantité en HE, avec un rendement entre 0.34% et 0.51%, par rapport aux deux autres espèces, dont l'HE de *S. officinalis* représente le meilleur rendement avec des valeurs comprises entre 0.41% et 0.9%.

Nos résultats sont conformes dans l'ensemble aux données de la littérature. En effet, l'*E. camaldulensis* étudiée possède un rendement similaire à celui cité par Nait [45] et Foudil [125] de la région de Tizi-Ouzou et Alger, avec des valeurs de 0.42% et 0.33% respectivement. Cependant, il reste inférieur à celui mentionné par Mehani [70] dans son étude sur la même espèce de la région de Ouargla, qui démontre un rendement de l'ordre de 0.89%. De même, l'hydrodistillation de l'HE d'*E. camaldulensis* du Maroc révèle des valeurs du rendement de 0.84% à 1.4% [126,127].

Concernant *S. officinalis*, Adrar et ses collaborateurs ont signalé des valeurs du rendement en huile essentielle de 0.97%, 2.05%, 1.8%, 2.9% et 2.3% pour les régions suivantes : Algérie (Bejaia) ; France, Tunisie, Portugal et Roumanie respectivement [128], ces valeurs restent supérieures à nos résultats. Ainsi, celles de l'Italie fournissent des rendements supérieurs 0.55%–2.20% [101], et à l'exception de Taleb [124] qui a cité un rendement en HE de *S. officinalis* de la région de Tizi-Ouzou de 0.2%, une valeur relativement inférieure à nos résultats.

R. chalepensis est représentée par des valeurs de rendement intermédiaires entre celles des deux autres espèces. Les valeurs des rendements enregistrées sont en accord avec celui cité par : Merghache et ses collaborateurs [117], Bendriss [119] et Attou [129], qui ont mené des études sur la même espèce récoltée de différentes localités en Algérie et à différentes périodes, et rapportent des valeurs du rendement de l'ordre de 0.28%–1.28% ; 0.12%–0.8% et 0.41%–1.9% dans la région de Tlemcen, Chlef et Ain T'émouchent respectivement. D'autres résultats rapportés par Majdoub et ses collaborateurs [130], sur l'HE de *R. chalepensis* de la Tunisie qui ont trouvé un rendement relativement faible par rapport à nos résultats (0.34%).

En résumé, la récolte des trois plantes a été effectuée pendant le stade végétatif, ce qui peut aussi expliquer les faibles rendements obtenus [131]. Plusieurs études ont confirmé que les fluctuations observées dans le rendement en HE peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à l'imbrication d'une multitude de facteurs (biotique et abiotique). Parmi ces facteurs, nous pouvons citer la température, l'humidité, la situation géographique, l'âge et la période de la cueillette ainsi qu'aux méthodes d'extraction qui exercent une influence directe chez les espèces végétales [70,121,132].

IV.3 Cinétique d'hydrodistillation des huiles essentielles

Les résultats du suivi de la cinétique d'hydrodistillation des huiles essentielles des trois espèces végétales étudiées nous ont permis de tracer les courbes des cinétiques ; celles-ci traduisent les masses cumulées en huiles essentielles de trois plantes en fonction du temps (figure IV.1, IV.2 et IV.3).

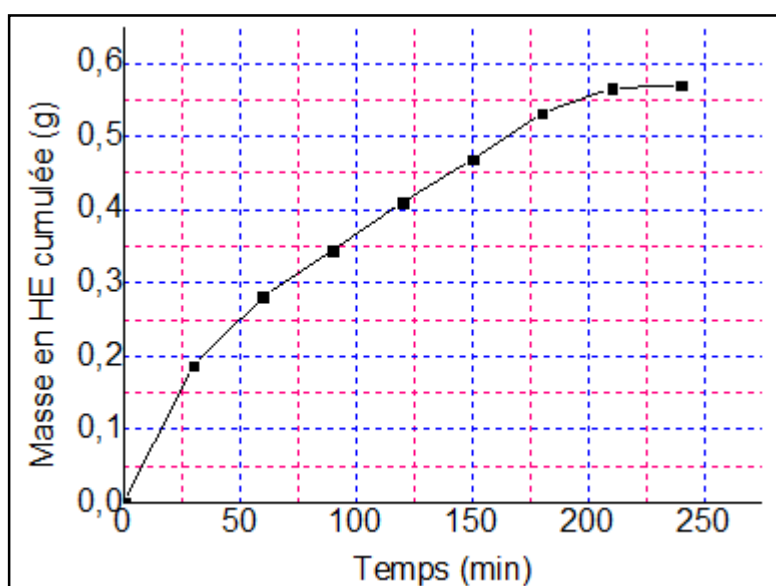


Figure IV.1 : Variation de la masse cumulée de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* en fonction du temps d'extraction.

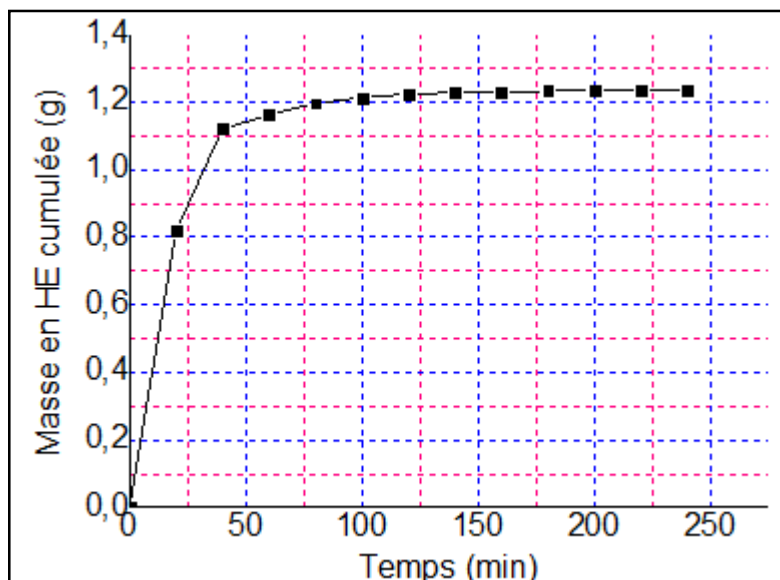


Figure IV.2 : Variation de la masse cumulée de l'huile essentielle de *S. officinalis* en fonction du temps d'extraction.

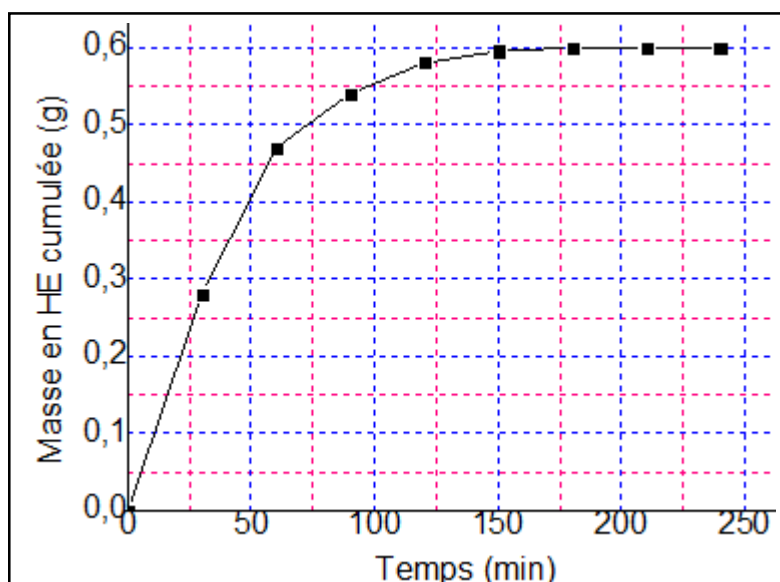


Figure IV.3 : Variation de la masse cumulée de l'huile essentielle de *R. chalepensis* en fonction du temps d'extraction.

Les courbes de la masse cumulée en huiles essentielles obtenues présentent une croissance progressive ; la première étape correspond à l'extraction des premières quantités d'HE, situées à la surface des feuilles. En effet, nous observons une augmentation régulière de la masse entre 0 et 60min, ce qui correspond à plus de 70% de la totalité d'huile stockée dans les tissus de deux espèces végétales *S. officinalis* et *R. chalepensis*.

De 60 à 180min, nous enregistrons un ralentissement de l'extraction des huiles essentielles. De ce fait, les courbes s'infléchissent et marquent un palier. Enfin, au cours de la troisième étape, la courbe tend vers un second palier, qui correspond, pour une matière

donnée, à la quantité maximale pouvant être atteint, dans les conditions expérimentales considérées. Elle correspond à un palier qui marque la fin du processus d'extraction. Bousbia et ses collaborateurs [133] ont effectué une extraction d'huile essentielle à partir des feuilles de *R. officinalis* et ont obtenu un profil de rendement conforme à nos courbes. Le profil de la technique d'hydrodistillation présente également trois étapes conduisant à la fin du processus d'extraction après un laps de temps de 180min.

La durée d'hydrodistillation de l'huile essentielle de *S. officinalis* relativement courte par rapport à deux autres espèces, peut être expliquée par le fait que les sites sécréteurs qui contiennent l'huile essentielle sont situés dans les tissus pour cette espèce (sites sécréteurs exogènes chez les espèces de *Lamiacées*) [134]. Par contre, les sites sécréteurs situés en profondeur (sites endogènes) pour les espèces de la famille des *Myrtacées* représentés par l'*E. camaldulensis* dans notre cas, nécessitent un laps de temps plus important pour être atteints et vidés de leur contenu [124].

L'examen de l'allure des courbes d'hydrodistillation de l'huile essentielle des trois espèces étudiées montre qu'elles peuvent être également subdivisées en 3 grandes étapes. La première s'étend de 15min à 60min, la deuxième de 60min à 180min et la troisième de 180min à 240min qui correspond à la fin de l'extraction des HEs. Cette durée d'extraction est conforme à celle rapportée par différents auteurs, elle peut s'étendre de 3h à 5h [135].

IV.4 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites

Les caractéristiques organoleptiques des trois huiles essentielles sont résumées dans le tableau IV.2. Les huiles essentielles issues de l'hydrodistillation possèdent des notes olfactives proches des arômes originels des plantes fraîches utilisées avec des odeurs d'herbes aromatiques. L'odeur dégagée est agréable malgré une légère altération, mais toujours avec un caractère herbal rappelant les plantes fraîches.

Tableau IV.2 : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles extraites.

Huile essentielle	Caractéristiques organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
<i>E. camaldulensis</i>	Liquide	Jaune doré	Fraîche Eucalyptolée
<i>S. officinalis</i>	Liquide	Incolore	Camphrée
<i>R. chalepensis</i>	Liquide	Vert clair	Odeur caractéristique herbacée

Dans l'ensemble, les caractéristiques organoleptiques des trois huiles essentielles issues de l'hydrodistillation sont en accord avec celles répertoriées dans les normes de la Nouvelle Direction Aromatique "New Directions Aromatics Inc, 2016" (NDA) (Tableau IV.3).

Tableau IV.3 : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles (NDA).

Huile essentielle	Caractéristiques organoleptiques		
	Aspect	Couleur	Odeur
<i>E. camaldulensis</i>	Liquide	Incolore à jaune pâle claire	Odeur eucalyptol caractéristique
<i>S. officinalis</i>	Liquide	Jaune pâle à jaune doré	Caractéristique herbacée
<i>R. chalepensis</i>	Liquide	Jaune pâle	Odeur herbacée

Notre huile essentielle d’*E. camaldulensis* montre des caractéristiques organoleptiques similaires à celles citées par Mehani [70] avec une odeur très forte, pénétrante et prononcée fraîche, caractéristique de l’eucalyptol. En outre, l’analyse sensorielle de l’huile essentielle de *S. officinalis* de la région de Tizi-Ouzou révèle des notes organoleptiques du même ordre que nos résultats d’analyse [124]. Cependant, une étude analogue menée par Hilan et ses collaborateurs [136] a indiqué que l’huile essentielle de *S. officinalis* originaire du littoral libanais, est un liquide limpide, jaune pâle et fortement cinéolique, et celle des montagnes est liquide limpide, jaune foncé et fortement cinéolique, alors que notre substance naturelle est liquide, incolore et camphrée.

En revanche, l’huile essentielle de *Ruta chalepensis* a une couleur vert clair avec un aspect liquide, et une odeur propre à la matière végétale (caractéristique herbacée). Les différences enregistrées peuvent être attribuées à l’origine géographique ou même au stade du cycle végétatif au moment de la récolte [137].

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) sont des indications qui permettent d’évaluer initialement la qualité d’une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d’autres techniques de caractérisation plus précises. La qualité d’une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physicochimiques.

IV.5 Propriétés physicochimiques des huiles essentielles extraites

Pour les propriétés physico-chimiques de nos huiles essentielles, nous avons procédé à la détermination des densités relatives, des indices de réfractions et des indices d’acide.

IV.5.1 Densité relative (d^{20})

La densité relative constitue un critère très important pour évaluer la qualité d’une huile essentielle dans différents domaines de la vie (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, etc...). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité des produits ainsi que les

tentatives de fraudes et d'altération. Les valeurs obtenues des densités de nos HEs oscillent dans l'intervalle des normes (NDA) (tableau IV.4).

Tableau IV.4 : Valeurs des densités relatives des huiles essentielles extraites.

Huile essentielle	Densité relative à 20°C	New Directions Aromatics Inc, 2016
<i>E. camaldulensis</i>	0.9087	0.8850–0.9280
<i>S. officinalis</i>	0.9140	0.9100–0.9300
<i>R. chalepensis</i>	0.8300	0.8260–0.8340

Deux autres études menées par Bouferkas et ses collaborateurs [138] et Mehani [70] sur l'HE d'*E. camaldulensis* confirment bien nos résultats avec des valeurs de densité relative de 0.9245 et 0.9035 respectivement. Ces valeurs sont comparables à celles de la normalisation. Mais Singh et ses collaborateurs [139] ont enregistré une valeur de densité élevée par rapport à celle des normes qui est de 0.9642. Concernant l'estimation de la densité de l'HE de *R. chalepensis* de différentes régions, les valeurs enregistrées sont comprises dans l'intervalle (0.8193–0.9320) [117,119,129,140].

IV.5.2 Indice de réfraction (I_R)

L'indice de réfraction (I_R) est un paramètre d'identification qualitative et une manière de vérifier le degré de pureté des huiles essentielles. Chaque substance a son indice de réfraction spécifique. Plus l'indice de réfraction d'un produit est proche de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. Les valeurs de l'indice de réfraction de nos HEs obtenues par hydrodistillation sont du même ordre que celles des normes, témoignant la haute pureté de nos essences (tableau IV.5).

Tableau IV.5 : Valeurs des indices de réfraction des huiles essentielles extraites.

Huile essentielle	Indice de réfraction à 20°C	New Directions Aromatics Inc, 2016
<i>E. camaldulensis</i>	1.4731	1.4550–1.4800
<i>S. officinalis</i>	1.4650	1.4700
<i>R. chalepensis</i>	1.4310	1.4290–1.4360

Les indices de réfraction de l'HE d'*E. camaldulensis* évalués par Bouferkas et ses collaborateurs [138], Mehani [70] et Singh et ses collaborateurs [139] sont de l'ordre de 1.4911 ; 1.4769 et 1.4648 respectivement qui affirment la fiabilité de nos valeurs. Ainsi, notre indice de réfraction de l'huile essentielle de *R. chalepensis* est conforme aux données de la littérature, où les différentes études réalisées sur cette espèce de différentes régions de

l'Algérie ont trouvé des valeurs des indices de réfraction qui oscillent entre 1.3440 et 1.5326 [117,119,129,140].

IV.5.3 Indice d'acide (I_A)

L'indice d'acide (I_A) donne une idée sur le taux d'acides libres présents dans nos huiles essentielles [141]. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité des huiles à subir des altérations, notamment l'oxydation. Donc, il indique d'une part le degré de conservation des huiles extraites et d'autres part leur qualité, et cet indice possède souvent une valeur inférieure ou égale à 2. Un I_A inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'HE ; et cet indice est certes dans les normes [70,124]. Les valeurs d'indices d'acide de nos huiles sont réunies dans le tableau IV.6.

Tableau IV.6 : Valeurs d'indices d'acide des huiles essentielles extraites.

Huiles essentielles	<i>E. camaldulensis</i>	<i>S. officinalis</i>	<i>R. chalepensis</i>
Indice d'acide	1.2350	1.1220	1.4025

Les valeurs d'indices d'acide de nos huiles essentielles sont dans les normes, dont la meilleure (plus faible) valeur a été enregistrée chez l'HE de *S. officinalis* (1.1220), suivie de l'HE d'*E. camaldulensis* (1.2350) et *R. chalepensis* (1.4025). Mehani [70] avait cité une valeur d'indice d'acide comparable à notre résultat (1.1760) pour l'HE d'*E. camaldulensis*. Cependant, Bouferkas et ses collaborateurs [138] ont enregistré une valeur élevée à celle des normes qui est de (4.2075) pour la même espèce.

En revanche, les huiles essentielles extraites par Fellah et ses collaborateurs [142] à partir des parties aériennes de *S. officinalis*, collectées dans deux régions de Tunisie géographiquement différentes, ont montré des indices d'acide (I_A) compris entre 0.4900 et 1.4100. Ces résultats sont proches de notre valeur et de ceux obtenus pour la sauge poussant en Kabylie et qui montre une valeur d'indice d'acide satisfaisante (0.2) [124]. De même, Hilan et ses collaborateurs [136] ont pu obtenir un indice d'acide inférieur à 1 pour l'huile essentielle extraite à partir de *S. officinalis* d'origine de Leban.

Ainsi, la détermination d'indices d'acide des HEs issues de l'hydrodistillation à partir de *R. chalepensis* récoltée de différentes régions de l'Algérie, révèle des valeurs plus ou moins importantes variant entre 2.0900 et 9.5300. Ces résultats sont dans l'ensemble supérieurs aux normes [117,119,129].

Vu le nombre important de paramètres pouvant intervenir dans la composition de l'huile essentielle, qu'il soit d'ordre naturel, ayant une origine intrinsèque (génétique, localisation, etc.), ou extrinsèque (sol, climat, etc.) ou d'ordre technologique, c'est-à-dire lié

au mode d'extraction. Les rendements et les indices physico-chimiques ne sont qu'une première caractérisation des essences et une étape nécessaire, mais demeurent non suffisants pour caractériser l'HE. Il sera primordial de déterminer le profil chromatographique des huiles essentielles.

Les faibles valeurs d'indice d'acide calculées pour l'ensemble des autres huiles essentielles étudiées nous laissent penser qu'elles ne contiennent pas beaucoup d'acides libres et ne sont donc pas altérées lors de leur extraction par hydrodistillation et leur conservation.

L'acidité d'une huile essentielle est un critère d'estimation de sa qualité. Un indice d'acide faible indique que les huiles essentielles sont stables et ne provoquent pas d'oxydation car l'huile, en s'oxydant, se dégrade rapidement et provoque une augmentation de l'indice d'acidité [143].

IV.6 Analyse chimique des huiles essentielles extraites

La composition chimique des huiles essentielles de trois espèces végétales étudiées a été identifiée par analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

IV.6.1 Composition chimique de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*

Le chromatogramme de l'analyse par CPG/SM de la composition chimique de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* de la région d'Oum El Bouaghi est illustré par la figure IV.4. Cette analyse a permis d'identifier 35 composés qui correspondent à 99.99% du total de l'huile essentielle de cette plante (tableau IV.7).

Il ressort de cette analyse que l'HE d'*E. camaldulensis* de notre région d'Oum El Bouaghi est constituée majoritairement du : *p*-Cymene (26.22%), spathulenol (16.71%), du 1,8-Cineole (14.44%), Limonene (7.34%), α -Terpineol (7.33%) et Terpinen-4-ol (3.14%).

Le chémotype enregistré pour notre huile essentielle est nettement différent à celui de la même espèce de la région de Ouargla. En effet, Mehani [70] a signalé que le Benzene,1-methyl-4-(1-methylethyl) apparaît comme le constituant majoritaire de l'HE (19,96%), suivi du (+) spathulenol (17.05%), du Sabinene, du Bicyclo [3,1,0] hexane (4.36%), du 2-cyclohexen-1-one,4-(1methyleth (4.13%) et de 3-cyclohexen-1-ol (3.02%), mais au 1,8-cineole représente uniquement un taux de 1.77%. Les compositions chimiques des huiles de feuilles de diverses espèces d'*Eucalyptus* ont été signalées par Singh et ses collaborateurs [144] les résultats montrent que le composant principal était le 1,8-cinéole.

Ces résultats sont différents de ceux obtenus par Ben Marzoug et ses collaborateurs [145] sur la composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus* collectées dans la région du Sud de la Tunisie. Ils ont trouvé 83 constituants avec une prédominance de γ -eudesmol (25%), Spathulenol (16.1%), p-cymene (10.6%), 1,8- cineole (8.7%), p-cymen-8-ol (4.4%), cis-sabinol (4.2%), p-cymen-7-ol (4.0%) et verbenone (3.7%). Par contre, Elaïssi et ses collaborateurs [146] ont noté que la composition chimique d'*Eucalyptus* cultivé dans le centre de la Tunisie est prédominante par le 1,8-cineole (26.1%), α -Pinène (12.3%) et le limonène (12.1%).

Tableau IV.7 : Composition chimique de l'HE d'*E. camaldulensis* issue de l'hydrodistillation.

N°	Composé	TR	IK	(%)	N°	Composé	TR	IK	(%)
1	cis-Salvene	6.208	855	0.65	19	Pinocarvone	10.746	1162	0.57
2	α -thujene	6.346	935	1.95	20	Borneol	10.976	1168	0.21
3	α -Pinene	6.645	940	0.24	21	Terpinen-4-ol	11.239	1180	3.14
4	camphene	7.187	954	0.32	22	α -Terpineol	11.464	1190	7.33
5	sabinene	7.499	976	0.29	23	Methyl chavicol	11.903	1205	0.62
6	β -pinene	7.71	997	1.78	24	Phellandral	12.248	1237	0.84
7	α -Phellandrene	7.959	1005	0.29	25	Cuminic aldehyde	12.547	1251	2.8
8	p-Cymene	8.132	1025	26.22	26	Bornyl acetate	13.219	1288	1.96
9	Limonene	8.225	1032	7.34	27	Patchoulane	13.437	1380	1.69
10	1,8-Cineole	8.28	1033	14.44	28	β -Bourbonene	13.944	1393	1.05
11	γ -Terpinene	8.843	1063	0.49	29	β -Caryophyllene	15.851	1427	0.05
12	α -terpinolene	9.072	1089	0.08	30	α -Humulene	16.457	1461	0.08
13	2-nonanone	9.539	1094	0.58	31	allo-Aromadendrene	16.578	1478	0.55
14	Linalool	9.789	1112	2	32	spathulenol	18.607	1576	16.71
15	α -Thujone	10.017	1117	0.67	33	Caryophyllene oxide	18.688	1586	1.57
16	β -Thujone	10.137	1120	0.93	34	T-Muurolol	18.829	1642	0.42
17	dihydro-Linalool	10.419	1134	0.12	35	13-Epimanool	19.115	1961	0.53
18	Camphor	10.603	1144	1.48		Total			99.99

TR : Temps de rétention (min) ; IK : Indice de Kovats on a HP5 MS colonne.

Les constituants majoritaires de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* du Maroc de la région de Maamora sont le 1,8-cinéole (42.30%), l' α -pinène (28.30%), suivi par le γ -terpinène (7.30%) et le *p*-cymène (6.50%) [127]. Cette composition est relativement comparable à celle de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* de Sidi Amira (Maroc), qui est plus riche en 1,8-cinéole (50.69%) et *p*-cymène (11.24%) et moins riche en α -pinène (11.23%) et γ -terpinène (1%) [147]. L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* du Cameroun est également plus riche en 1,8-cinéole (54.29%), *p*-cymène (14.59%), γ -terpinène (14.80%) et pauvre en α -pinène (12.13%) [148].

Les huiles essentielles d'*E. camaldulensis* de Taïwan présentent deux chémotypes : le premier est caractérisé par la prédominance du 1,8-cinéole (29.6%) [149], alors que le second est marqué par la codominance de l' α -pinène (22.52%), du *p*-cymène (21.69%) et du α -

phellandrène (20.08%) [82]. Cependant en Espagne, l’huile essentielle étudiée par l’équipe de Verdeguer et ses collaborateurs [150] a une composition totalement différente de celle de notre huile essentielle ; elle présente un chémotype dominé par le spathulénol (41.46%), le *p*-cymène (21.92%) et la cryptone (7.76%), alors que la teneur du 1,8-cinéole est faible (1.92%). De même en Chypre, l’étude de la composition chimique des huiles d’*E. camaldulensis* a montré une dominance d’ethanone (25.36%) et du 1,8-cinéole (13.73%) [10].

D’après ces résultats, on remarque que la composition chimique de l’huile essentielle de l’espèce *E. camaldulensis* de la région d’OEB est différente de celle obtenue dans de nombreux travaux sur la même espèce dans les différentes régions du monde.

IV.6.2 Composition chimique de l’huile essentielle de *S. officinalis*

L’analyse qualitative et quantitative par CPG/SM de notre essence extraite des feuilles de l’espèce végétale *S. officinales* récoltée dans la région de Sétif à l’Est algérien a permis de recenser 34 constituants représentant 99.99% de l’huile essentielle totale obtenue (tableau IV.8). Le chromatogramme de cette analyse est illustré dans la figure IV.5.

Tableau IV.8 : Composition chimique de l’HE de *S. officinalis* issue de l’hydrodistillation.

N°	Composé	TR	IK	(%)	N°	Composé	TR	IK	(%)
1	cis-Salvene	6.223	855	0.23	19	Borneol	11.044	1168	1.76
2	α -thujene	6.359	935	1.8	20	Terpinen-4-ol	11.276	1180	1
3	α -Pinene	6.657	940	3.94	21	α -Terpineol	11.601	1190	0.36
4	camphene	7.196	954	2.21	22	Methyl chavicol	11.694	1205	0.66
5	sabinene	7.422	976	1.34	23	Cuminic aldehyde	12.299	1251	0.52
6	β -pinene	7.735	997	0.38	24	pulegone	12.891	1259	0.08
7	α -Phellandrene	7.975	1005	0.25	25	Bornyl acetate	13.039	1288	0.07
8	<i>p</i> -Cymene	8.129	1025	2.62	26	2-undecanone	13.332	1295	0.17
9	Limonene	8.216	1032	2.06	27	β -Bourbonene	14.098	1393	0.07
10	1,8-Cineole	8.294	1033	16.27	28	β -Caryophyllene	15.86	1427	0.62
11	γ -Terpinene	8.837	1063	0.39	29	α -Humulene	16.464	1461	0.47
12	α -terpinolene	9.057	1089	0.22	30	allo-Aromadendreneallo	16.596	1478	0.07
13	2-nonanone	9.497	1094	0.77	31	spathulenol	18.587	1576	0.87
14	Nonanal	9.693	1105	0.42	32	Caryophyllene oxide	18.692	1586	0.65
15	α -Thujone	9.857	1117	28.36	33	Veridiflorol	18.835	1590	2.72
16	β -Thujone	10.031	1120	6.2	34	13-Epimanool	19.124	1961	0.44
17	dihydro-Linalool	10.178	1134	0.47					
18	Camphor	10.67	1144	21.53		Total			99.99

TR : Temps de rétention (min) ; IK : Indice de Kovats on a HP5 MS colonne.

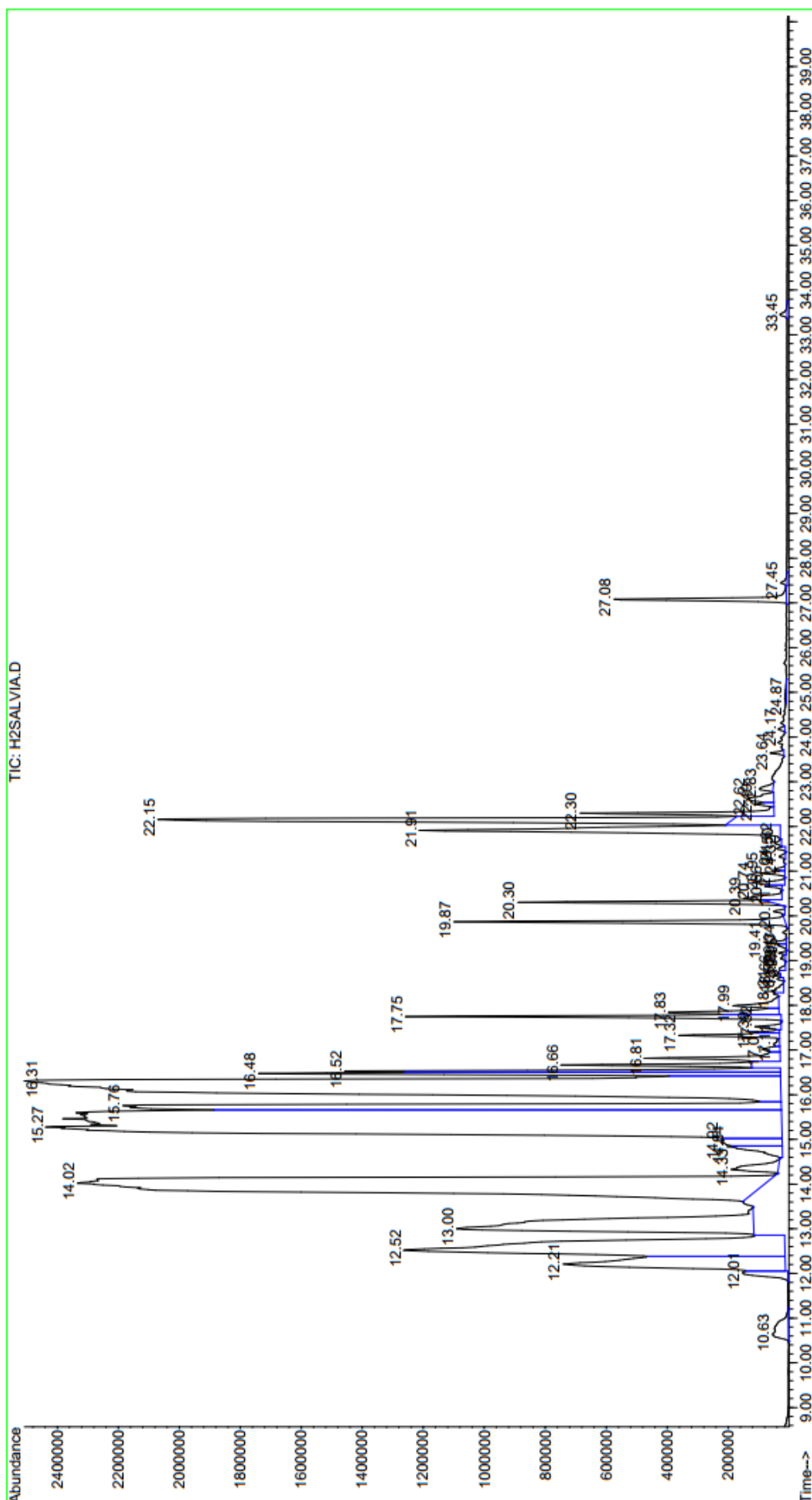


Figure IV.5 : Chromatogramme d'analyse de l'huile essentielle de *S. officinalis* par CPG/SM.

La prédominance des composés monoterpéniques oxygénés dans l'huile essentielle de *S. officinalis* est bien connue dans la littérature [6,91,100,101,151], même avec le changement des méthodes d'extraction et les sources de récolte de cette espèce. En effet, la lecture qualitative dans les constituants de notre HE de *S. officinalis* montre que le composé majoritaire est α -Thujone (28.36%), suivi par le camphre (21.53%), le 1,8-cinéole (16.27%) et β -Thujone (6.2%). Ces 4 composés de la famille des monoterpènes oxygénés totalisent plus de 72% du total de cette essence. Le reste des composés représentent des pourcentages individuels inférieur à 4%. Le même chémotype a été observé dans la littérature [91,152].

A l'exception, l'HE de *S. officinalis* de la région de Tizi-Ouzou (Kabylie) est composée de 21 constituants, dont l'élément majoritaire est l'Azulène (30.6%), suivi du Sabinène (7.88) et le Camphène (4.14%) [124]. La principale similitude entre les études de recherche à travers le monde concernant l'huile essentielle de la plante médicinale *S. officinalis* L. est que nous pouvons trouver l' α -thujone comme composé principal suivi du camphre dans 20% à 25% de la quantité totale de composés chimiques [151].

IV.6.3 Composition chimique de l'huile essentielle d'*R. chalepensis*

Le pourcentage de composants individuels de notre huile essentielle extraite à partir des parties aériennes de l'espèce végétale *R. chalepensis* L. de la région semi-aride d'Oum El Bouaghi à l'Est Algérien est présenté dans le tableau IV.9. L'analyse qualitative et quantitative de l'HE par CPG/SM a permis d'identifier 37 composés représentant 99,99% de cette essence. Le chromatogramme de cette analyse est illustré dans la figure IV.6.

L'analyse des résultats de caractérisation chimique représentée dans le tableau IV.6 montre que l'huile essentielle des parties aériennes de notre plante (*Ruta chalepensis*) de la région d'Oum El Bouaghi est à majorité de 2-undécanone (33.37%), suivi par le 2-nonanone (32.87%) et le 2-Decanone (11.11%). Ces 3 constituants totalisent plus de 77% du total de cette essence et donc notre plante peut être classée comme chémotype à 2-undécanone.

Dans différentes études, il a été mentionné que le 2-undécanone est le constituant majoritaire de l'HE de *R. chalepensis* d'origine de la Turquie, l'Argentine, l'Inde et l'Iran avec les proportions suivantes : 66.5%, 38.1%, 41.3%–67.8% et 52.5% respectivement [140,153-155]. En revanche, la même HE de la Turquie, l'Iran, l'Inde et de l'Italie possède un autre constituant majoritaire : le 2-nonanone (16.2%, 24.1%, 5.2%–33.6% et 49.9% respectivement) [140,154-156].

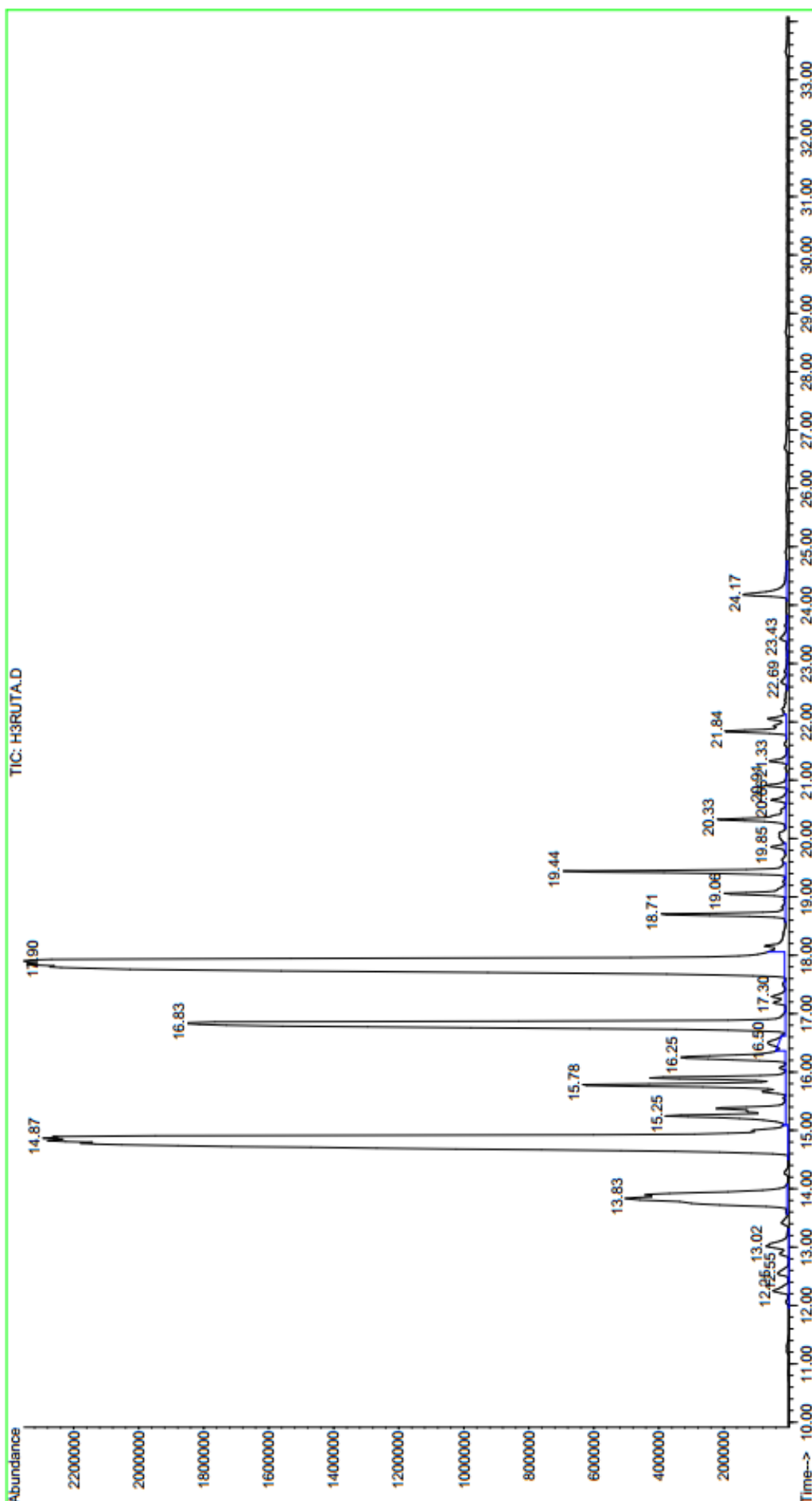


Figure IV.6 : Chromatogramme d'analyse de l'huile essentielle de *R. chalepensis* par CPG/SM.

D’après l’étude de Merghache et ses collaborateurs [117], l’analyse par CPG et CPG/SM des huiles essentielles des différentes parties de *R. chalepensis* de la région de Tlemcen, permet d’identifier 20 constituants dont ces essences possèdent un seul constituant majoritaire : le 2-undécanone (20.40% à 82.74%). En plus du 2-undécanone, d’autres composés minoritaires tels que : le 2-nonanone, le 1-décanol et le 2-undécanol, etc., [117]. Ces chémotypes restent similaires et en accord avec nos résultats d’analyse. La même situation a été remarquée dans l’huile essentielle de *R. chalepensis* de la région de Chlef où le 2-undécanone est le composé majoritaire avec un pourcentage de 62.84% [119]. Par contre, l’huile essentielle issue de la même espèce de provenance de l’Arabie Saoudite, le pourcentage en 2-undécanone est inférieure ou égal à 4.5% [157]. Cependant, l’huile essentielle de provenance de l’Italie contient deux constituants majoritaires le 2-nonanone (49.9%) et le 2-undécanone (30.0%) [156].

Tableau IV.9 : Composition chimique de l’HE de *R. chalepensis* issue de l’hydrodistillation.

N°	Composé	TR	IK	(%)	N°	Composé	TR	IK	(%)
1	2-Heptanone	6.323	890	0.31	20	Geyrene	10.513	1142	0.24
2	α -thujene	6.623	935	0.25	21	Camphor	10.624	1144	1.39
3	α -Pinene	7.093	940	0.12	22	2-octyl acetate	11.282	1146	0.28
4	camphene	7.167	954	0.25	23	Geijerene	11.459	1150	2.22
5	2-heptanal	7.417	966	0.13	24	2-Decanone	12.31	1192	11.11
6	sabinene	7.556	976	0.12	25	Methyl chavicol	12.758	1205	0.57
7	β -pinene	7.707	997	0.2	26	Octyl acetate	13.175	1215	0.12
8	α -Phellandrene	7.948	1005	0.09	27	Cuminic aldehyde	13.291	1251	0.15
9	p-Cymene	8.108	1025	1.2	28	2-undecanone	13.549	1295	33.37
10	Limonene	8.186	1032	2.02	29	Nonyl acetate	14.737	1315	1.26
11	1,8-Cineole	8.254	1033	1.75	30	1-Undecanol	15.297	1374	0.8
12	γ -Terpinene	8.426	1063	0.24	31	2-Tridecanone	15.868	1455	1.84
13	α -terpinolene	8.815	1089	0.11	32	α -Humulene	17.063	1461	0.69
14	2-nonanone	9.573	1094	32.87	33	1-Dodecanol	18.079	1478	0.21
15	2-Nonanol	9.649	1098	0.67	34	Elemol	18.584	1549	0.65
16	Nonanal	9.722	1105	0.71	35	spathulenol	18.689	1576	0.14
17	α -Thujone	9.851	1117	2.19	36	Veridiflorol	18.833	1590	0.24
18	β -Thujone	10.037	1120	0.51	37	Phytol	22.177	2118	0.5
19	dihydro-Linalool	10.357	1134	0.47		Total			99.99

TR : Temps de rétention (min) ; IK : Indice de Kovats on a HP5 MS colonne.

En résumé, à partir des résultats que nous avons obtenus et confrontés à ceux d’autres chercheurs à travers le monde, nous pouvons dire que l’ensemble des huiles analysées se distinguent par l’abondance de leurs différents constituants chimiques. Ces différences qualitatives et quantitatives dans la composition chimique des huiles essentielles peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que : la situation géographique, les effets climatiques des plantes, la saison de la récolte, la nature du sol, l’âge des parties de plantes (jeunes ou

adultes), de l'état du matériel végétal utilisé (matière fraîches ou séchées), de la partie de la plante utilisée, du temps de la collecte, du lieu, de la température et la durée de séchage, des parasites et de la méthode d'extraction [158-163].

IV.7 Conclusion

Les résultats de l'extraction démontrent que l'huile essentielle de trois espèces végétales (*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis*) peut être facilement extraite en utilisant la technique d'hydrodistillation. Le suivi de la cinétique d'extraction montre que 240min d'hydrodistillation est suffisante pour extraire la quasi-totalité de l'HE des trois espèces étudiées.

Les valeurs du rendement enregistrés sont : 0.34%-0.51%, 0.41%-0.9% et 0.49%-0.81% pour l'HE d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis* respectivement. Le rendement en huile essentielle de chaque plante est donné par un intervalle grâce au plan d'expérience qui exige de faire plusieurs essais d'extraction pour chaque plante afin d'optimiser leurs paramètres.

Les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles extraites ont été déterminées. Tous nos résultats de caractérisations sont dans l'intervalle des normes et en accord avec les données de la littérature témoignent la bonne identification de nos espèces ainsi que de la bonne qualité des huiles essentielles obtenues. Ainsi, les huiles essentielles ont été analysées par CPG/SM. L'analyse de l'HE d'*E. camaldulensis* a permis l'identification de 35 composés correspondant à 99.99% de cette HE. Cette dernière est constituée majoritairement du *p*-Cymene (26.22%), du spathulenol (16.71%), du 1,8-Cineole (14.44%), du Limonene (7.34%), du α -Terpineol (7.33%) et du Terpinen-4-ol (3.14%). D'autre part, l'analyse de l'HE de *S. officinalis* a permis de recenser 34 constituants représentant 99.99% de l'huile essentielle totale obtenue dont l'élément majoritaire est le α -Thujone (28.36%), suivi par le camphre (21.53%), le 1,8-cinéole (16.27%) et β -Thujone (6.2%). En revanche, l'analyse de l'HE de *R. chalepensis* a permis d'identifier 37 constituants représentant 99.99% de cette essence, dont l'élément majoritaire est le 2-undécanone (33.37%), suivi par le 2-nonanone (32.87%) et le 2-Decanone (11.11%).

**CHAPITRE V : MODÉLISATION PARAMÉTRIQUE DU
PROCÉDÉ D'HYDRODISTILLATION**

V.1 Introduction

La majorité des plantes médicinales ne contiennent qu'une petite quantité d'huile essentielle 1% (m/m) [2]. Ces essences présentent une source potentielle thérapeutique importante grâce à leurs activités à large spectre, y compris l'activité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire. Donc, l'amélioration du rendement en huile essentielle devient une nécessité primordiale. Par conséquent, ce chapitre consiste principalement à étudier le procédé d'hydrodistillation des huiles essentielles à partir de trois espèces étudiées : *E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis*. Dans ce contexte, des expériences ont été réalisées afin d'investiguer l'effet de certains paramètres opératoires sur ce procédé, à savoir : la granulométrie, le débit de condensation et le temps d'extraction sur le rendement massique en huile essentielle, par l'application d'un plan expérimental *Box-Behnken* à trois facteurs.

L'application des plans d'expériences était un moyen pour minimiser le nombre de manipulations à réaliser afin de montrer l'effet des paramètres étudiés et en déduire les conditions optimales dans le domaine d'étude imposé. Dans ce chapitre nous allons présenter la méthodologie des plans d'expériences adoptée afin de chercher les conditions optimales pour une extraction avec un meilleur rendement.

V.2 Théorie d'optimisation expérimentale

La stratégie dans le choix des méthodes d'optimisation de l'expérimentation doit faciliter l'organisation progressive de l'acquisition des connaissances. Elle doit également minimiser le plus possible le nombre d'expériences, mais elle ne doit pas sacrifier la qualité des résultats car on recherche la meilleure précision possible. L'étude d'un phénomène peut se résumer à l'intérêt d'une grandeur ; par exemple ; le rendement d'un processus donné, grandeur qui, généralement dépendra d'un grand nombre de variables.

Sous une forme mathématique, on peut écrire que la grandeur d'intérêt **Y**, que nous appellerons également réponse par la suite, est une fonction de plusieurs variables **X_i** (variables que nous appellerons aussi facteurs par la suite)

$$Y = f(X_1, X_2 \dots X_i)$$

L'étude du phénomène se ramène alors à la mesure de la réponse en fonction des différentes valeurs que l'on peut donner aux facteurs. Deux méthodes peuvent être utilisées pour résoudre le problème : méthodes classiques et méthodes des plans d'expériences.

V.3 Méthodes classiques d'optimisation

Dans les méthodes classiques, on fixe le niveau de toutes les variables sauf une, et l'on mesure la réponse Y en fonction de plusieurs valeurs de la variable non fixée X_i . Si l'on veut étudier toutes les variables, il faut rétablir le même calcul pour chacune d'elles.

Si l'on désire étudier simplement quatre facteurs et que l'on décide de prendre cinq points expérimentaux par variable, il faut réaliser $5^4=625$ expériences [119], ce qui nécessite, selon le nombre de variable et le nombre de points expérimentaux à réaliser, un travail qui peut dépasser les limites du faisable.

V.4 Méthodes des plans d'expériences

La différence capitale avec la méthode classique tient au fait que l'on fait varier les niveaux de tous les facteurs à la fois, à chaque expérience, mais de manière programmée et raisonnée. Le fait de faire varier tous les facteurs à la fois n'est pas un inconvénient en soi, mais au contraire, offre de nombreux avantages.

Les plans d'expériences permettent l'étude de nombreux facteurs tout en maintenant le nombre des essais à une valeur raisonnable, c'est pourquoi, l'une de leurs applications principales est la recherche des facteurs influents [119]. Les plans d'expériences sont des techniques qui permettent de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse, et de les optimiser dans des domaines expérimentaux bien déterminés. On organise une suite d'essais consistant à manipuler les facteurs afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale [164].

V.4.1 Principe et intérêt des plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles. Ils sont applicables à de nombreuses disciplines et à toutes les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt Y et des variables X_i . Il faut penser aux plans d'expériences si l'on s'intéresse à une fonction du type [165] :

$$Y = F(X_i)$$

L'application des plans d'expériences offre de nombreux avantages parmi lesquels :

- Une diminution du nombre des essais ;
- Un nombre de facteurs étudiés très grand ;
- La détection des interactions entre facteurs ;
- Une meilleure précision sur les résultats ;

- La modélisation des résultats ;
- L'optimisation des résultats.

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à tous les cas rencontrés par un expérimentateur, dont les plus utilisés sont : le Composite et Box-Behnken.

V.4.2 Plan composite

Un plan composite est constitué de trois parties :

- Un plan factoriel dont les facteurs prennent deux niveaux ;
- Au moins un point expérimental situé au centre du domaine d'étude ;
- Des points axiaux. Ces points expérimentaux sont situés sur les axes de chacun des facteurs.

La figure V.1 représente un plan composite pour deux facteurs. Les points A, B, C et D sont les points expérimentaux d'un plan 2^4 . Le point E est le point central. Ce point peut avoir été répliqué une ou plusieurs fois. Les points F, G, H et I sont les points axiaux. Ces quatre derniers points forment ce que l'on appelle le plan en étoile. On réalise 9 essais et 6 coefficients doivent être déterminés. Il faut donc résoudre un système de 9 équations à 6 inconnues.

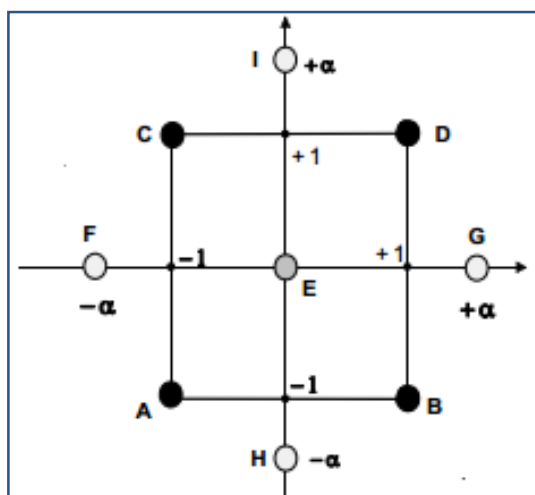


Figure V.1 : Plan composite pour deux facteurs.

Les plans composites prennent facilement la suite d'un premier plan factoriel dont les résultats sont insuffisamment expliqués par un modèle du premier degré. Il suffit d'effectuer les expériences correspondant aux points en étoile et de faire les calculs sur l'ensemble de toutes les expériences. Les plans composites sont parfaitement adaptés à une acquisition progressive des résultats [165].

V.4.3 Plan Box-Behnken

Le plan Box-Behnken est une méthode de surface de réponse utilisée pour examiner la relation entre les variables de réponse ou un ensemble de paramètres expérimentaux. Le plan Box-Behnken nécessite moins d'exécutions, et chaque facteur ne requiert que trois niveaux au lieu de cinq requis pour les autres plans dans des cas de trois ou quatre variables [166], à moins que l'alpha ne soit égal à un, ce qui peut être plus pratique et plus facile à exécuter [167].

Le plan Box-Behnken à trois facteurs nécessite seulement 6 points factoriels et 6 points axiaux, plus les répliques au point central. La figure V.2 représente un design Box-Behnken à trois facteurs.

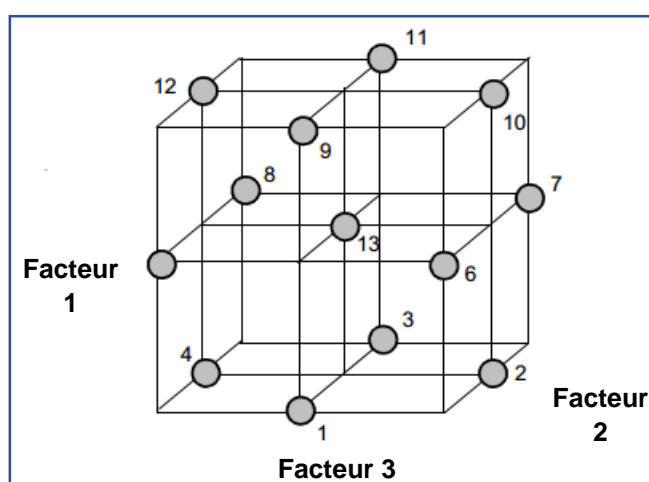


Figure V.2 : Design Box-Behnken à trois facteurs et trois niveaux.

V.4.4 Méthode de surfaces de réponse (MSR)

Le but de l'étude des surfaces de réponse est une modélisation du phénomène étudié. C'est une suite assez naturelle d'une étape de criblage, et constitue un moyen efficace de l'optimisation du dispositif expérimental ou du procédé étudié. Cette méthode (MSR) est utilisée dans divers domaines tels que les industries, l'agriculture, la médecine, l'analyse, l'électronique, etc..., dont l'objectif principal est d'optimiser, développer et améliorer la réponse du système.

Dans la méthodologie des surfaces de réponses, on cherche à relier une réponse continue Y à k facteurs continus et contrôlés X_1, X_2, \dots, X_k , à l'aide d'un modèle de régression. Il est courant d'utiliser un modèle du second degré, incluant les effets quadratiques des facteurs. Dans la plupart des cas, ce modèle est suffisant pour modéliser correctement les phénomènes étudiés [165].

Après l'étape d'ajustement du modèle, on représente graphiquement celui-ci à l'aide de graphiques de type « surface de réponse », qui permettent de visualiser le comportement

de la réponse en fonction des facteurs. Ces graphiques procurent une aide appréciable dans l'exploitation du modèle en vue d'une optimisation du système expérimental.

V.5 Méthode d'optimisation adoptée

L'optimisation des paramètres d'extraction est importante pour avoir une extraction efficace. Par conséquent, et afin de répondre à cette exigence, on a fait recours aux plans d'expériences par application de la méthodologie de surface de réponse (MSR). Cette dernière est une technique mathématique et statistique utile pour modéliser et analyser l'effet de plusieurs variables. Elle présente plusieurs propriétés, à savoir : économiser le temps du procédé, économiser les réactifs et réduire les efforts, ainsi qu'elle fournit ainsi des informations sur les interactions des paramètres étudiés et donnant des résultats optimisés et statistiquement significatifs.

V.5.1 Choix des paramètres étudiés

L'étude d'optimisation a été menée sur les paramètres opératoires jugés influents sur le processus d'hydrodistillation, à savoir : la granulométrie, le débit de condensation et le temps d'extraction. Le choix des paramètres à optimiser et leurs domaines expérimentaux est basé sur les données de la littérature [5,99,134,168].

Les trois paramètres (granulométrie, débit de condensation et temps d'extraction) jugés influencé l'opération d'hydrodistillation sont tous des facteurs continus ou quantitatifs, c'est-à-dire des paramètres qu'on peut maîtriser, et qui peuvent adopter les valeurs numériques réelles choisies dans le domaine.

V.5.2 Choix de plan d'expérience (Box-Behnken)

La méthodologie de surface de réponse fait partie des plans d'expériences utilisés pour l'optimisation. C'est une modélisation empirique et une technique consacrée à l'évaluation de la relation d'un ensemble de paramètres expérimentaux contrôlés et observés avec les résultats [169].

Parmi les deux types de plans de surface de réponse couramment utilisés à savoir : les plans composites centrés et les plans de Box-Behnken, nous avons choisi le deuxième type. Le plan Box-Behnken nécessite moins d'exécutions et de points de conception qu'une conception composite centrale, dans le cas de trois ou quatre variables [166]. En outre, chaque paramètre ne requiert que trois niveaux au lieu de cinq requis pour les plans composites centrés, à moins que l'alpha ne soit égal à un, ce qui peut être plus pratique et plus facile à exécuter [167].

Le nombre des expériences est donné par l'équation (01) :

$$N = 2k(k-1) + cp \dots\dots\dots (01)$$

Où k est le nombre de paramètres, et cp est le nombre de répliques au point central. Le design Box-Behnken est considéré comme une option efficace dans la méthodologie de la surface de réponse, et une alternative idéale aux designs composites centrales [12].

V.5.3 Domaines d'étude et matrice d'expériences

Le plan d'expérimentation est basé sur un plan Box-Behnken pour trois paramètres et trois niveaux (Tableau V.1).

Tableau V.1 : Domaines expérimentaux des paramètres étudiés.

Paramètre	Symbole	Unité	Minimum	Moyenne	Maximum
Diamètre des particules	x_1	Mm	1	1.5	2
Débit de condensation	x_2	ml/min	1.4	2.4	3.4
Temps d'extraction	x_3	Min	150	180	210

Compte tenu de 3 points centraux, un total de 15 essais a été généré (Tableau V.2), consistant en 6 points factoriels et 6 points axiaux.

Tableau V.2 : Matrice d'expérience.

Exp	x_1 Diamètre des particules (mm)	x_2 Débit de condensation (ml/min)	x_3 Temps d'extraction (min)
1	1	1,4	180
2	2	1,4	180
3	1	3.4	180
4	2	3.4	180
5	1	2.4	150
6	2	2.4	150
7	1	2.4	210
8	2	2.4	210
9	1.5	1.4	150
10	1.5	3.4	150
11	1.5	1.4	210
12	1.5	3.4	210
13	1.5	2.4	180
14	1.5	2.4	180
15	1.5	2.4	180

V.5.4 Modèle mathématique

Le modèle mathématique postulé est un modèle d'ordre 2 de l'équation (02) :

$$Y(\%) = \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_0 \quad (02)$$

Avec :

Y est le rendement théorique en huile essentielle (réponse).

β_0 représente la constante du modèle.

β_1 , β_2 et β_3 sont les coefficients des termes linéaires.

β_{11} , β_{22} et β_{33} sont les coefficients des termes quadratiques.

β_{12} , β_{13} et β_{23} sont les coefficients des termes d'interaction.

x_1 , x_2 et x_3 sont les valeurs des paramètres.

V.5.5 Analyse statistique

Le modèle sera validé par le test de l'analyse de variance ANOVA qui est un outil statistique très utilisé aussi bien en validation et comparaison du modèle qu'en analyse de données. Cette méthode utilise des mesures de variance afin de juger la significativité des facteurs et du modèle. L'intérêt de cette analyse est de pouvoir tester de manière absolue, l'influence des facteurs sur les variations d'une réponse donnée.

Le modèle, les coefficients de régression et le test de défaut d'ajustement vont être considérés comme significatifs lorsque les probabilités de la signification du risque p -value sont inférieures à 0.05 [168,170]. En plus de l'analyse de la variance, nous allons avoir recours à d'autres outils, à savoir : le coefficient de détermination multiple R^2 et le coefficient de variance CV. Une valeur du coefficient de variance inférieur à 10% indique un degré de précision très élevé entre les valeurs expérimentales et prédites [5].

V.5.6 Optimisation paramétrique

Après la détermination du modèle et la vérification de sa validité, et pour la recherche des conditions opératoires optimales qui nous amènent à la réponse souhaitée par une meilleure optimisation, nous utilisons les surfaces de réponse qui peuvent être générées à l'intérieur du domaine expérimental à partir de l'équation du modèle. Ces surfaces traduisent les variations de notre réponse en fonction de deux paramètres, tout en maintenant le troisième constant, c'est-à-dire, la représentation graphique des résultats (modèle estimé) pour pouvoir en tirer des optimums.

Ensuite, pour chercher les conditions opératoires optimales exactes avec un certain pourcentage de compromis, nous utilisons la fonction « Désirabilité ». Cette fonction qui permet de donner un réglage optimal exact, varie entre 0 et 1. En effet, la valeur 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse inacceptable (non désirable) et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs considérés [134].

L'optimisation par la méthodologie des plans d'expérience fait parfois appel à des notions de statistiques et d'analyses un peu poussées et de nombreux logiciels donnent un accès simple et rapide à ces outils performants. Dans cette étude, logiciel Design-expert® version 7.0.0 (Stat-Ease, inc. Minneapolis) a été utilisé pour établir le plan expérimental, concevoir les expériences et évaluer les résultats à travers la modélisation, avec les surfaces des réponses. Un exemple d'exécution du logiciel est inséré en **Annexe 01**.

V.6 Résultats et discussions

L'optimisation des paramètres et la modélisation de l'hydrodistillation ont été appliquées dans l'extraction d'HE de trois plantes investiguées, afin d'avoir une extraction efficace et améliorer le rendement massique en huile essentielle.

V.6.1 Modélisation de l'hydrodistillation d'HE d'*E. camaldulensis*

A) Rendement expérimental

L'estimation du rendement massique en huile essentielle obtenu par hydrodistillation révèle une valeur comprise entre 0.34% et 0.51% (tableau V.3), dont la valeur du rendement la plus élevée (0.51%) a été enregistrée pour un diamètre des particules de 1mm, avec un débit de condensation et un temps d'extraction de : 2.4ml/min et 210min respectivement. Une autre valeur du rendement similaire à la précédente (0.48%) a été estimée dans les conditions suivantes : 1mm, 3.4ml/min et 180min. La valeur minimale du rendement (0.34%) a été obtenue aux conditions opératoires suivantes : 2mm, 2.4ml/min et 150min.

Tableau V.3 : Valeurs du rendement expérimental (*E. camaldulensis*).

Exp	x_1 : Granulométrie (mm)	x_2 : Débit de condensation (ml/min)	x_3 : Temps d'extraction (min)	Rendement expérimental (%)
1	1	1.4	180	0.42
2	2	1.4	180	0.38
3	1	3.4	180	0.48
4	2	3.4	180	0.41
5	1	2.4	150	0.45
6	2	2.4	150	0.34
7	1	2.4	210	0.51
8	2	2.4	210	0.39
9	1.5	1.4	150	0.36
10	1.5	3.4	150	0.38
11	1.5	1.4	210	0.41
12	1.5	3.4	210	0.46
13	1.5	2.4	180	0.42
14	1.5	2.4	180	0.43
15	1.5	2.4	180	0.43

B) Validation statistique du modèle

Tous nos résultats de modélisation ont été testés statistiquement par l'analyse de variance (ANOVA) comme montre le tableau V.4. L'analyse a montré que les données expérimentales étaient très adaptées au modèle polynomial de second ordre. Les résultats de l'analyse montrent que le modèle est significatif puisque la probabilité de la signification du risque p -value est inférieure à 0.05 [168,170], donc il y a seulement 1.93% de chance pour que le modèle devienne invalide à cause du bruit.

En outre, le modèle ne présente pas un manque d'ajustement puisque la probabilité de la signification du risque de termes « défaut d'ajustement » (p -value=0.0504) est aussi presque de 0.05, d'où on peut dire que le modèle est bien ajusté. Par conséquent, le modèle peut être utilisé pour naviguer dans tout l'espace du domaine expérimental. L'analyse de variance montre que les termes du modèle x_1 , x_2 et x_3 sont des termes significatifs (p -value < 0.05). Cependant, le reste des termes est statistiquement insignifiant : x_1x_2 , x_1x_3 , x_2x_3 , x_1^2 , x_2^2 , et x_3^2 .

Un coefficient de variation (CV) de 4.74% < 10% indique un degré de précision très élevé entre les valeurs expérimentales et prédites [99]. En revanche pour un bon ajustement d'un modèle mathématique, la valeur du coefficient de détermination (R^2) devrait être un

minimum de 0.80 [171]. Le coefficient $R^2=93.13\%$ est satisfaisant et cette valeur donne une bonne concordance entre les valeurs expérimentales et prévues du modèle adapté.

Tableau V.4 : Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle quadratique (*E. camaldulensis*).

Source de variance	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	<i>p</i> -value
Model	0.027	9	2.964E-003	0.0193*
x_1 : Granulométrie	0.014	1	0.014	0.0018*
x_2 : Débit de condensation	3.200E-003	1	3.200E-003	0.0357*
x_3 : Temps d'extraction	7.200E-003	1	7.200E-003	0.0079*
x_1x_2	2.250E-004	1	2.250E-004	0.4835
x_1x_3	2.500E-005	1	2.500E-005	0.8110
x_2x_3	2.250E-004	1	2.250E-004	0.4835
x_1^2	2.314E-004	1	2.314E-004	0.4777
x_2^2	5.391E-004	1	5.391E-004	0.2945
x_3^2	5.391E-004	1	5.391E-004	0.2945
Résidus	1.967E-003	5	3.933E-004	
Défaut d'ajustement	1.900E-003	3	6.333E-004	0.0504
Erreur pure	6.667E-005	2	3.333E-005	
Total	0.029	14		
R^2	0.9313			
CV (%)	4.74			

*Termes significatifs, *p*-value <0,05.

La figure V.3 représente les valeurs des rendements prévus en fonction de celles expérimentales et on constate que le nuage de points n'est pas loin de la droite d'équation ($y=x$), ce qui indique que le modèle a une bonne qualité descriptive.

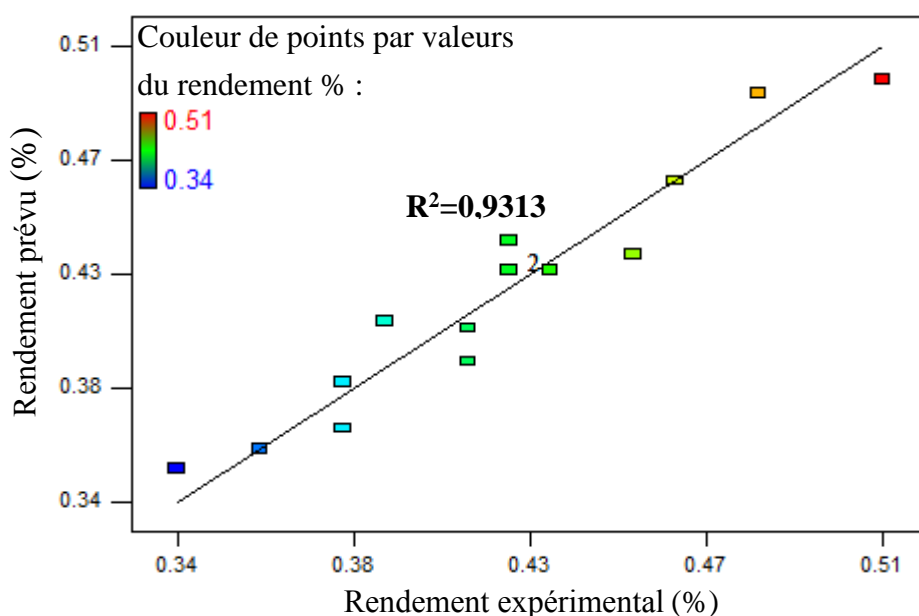


Figure V.3 : Représentation du rendement prévu d'HE d'*E. camaldulensis* en fonction du rendement expérimental.

C) Modèle mathématique retenu

Le tableau V.5 représente les valeurs des coefficients de régression du modèle. Le modèle quadratique a permis de corréler le rendement massique d'huile essentielle extraite à partir de trois plantes par hydrodistillation en fonction des trois paramètres étudiés.

Tableau V.5 : Coefficients de régression du modèle (*E. camaldulensis*).

Coefficient	Valeur	Coefficient	Valeur
β_0	-0.098183	β_{22}	-0.012083
β_1	-0.11400	β_{33}	$-1.34259 \cdot 10^{-5}$
β_2	0.055500	β_{12}	-0,015000
β_3	$5.48333 \cdot 10^{-3}$	β_{13}	$-1.66667 \cdot 10^{-4}$
β_{11}	0.031667	β_{23}	$-2.50000 \cdot 10^{-4}$

Avec toutes les combinaisons possibles des trois paramètres, le modèle mathématique retenu est donné par l'équation (03) suivante :

$$Y(\%) = 0.031667x_1^2 - 0.012083x_2^2 - 1.34259 \cdot 10^{-5}x_3^2 - 0.01500x_1x_2 - 1.66667 \cdot 10^{-4}x_1x_3 - 2.50 \cdot 10^{-4}x_2x_3 - 0.11400x_1 + 0.05550x_2 + 5.48333 \cdot 10^{-3}x_3 - 0.098183 \quad (03)$$

D) Optimisation des paramètres

L'objectif de la modélisation est d'améliorer le rendement en huile essentielle de trois espèce végétales étudiées à travers l'optimisation des paramètres opératoires influençant le procédé d'hydrodistillation.

On note qu'on a réalisé le plan d'expériences dans l'extraction de l'huile essentielle de chaque espèce. Dans le cas de l'hydrodistillation de l'HE d'*E. camaldulensis*, nous avons enregistré expérimentalement un rendement maximal avec une valeur de 0.51%. Le but donc, sera de chercher les conditions opératoires optimales qui mènent à la valeur maximale accessible.

D-1) Surfaces de réponse

L'influence des paramètres étudiés sur le rendement en huile peut être illustrée graphiquement par la représentation des surfaces de réponse dans un espace à trois dimensions (3D). Ces surfaces permettent de montrer la variation du rendement en huile en fonction de deux facteurs, tout en maintenant le troisième constant. La figure V.4 représente les diagrammes de surface de réponse pour l'effet des interactions mutuelles des paramètres sur le rendement d'huile, qui peut être observé à partir de la nature de la courbure des surfaces de réponse.

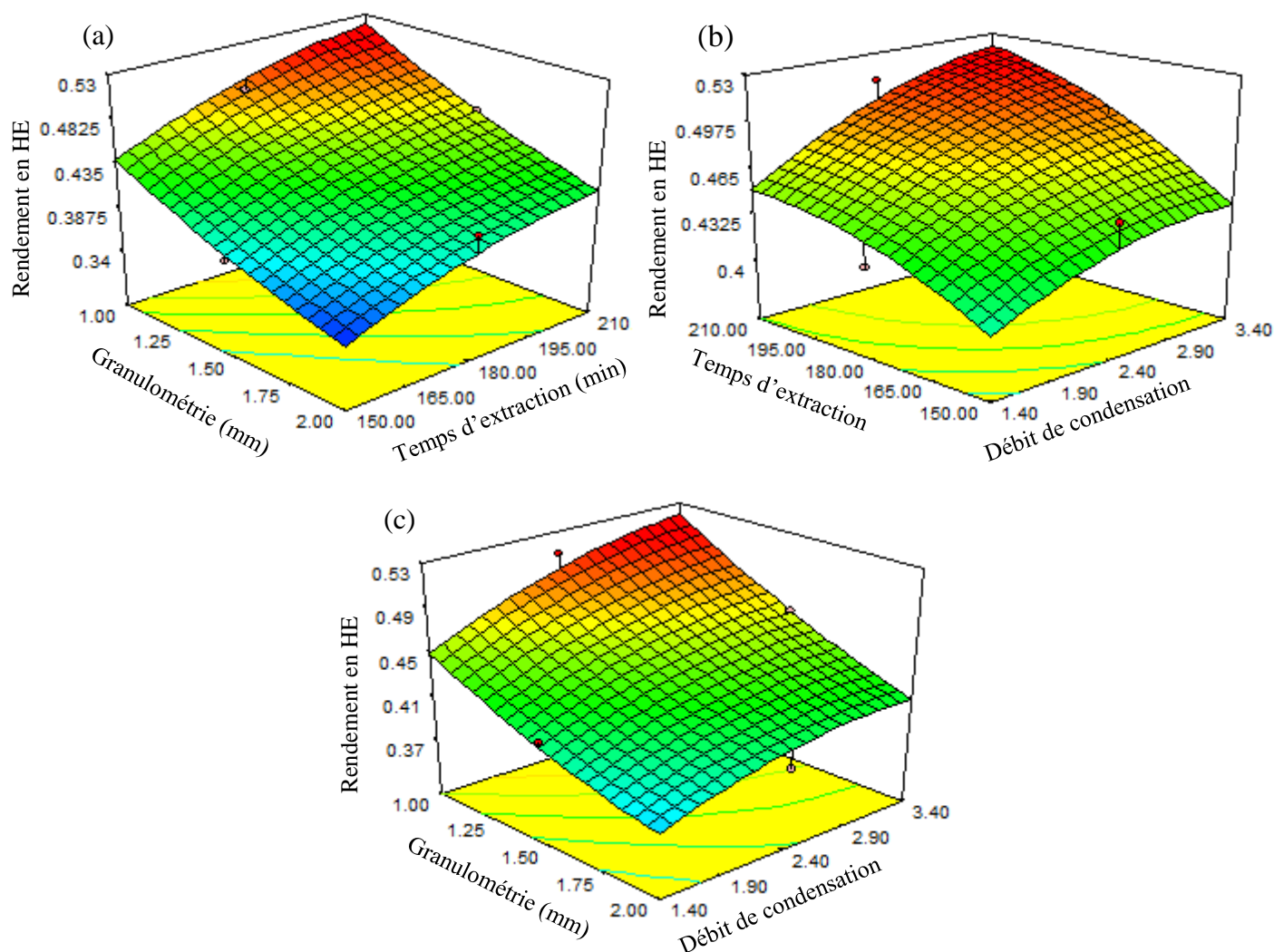


Figure V.4 : Surfaces de réponse pour montrer l'effet des paramètres d'hydrodistillation sur le % du rendement en huile d'*E. camaldulensis* : (a) temps d'extraction et granulométrie ; (b) débit de condensation et temps d'extraction ; (c) débit de condensation et granulométrie.

Les deux surfaces (a) et (b) de la figure V.4, mettent en évidence l'effet du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle. Elles montrent que l'augmentation du temps d'extraction engendre une augmentation du rendement d'huile quelque soient la granulométrie et le débit de condensation. En revanche, d'après la surface (b) et (c), l'augmentation du débit de condensation entraîne une augmentation du rendement massique. D'autre part, et contrairement aux deux premiers paramètres, l'augmentation du rendement en huile est remarquée par la diminution de la granulométrie. De ce fait, le rendement en huile est proportionnel au temps d'extraction et au débit de condensation, et inversement proportionnel à la granulométrie.

La lecture dans les surfaces de réponse nous a permis de connaître les domaines de variation des paramètres permettant d'atteindre le rendement désiré. Ainsi, l'obtention d'un

rendement optimal de 0.52% (valeur maximale accessible) nécessite un temps d'extraction de 210min, un débit de condensation de 3.4ml/min et une granulométrie de 1mm.

L'étude de la désirabilité va nous permettre de définir avec précision les valeurs optimisées des trois paramètres étudiés.

D-2) Étude de la désirabilité

L'objectif de notre étude est de maximiser le rendement en huile essentielle afin qu'il atteigne la valeur maximale accessible. La figure V.5 indique que l'atteinte de la valeur maximale du rendement est possible avec une désirabilité de l'ordre de 1, en assurant comme conditions opératoires, un temps d'extraction de 210min, un débit de condensation de 3.4ml/min et une granulométrie de 1mm.

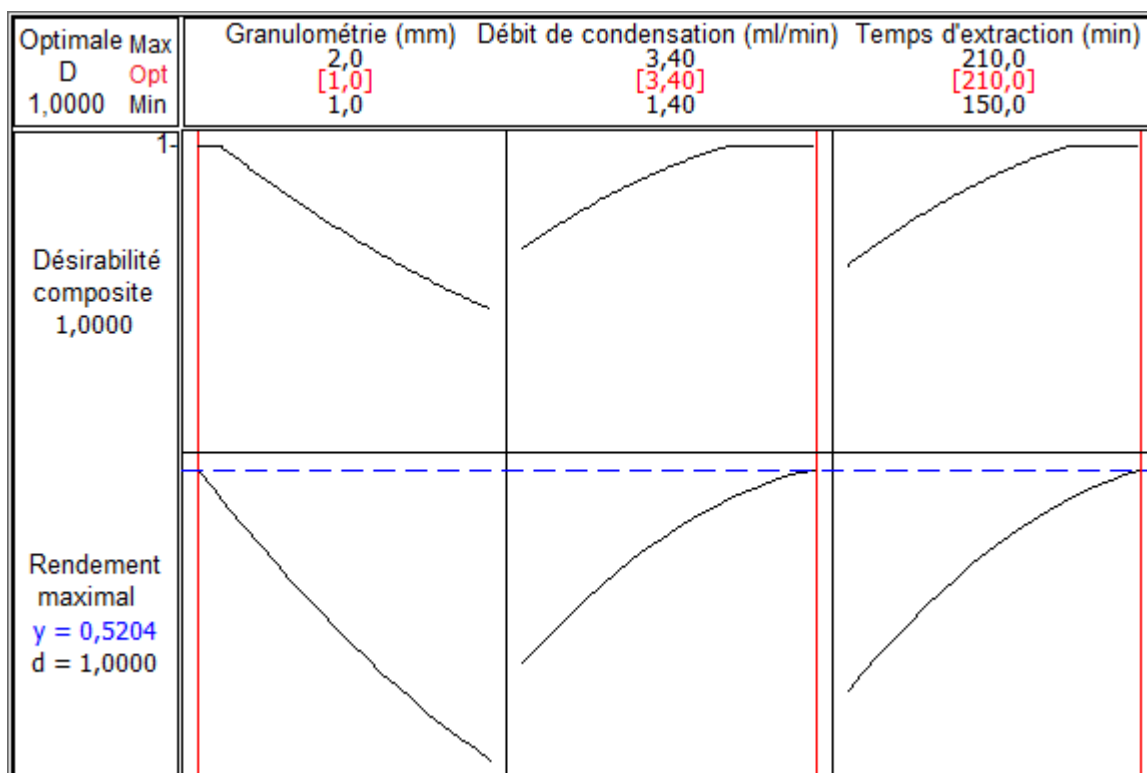


Figure V.5 : Profil de prévision des conditions optimales de l'hydrodistillation d'*E. camaldulensis*.

Ces résultats indiquent que l'obtention du rendement souhaité nécessite une augmentation du temps d'extraction, vers la borne en rouge à droite du domaine de variation de ce paramètre 210min. Bien évidemment, le temps influe directement sur l'opération d'hydrodistillation, et son impact sur cette opération a été prouvé par plusieurs auteurs [134].

L'augmentation du rendement est remarquée par la diminution de la granulométrie ; ceci peut être expliqué par la localisation des sites sécréteurs en profondeur dans le mésophylle (sites endogènes) qui sont impliqués. Dans ce cas, ce sont les espèces de la

famille des *Myrtaceae* [124]. En effet, le broyage augmente la surface de contact, et favorise la pénétration de l'eau dans les pores de la plante afin d'extraire la quasi-totalité des huiles essentielles.

Le débit de condensation influe proportionnellement sur le rendement en HE. Ce dernier atteint son maximum lorsque le débit de condensation est dans la borne supérieure du domaine de variation de 3.4ml/min. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que l'augmentation du débit de condensation est provoquée par l'augmentation de la température de chauffage, et donc, un maximum de température permet d'évaluer les poches sécrétrices qui contenant l'huile essentielle, et de l'entraîner vers le condenseur.

V.6.2 Modélisation de l'hydrodistillation d'HE de *S. officinalis*

A) Rendement expérimental

L'évaluation du rendement massique en huile essentielle obtenu par hydrodistillation démontre une valeur comprise entre 0.41% et 0.9% (Tableau V.6).

Tableau V.6 : Valeurs du rendement expérimental (*S. officinalis*).

Exp	x_1 : Granulométrie (mm)	x_2 : Débit de condensation (ml/min)	x_3 : Temps d'extraction (min)	Rendement expérimental (%)
1	1	1.4	180	0.59
2	2	1.4	180	0.9
3	1	3.4	180	0.68
4	2	3.4	180	0.67
5	1	2.4	150	0.59
6	2	2.4	150	0.69
7	1	2.4	210	0.67
8	2	2.4	210	0.84
9	1.5	1.4	150	0.56
10	1.5	3.4	150	0.41
11	1.5	1.4	210	0.71
12	1.5	3.4	210	0.46
13	1.5	2.4	180	0.6
14	1.5	2.4	180	0.62
15	1.5	2.4	180	0.62

La lecture dans les résultats expérimentaux montre que le rendement élevé (0.9%) a été obtenu pour une granulométrie de 2mm, débit de condensation de 1.4ml/min et un temps d'extraction de 180min. Une autre valeur de rendement, voisine de la précédente (0.84%) a été estimée dans les conditions suivantes : 2mm, 2.4ml/min et 210min. En revanche, nous avons enregistré un rendement relativement faible (0.41%) dans les

conditions opératoires suivantes : 1.5mm, 3.4ml/min et 150min de temps d'extraction, peut-être l'augmentation du débit de condensation influence négativement le rendement en huile essentielle.

B) Validation statistique du modèle

Nos résultats ont été testés statistiquement par l'analyse de variance (ANOVA). L'analyse a montré que les données expérimentales étaient très adaptées au modèle polynomial de second ordre. Les résultats affichés dans le tableau de l'analyse de la variance (Tableau V.7) indiquent que le modèle est significatif puisque la probabilité de la signification du risque p -value est inférieure à 0.05, et donc, il y a seulement 0.58% de chance pour que le modèle devienne invalide à cause du bruit.

Tableau V.7 : Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle quadratique (*S. officinalis*).

Source de variance	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	p -value
Model	0.21	9	0.023	0.0058*
x_1 : Granulométrie	0.041	1	0.041	0.0050*
x_2 : Débit de condensation	0.036	1	0.036	0.0063*
x_3 : Temps d'extraction	0.023	1	0.023	0.0156*
x_1x_2	0.026	1	0.026	0.0128*
x_1x_3	1.225E-003	1	1.225E-003	0.4456
x_2x_3	4.500E-003	1	4.500E-003	0.2902
x_1^2	0.062	1	0.062	0.0020*
x_2^2	4.001E-003	1	4.001E-003	0.1950
x_3^2	7.616E-003	1	7.616E-003	0.0940
Résidus	8.942E-003	5	1.788E-003	
Défaut d'ajustement	8.675E-003	3	4.892E-003	0.0444*
Erreur pure	4.667E-004	2	1.333E-004	
Total	0.22	14		
R^2	0.9589			
CV (%)	6.6			

*Termes significatifs, p -value <0,05.

En outre, le modèle ne présente pas un manque d'ajustement puisque la probabilité de la signification du risque de termes « défaut d'ajustement » (p -value=0.0444) est aussi inférieure à 0.05 donc on peut dire que le modèle est bien ajusté. Par conséquent, le modèle peut être utilisé pour naviguer dans tout l'espace du domaine expérimental. L'analyse de variance indique que les termes x_1 , x_2 , x_3 , x_1x_2 et x_1^2 sont des termes significatifs (p -value <0.05). Mais, le reste des termes est statistiquement insignifiant (x_1x_3 , x_2x_3 , x_2^2 , et x_3^2).

Un coefficient de variation (CV) de $6.6\% < 10\%$ montre un degré de précision élevé entre les valeurs expérimentales et prédites. Un coefficient de détermination $R^2=95,89\%$ est suffisant et donne une bonne concordance entre les valeurs expérimentales et les valeurs prévues du modèle adapté.

La courbe représentative des valeurs des rendements prévus en fonction des rendements expérimentaux est montrée sur la figure V.6, où on constate (d'après le graphe) que le nuage des points ne s'éloigne pas de la droite d'équation ($y=x$), ce qui indique que le modèle a une bonne qualité descriptive.

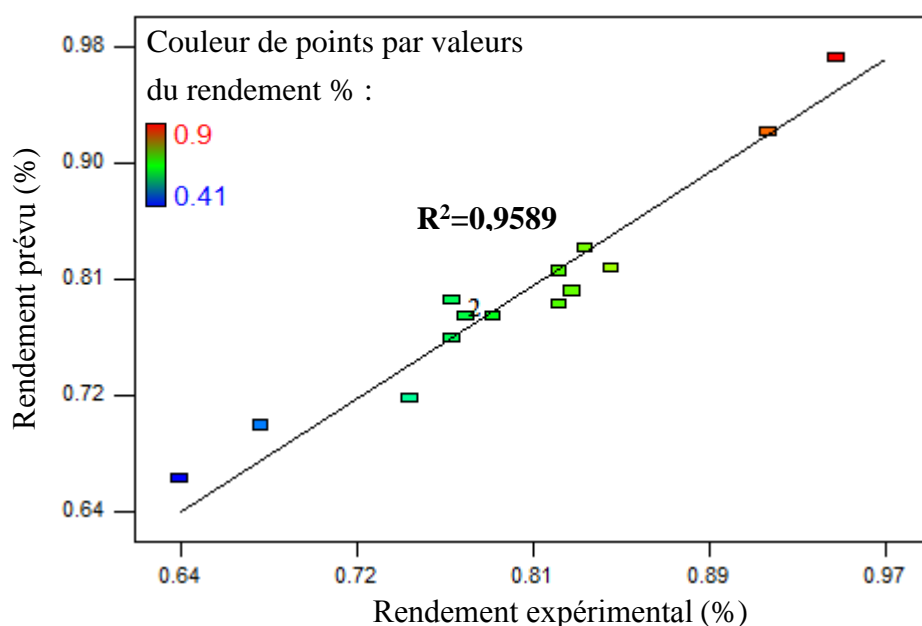


Figure V.6 : Représentation du rendement prévu d'HE de *S. officinalis* en fonction du rendement expérimental.

C) Modèle mathématique retenu

Le rendement expérimental est utilisé pour déterminer les valeurs des coefficients de régression du modèle (Tableau V.8).

Tableau V.8 : Coefficients de régression du modèle (*S. officinalis*).

Coefficient	Valeur	Coefficient	Valeur
β_0	-1.04027	β_{22}	-0.032917
β_1	-1.23850	β_{33}	$-5.04630.10^{-5}$
β_2	0.48050	β_{12}	-0.16000
β_3	0.020208	β_{13}	$1.16667.10^{-3}$
β_{11}	0.51833	β_{23}	$-8.33333.10^{-4}$

Le modèle mathématique retenu est donné par l'équation (04) suivante :

$$Y(\%) = 0.51833x_1^2 - 0.032917x_2^2 - 5.04630 \cdot 10^{-5}x_3^2 - 0.16000x_1x_2 + 1.16667 \cdot 10^{-3}x_1x_3 - 8.33333 \cdot 10^{-4}x_2x_3 - 1.23850x_1 + 0.48050x_2 + 0.020208x_3 - 1.04027 \quad (04)$$

D) Optimisation des paramètres

En réalisant le plan d'expérience relatif à cette plante, nous avons enregistré expérimentalement un rendement maximal avec une valeur de 0,9%. Le but sera de déterminer les paramètres opératoires optimaux afin d'avoir un rendement meilleur (valeur maximale accessible) que celui de l'expérience.

D-1) Surfaces de réponse

La figure V.7 représente les diagrammes de surface de réponse pour l'effet des interactions mutuelles des paramètres sur le rendement d'huile, qui peut être observé à partir de la nature de la courbure des surfaces de réponse.

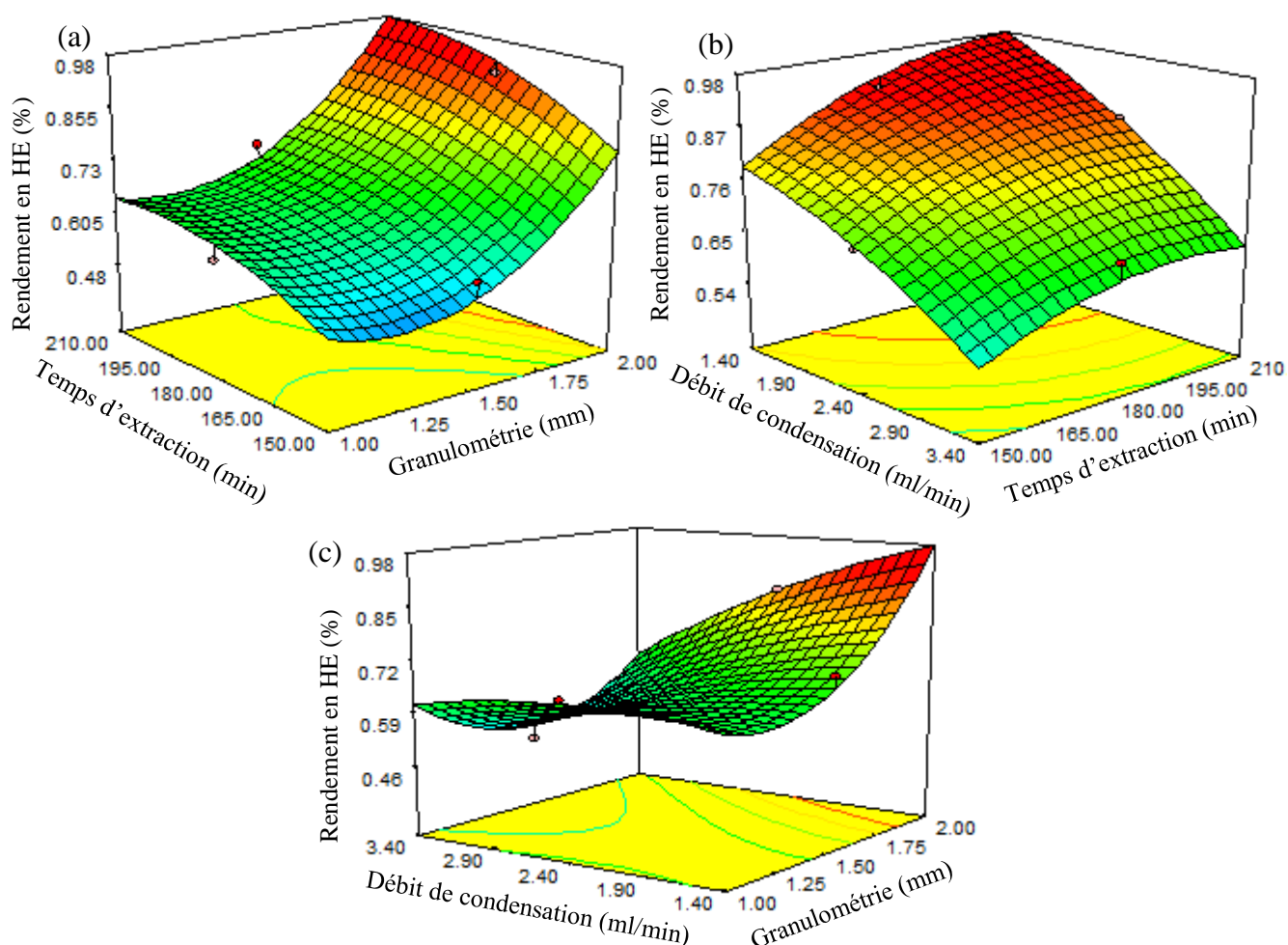


Figure V.7 : Surfaces de réponse pour montrer l'effet des paramètres d'hydrodistillation sur le % de rendement en huile de *S. officinalis* : (a) temps d'extraction et granulométrie ; (b) débit de condensation et temps d'extraction ; (c) débit de condensation et granulométrie.

Les surfaces (a) et (b) mettent en évidence l'effet du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle. Elles montrent que l'augmentation du temps d'extraction engendre une augmentation du rendement d'huile quels que soient la granulométrie et le débit de condensation. En outre, d'après les deux surfaces (a) et (c), l'augmentation de la granulométrie engendre une forte augmentation du rendement. D'autre part, et contrairement aux deux premiers paramètres, l'augmentation du rendement est remarquée par la diminution du débit de condensation (surfaces b et c). D'après l'interprétation des 3 surfaces, on constate que le rendement en huile est proportionnel au temps d'extraction et au diamètre des particules, et inversement proportionnel au débit de condensation.

La lecture dans les surfaces de réponse nous a permis de connaître les domaines de variation des paramètres permettant d'atteindre le rendement désiré. Ainsi, l'obtention d'un rendement optimal de 0.98% (valeur maximale accessible) nécessite un temps d'extraction : 210min, un débit de condensation de 1.4ml/min et une granulométrie de 2mm.

D-2) Étude de la désirabilité

La figure V.8 indique que l'atteinte de la valeur maximale du rendement est possible avec une désirabilité de l'ordre de 1, en assurant comme conditions opératoires un temps d'extraction de 210min, un débit de condensation de 1.4ml/min et une granulométrie de 2mm.

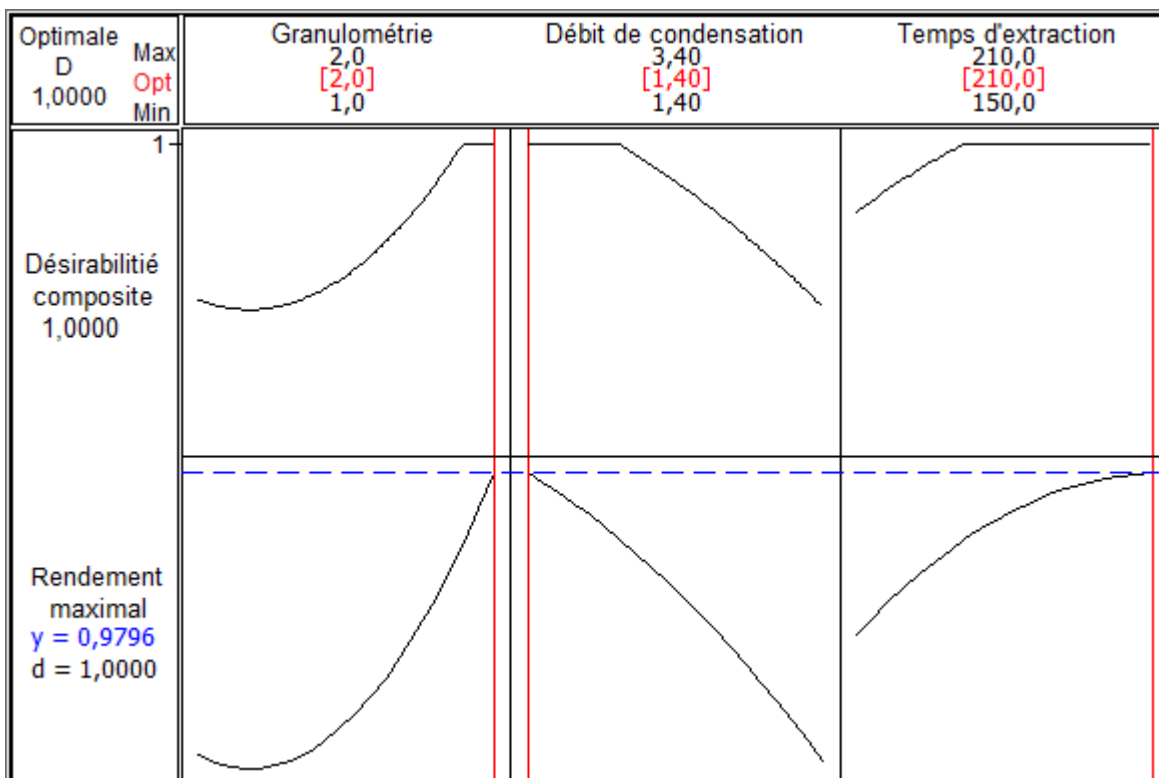


Figure V.8 : Profil de prévision des conditions optimales de l'hydrodistillation de *S. officinalis*.

Ces résultats indiquent que l'obtention du rendement souhaité, nécessite une augmentation du temps d'extraction vers la borne en rouge à droite du domaine de variation de ce paramètre de 210min. Bien évidemment, le temps influe directement sur l'opération d'hydrodistillation, et son impact sur cette opération a été prouvé par plusieurs auteurs [134].

L'augmentation du rendement est remarquée par l'augmentation de la granulométrie ; ceci est peut-être dû à la localisation des glandes productrices des métabolites dans les tissus de cette plante. Pour les *lamiacées*, les huiles essentielles sont stockées au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante, telles que les poils sécréteurs [134], et ne nécessitent donc pas un fort broyage pour les extraire.

Le dernier paramètre (débit de condensation) influe inversement sur le rendement en huile essentielle. Ce dernier atteint son maximum lorsque le débit de condensation est dans la borne inférieure du domaine de variation de 1.4ml/min. Ce phénomène peut être expliqué par le fait qu'une importante augmentation de la température de chauffage, augmente le débit de condensation et minimise le temps de séjour du condensat dans le condenseur, et ne laisse pas le temps aux huiles essentielles d'être séparées du liquide.

V.6.3 Modélisation de l'hydrodistillation d'HE d'*R. chalepensis*

A) Rendement expérimental

D'après les résultats expérimentaux (tableau V.9), on constate que la valeur du rendement la plus élevée (0.81%) a été enregistrée pour deux expériences (8 et 12) ayant le même temps d'extraction de 210min et un diamètre des particules avec un débit de condensation de 2mm et 2.4ml/min, 1.5mm et 3.4ml/min respectivement. La plus petite valeur du rendement (0.49%) est enregistrée dans l'expérience 5 dans les conditions opératoires suivantes : 1mm, 2.4ml/min et 150min de temps d'extraction.

Tableau V.9 : Valeurs du rendement expérimental (*R. chalepensis*).

Exp	x_1 Diamètre des particules (mm)	x_2 Débit de condensation (ml/min)	x_3 Temps d'extraction (min)	Rendement expérimental (%)
1	1	1.4	180	0.62
2	2	1.4	180	0.69
3	1	3.4	180	0.68
4	2	3.4	180	0.78
5	1	2.4	150	0.49
6	2	2.4	150	0.69
7	1	2.4	210	0.61
8	2	2.4	210	0.81
9	1.5	1.4	150	0.57
10	1.5	3.4	150	0.72
11	1.5	1.4	210	0.7
12	1.5	3.4	210	0.81
13	1.5	2.4	180	0.71
14	1.5	2.4	180	0.72
15	1.5	2.4	180	0.72

B) Validation statistique du modèle

Les résultats de la modélisation ont été testés statistiquement par analyse de variance (tableau V.10). L'analyse a montré que les données expérimentales étaient très adaptées au modèle polynomial de second ordre. Les résultats de l'analyse montrent que le modèle est significatif puisque la probabilité de la signification du risque p -value est inférieure à 0.05. Il y a seulement 2.58% de chance pour que le modèle devient invalide à cause du bruit.

En revanche, le modèle ne présente pas un manque d'ajustement vu que la probabilité de la signification du risque de terms « défaut d'ajustement » (p -value=0.0121) est aussi inférieure à 0,05, et donc, on peut dire que le modèle est bien ajusté. Par conséquent, le modèle peut être utilisé pour naviguer dans tout l'espace du domaine expérimental.

L'analyse de variance indique aussi que les termes du modèle x_1 , x_2 et x_3 sont des termes significatifs (p -value <0.05). Cependant, le reste des termes est statistiquement insignifiant (x_1x_2 , x_1x_3 , x_2x_3 , x_1^2 , x_2^2 , et x_3^2). D'autre part, un coefficient de variation (CV) de 5.9% < 10% indique un degré de précision très élevé entre les valeurs expérimentales et prédites [99]. Le coefficient de détermination $R^2=92.21\%$ est suffisant et cette valeur donne une bonne compatibilité entre les valeurs expérimentales et les valeurs prévues du modèle adapté.

Tableau V.10 : Analyse de variance (ANOVA) pour le modèle quadratique (*R. chalepensis*).

Source	Somme des carrés	Ddl	Carré moyen	<i>p</i> -value
Model	0.098	9	0.011	0.0258*
x_1 : Diamètre des particules	0.041	1	0.041	0.0042*
x_2 : Débit de condensation	0.021	1	0.021	0.0160*
x_3 : Temps d'extraction	0.026	1	0.026	0.0103*
x_1x_2	2.250E-004	1	2.250E-004	0.7269
x_1x_3	0.000	1	0.000	1.0000
x_2x_3	4.000E-004	1	4.000E-004	0.6432
x_1^2	5.078E-003	1	5.078E-003	0.1396
x_2^2	6.160E-004	1	6.160E-004	0.5677
x_3^2	3.231E-003	1	3.231E-003	0.2204
Résidus	8.242E-003	5	1.648E-003	
Défaut d'ajustement	8.175E-003	3	2.725E-003	0.0121*
Erreur pure	6.667E-005	2	3.333E-005	
Total	0.11	14		
R^2	0,9221			
CV (%)	5,9			

*Termes significatifs, *p*-value <0,05.

La courbe représentative des valeurs des rendements prévus en fonction des rendements expérimentaux est montrée sur la figure V.9 et on remarque d'après le graphe que le nuage des points n'est pas loin de la droite d'équation ($y=x$), ce qui montre que le modèle a une bonne qualité descriptive.

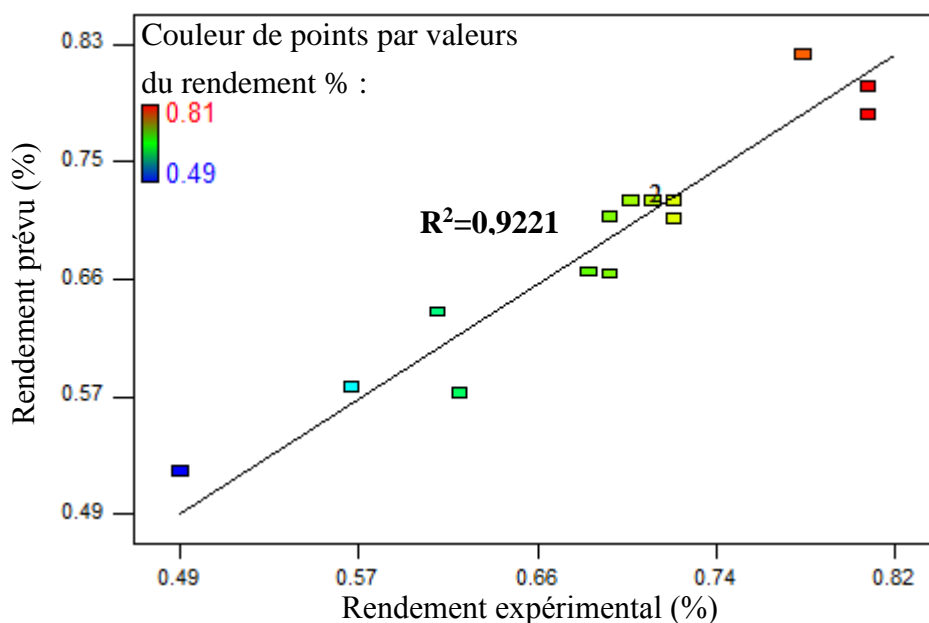


Figure V.9 : Représentation du rendement prévu d'HE de *R. chalepensis* en fonction du rendement expérimental.

C) Modèle mathématique retenu

Le rendement expérimental est utilisé pour déterminer les valeurs des coefficients de régression du modèle (Tableau V.11).

Tableau V.11 : Coefficients de régression du modèle (*R. chalepensis*).

Coefficient	Valeur	Coefficient	Valeur
β_0	-1.37943	β_{22}	0.012917
β_1	0.55150	β_{33}	$-3.28704 \cdot 10^{-5}$
β_2	0.026750	β_{12}	0.015000
β_3	0.014550	β_{13}	0.000000
β_{11}	-0.14833	β_{23}	$-3.33333 \cdot 10^{-4}$

Avec toutes les combinaisons possibles des trois paramètres le modèle mathématique retenu est donné par l'équation (05) suivante :

$$Y(\%) = -0.14833x_1^2 + 0.012917x_2^2 - 3.28704 \cdot 10^{-5}x_3^2 + 0.015000x_1x_2 - 3.33333 \cdot 10^{-4}x_2x_3 + 0.55150x_1 + 0.026750x_2 + 0.014550x_3 - 1.37943 \dots (05)$$

D) Optimisation des paramètres

Expérimentalement, nous avons enregistré un rendement maximal avec une valeur de 0.81%. De même manière, par l'étude de surfaces de réponse et la désirabilité nous allons chercher les conditions opératoires optimales qui mènent à la valeur maximale accessible.

D-1) Surfaces de réponse

La figure V.10 représente les diagrammes de surface de réponse pour l'effet des paramètres sur le rendement d'HE de *R. chalepensis*, qui peut être observé à partir de la nature de la courbure des surfaces de réponse.

Les deux surfaces ; (a) et (b) de la figure V.10 mettent en évidence l'effet du temps d'extraction sur le rendement en HE. Elles montrent que le rendement massique d'huile essentielle augmente au cours du temps d'extraction quel que soit la granulométrie et le débit de condensation. D'autre part, Il apparaît au vu de la surface (a) et (c), que l'augmentation de la granulométrie engendre une forte augmentation du rendement. En outre, la même situation aux deux premiers paramètres, s'observe dans la surface (b) et (c), où on note l'augmentation du rendement par l'augmentation du débit de condensation.

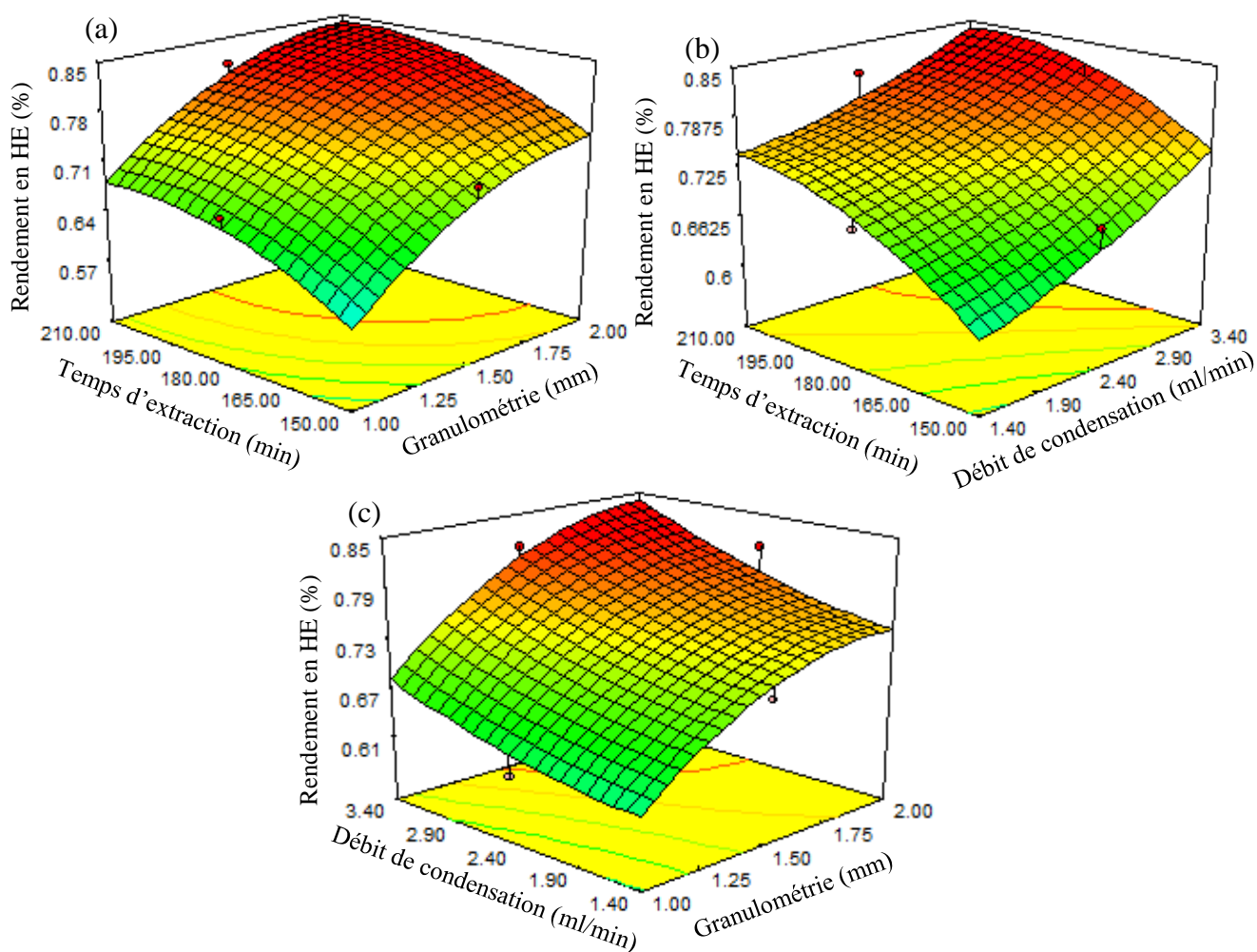


Figure V.10 : Surfaces de réponse pour montrer l'effet des paramètres d'hydrodistillation sur le % de rendement en huile de *R. chalepensis* : (a) temps d'extraction et granulométrie ; (b) débit de condensation et temps d'extraction ; (c) débit de condensation et granulométrie.

Il ressort de l'interprétation des 3 surfaces que le rendement en huile est proportionnel aux trois paramètres étudiés : le temps d'extraction, le diamètre des particules et le débit de condensation. Ainsi, la perspicacité dans ces surfaces nous amène à dire que la granulométrie est la grandeur la plus significative comme paramètre influençant sur le processus plus que le débit de condensation et le temps d'extraction. Elle a un effet très évident sur la variation du rendement.

La lecture dans les surfaces de réponse nous a permis de connaître les domaines de variation des paramètres permettant d'atteindre le rendement désiré. Ainsi, l'obtention d'un rendement optimal 0.84% (la valeur maximale accessible) nécessite un temps d'extraction de 210min, un débit de condensation de 3.4ml/min et une granulométrie de 2mm.

D-2) Étude de la désirabilité

La figure V.11 indique que l'atteinte de la valeur maximale du rendement 0.84% est possible avec une désirabilité de l'ordre de 1, en assurant comme conditions opératoires une granulométrie de 2mm, un débit de condensation de 3.4ml/min et 204min.

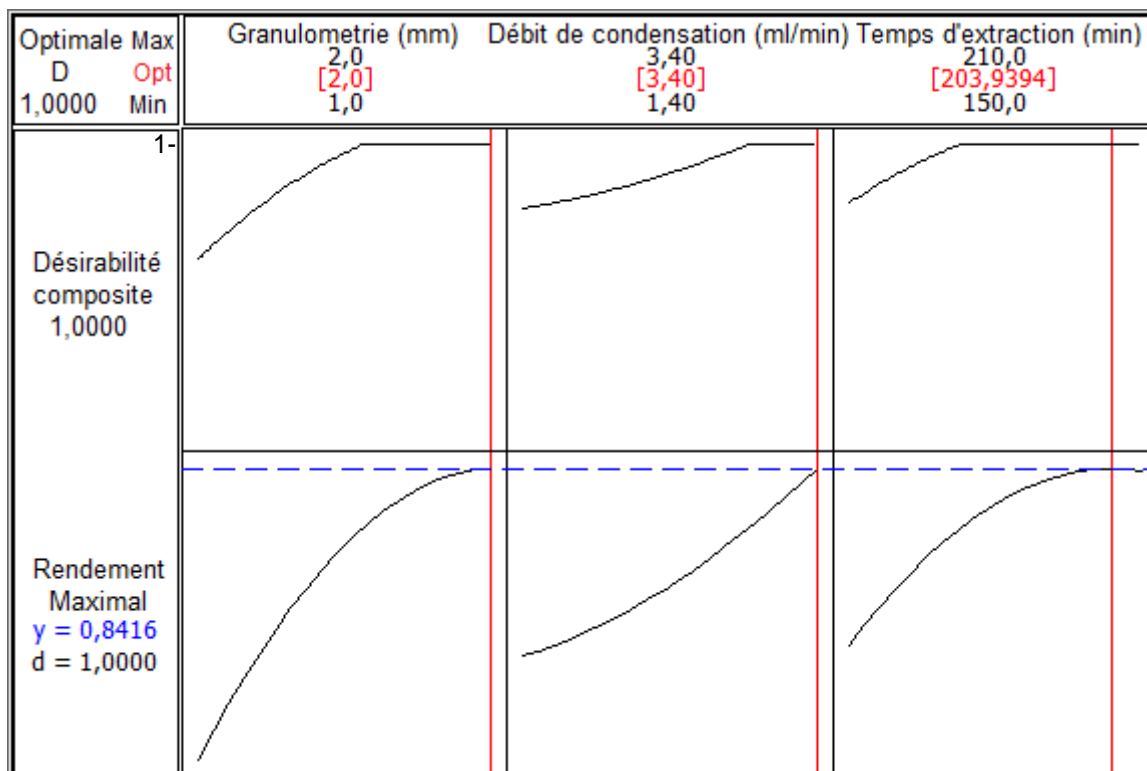


Figure V.11 : Profil de prévision des conditions optimales de l'hydrodistillation de *R. chalepensis*.

Ces résultats indiquent que l'obtention du rendement souhaité nécessite une augmentation du temps d'extraction vers la borne en rouge, à droite du domaine de variation de ce paramètre de 210min. Bien évidemment, le temps influe directement sur l'hydrodistillation, et son impact sur l'opération a été prouvé par plusieurs auteurs [134].

L'augmentation aussi du rendement est remarquée par l'augmentation de la granulométrie, et ceci est peut-être dû à la localisation des glandes productrices des métabolites dans les tissus de cette plante. En effet, plusieurs huiles essentielles sont stockées au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante, telles que les poils sécréteurs, et ne nécessitent donc pas un fort broyage pour les extraire.

Le dernier paramètre (débit de condensation) influe proportionnellement sur le rendement en huile essentielle. Le rendement dernier atteint son maximum lorsque le débit de condensation est dans la borne supérieure du domaine de variation de 3.4ml/min. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que l'augmentation du débit de condensation fait

suite à l'augmentation de la température de chauffage et, donc, un maximum de température permet d'éclater les poches sécrétrices contenant l'huile essentielle, et l'entraîner vers le condenseur.

V.7 Conclusion

L'application de la méthodologie de surface de réponse nous a permis d'optimiser le processus d'hydrodistillation de l'huile essentielle de trois espèces végétales : *Eucalyptus camaldulensis*, *Salvia officinalis* et *Ruta chalepensis*.

Le rendement prévu en huile essentielle de chaque espèce est exprimé par un modèle polynomial de second ordre dépendant des termes linéaires β_1 , β_2 et β_3 , des termes quadratiques β_{11} , β_{22} et β_{33} relatifs aux facteurs granulométrie, débit de condensation et temps d'extraction respectivement, des termes d'interaction β_{12} , β_{13} et β_{23} relatifs à l'interaction granulométrie/débit de condensation, granulométrie/ temps d'extraction et de l'interaction débit de condensation/temps d'extraction.

Les coefficients de détermination (R^2) enregistrés sont : 0.9313, 0.9589 et 0.9221 pour l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis* respectivement. Ces valeurs proches à 1 montrent la bonne concordance entre les résultats expérimentaux et théoriques. Ainsi, les valeurs de la probabilité de la signification du risque (p -value) des trois modèles sont : 0.0193, 0.0058 et 0.0258 inférieur à 0.05 pour l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis* respectivement. Ces résultats de l'analyse montrent que tous les modèles développés sont bien adaptés aux données expérimentales.

Finalement, la modélisation de l'hydrodistillation des huiles essentielles nous amène à une extraction plus efficace. Après optimisation des paramètres d'extraction, nous avons pu obtenir des rendements massiques meilleurs, et par conséquent, avec des quantités d'HEs plus importantes en assurant les conditions opératoires suivantes pour chaque espèce :

- *E. camaldulensis* : $Y=0.52\%$, une granulométrie de 1mm, un débit de condensation de 3.4ml/min et un temps d'extraction de 210min ;
- *S. officinalis* : $Y=0.98\%$, une granulométrie de 2mm, un débit de condensation de 1.4ml/min et un temps d'extraction de 210min ;
- *R. chalepensis* : $Y=0.84\%$, une granulométrie de 2mm, un débit de condensation de 3.4ml/min et un temps d'extraction de 204min.

**TROISIÈME PARTIE : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE ET
ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES : EFFET DE
SYNERGIE**

CHAPITRE VI : ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

VI.1 Introduction

La sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine humaine et animale sont remises en cause depuis plusieurs années ; la preuve est que cette situation de résistance aux antibiotiques de plus en plus répandue et complexe est rapportée par plusieurs auteurs [172]. Cela justifie l'intérêt grandissant porté aux huiles essentielles des plantes médicinales, dont l'efficacité antimicrobienne n'est pas seulement évaluée à travers le composant principal (majoritaire), cependant cette activité dépend aussi des composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est d'évaluer qualitativement et quantitativement l'activité antimicrobienne des trois huiles essentielles sur quinze souches bactériennes, par la méthode de diffusion sur gélose, et par la méthode de dilution qui vise à déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), et le type de l'activité (bactéricide ou bactériostatique).

VI.2 Antibiotiques et résistance microbienne

Les antibiotiques sont, par définition, des produits microbiens, ou leurs dérivés, capables de tuer les microorganismes sensibles ou d'inhiber leur croissance (Prescott et al, 1995). Leur action est spécifique et dirigée contre les microorganismes. L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de « bactériostatiques », alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits « bactéricides ».

VI.2.1 Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique. Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des micro-organismes [173].

Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Presque toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un âge d'or, qui s'est étendu de 1936 à 1962 (figure VI.1).

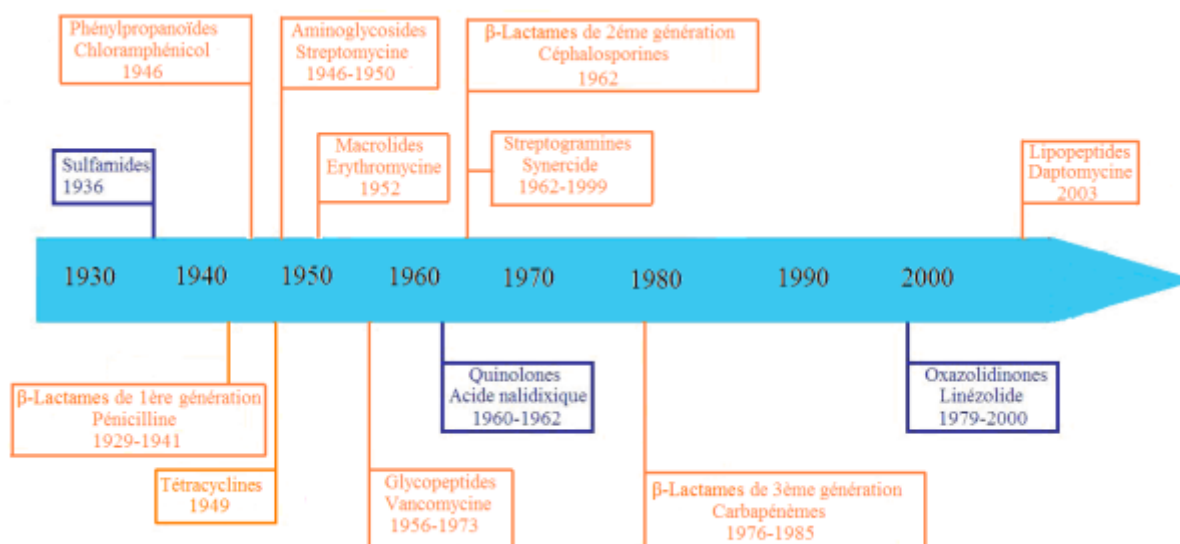


Figure VI.1 : Premières découvertes cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique [60].

La pénicilline, premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium* sp, marque le début de l'ère antibiotique. Elle appartient à la classe des β -lactames. Sa découverte a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les phénylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogramines et les β -lactames de deuxième génération. Une troisième génération de β -lactames a été commercialisée à la fin des années 1970 : les carbapénèmes.

Il existe seulement trois classes d'antibiotiques synthétiques. La première classe est représentée par les sulfamides, qui sont aussi les premiers antibiotiques à avoir été utilisés cliniquement (1936). La seconde classe, les quinolones (ou fluoroquinolones), a été découverte lors de la synthèse de la chloroquine, un antipaludéen, en 1962. Les oxazolidinones représentent la troisième classe d'antibiotiques synthétiques découverte en 1979, et celle-ci ont conduit au développement et à la commercialisation du linézolide en 1999.

VI.2.2 Résistance aux antibiotiques

Les résistances s'étendent quantitativement mais aussi qualitativement. Depuis plus de 20 ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrits avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes.

La sélection de bactéries résistantes et multirésistantes aux antibiotiques est due à l'usage généralisé des antibiotiques et à la forte adaptabilité des souches bactériennes. En effet, toutes les cellules réagissent aux perturbations extérieures de manière à préserver les aspects fondamentaux de leurs identités. La confrontation à un antibiotique représente du

point de vue des bactéries, un formidable stimulus d'évolution [174]. Il existe deux types de résistances aux antibiotiques : la résistance naturelle et la résistance acquise.

a) Résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible, sont autant de facteurs qui conditionnent la résistance naturelle.

b) Résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes.

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes, mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine [60]. La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation.

VI.2.3 Risque de résistance aux antibiotiques

L'impact de cette multirésistance aux antibiotiques est important au niveau clinique, en termes de morbidité et de mortalité, mais aussi sur le plan économique, car les infections liées aux bactéries multi-résistantes engendrent des coûts d'hospitalisation élevés 30000\$ ou 21550€ [175]. L'extension géographique des résistances se produit au niveau international et dans le milieu de vie. Les infections causées par les bactéries résistantes et multi-résistantes, autrefois cantonnées au milieu hospitalier, deviennent communautaires (extrahospitalières). Ainsi, le nombre de personnes, susceptibles d'être exposées à ces bactéries, est continuellement démultiplié [60].

VI.3 Rôle des plantes dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques

Face à ces résistances, un intérêt majeur est porté aux plantes aromatiques et médicinales dont les propriétés antimicrobiennes sont dues essentiellement à la composition cocktail des huiles essentielles. Au cours de la dernière décennie, plusieurs recherches cliniques mettent en évidence une activité antimicrobienne de multiples huiles essentielles, et ces dernières sont des mélanges d'hydrocarbures saturés et insaturés, d'alcool, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des oxydes, des phénols et des terpènes, qui peuvent produire des propriétés thérapeutiques [21].

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est liée à sa composition chimique, est en particulier, à la nature de ses composants volatils majeurs dont certains présentent diverses modes d'action, et différentes cibles, avec un risque de développement de résistance probablement plus faible qu'avec les antibiotiques [176].

Les nouveaux composés actifs sont recherchés dans les plantes médicinales, car celles-ci constituent une source potentielle de composés antimicrobiens et/ou inhibiteurs des mécanismes de résistances aux antibiotiques. En effet, de nombreux composés d'origine végétale ont déjà démontré des propriétés antimicrobiennes ; ces composés agissent suivant plusieurs mécanismes [174] :

- Formation de complexes avec des macromolécules telles que les protéines et les polysaccharides, inhibant ainsi les fonctions microbiennes (polyphénols) ;
- Rupture de membranes microbiennes (flavonoïdes, terpénoïdes)
- Inhibition de l'adhésion de protéines microbiennes aux récepteurs polysaccharidiques de l'hôte (polypeptides).

Les plantes médicinales fournissent également des composés qui n'ont pas nécessairement un effet direct sur les microorganismes, mais qui augmentent ou restaurent l'activité des antibiotiques, en inhibant les mécanismes de résistance. Ces composés appartiennent à diverses classes phytochimiques, et agissent comme inhibiteurs (flavonoïdes, terpénoïdes, alcaloïdes) [174].

VI.4 Techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro*

La détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Cependant, des difficultés pratiques liées à l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations, et des problèmes de standardisation des méthodes, peuvent avoir une influence sur les résultats. Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et de la nature du contact de l'huile

essentielle avec le germe. La majorité des chercheurs ont employé une des trois analyses suivantes : diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon [31]. Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses, et n'exigent pas un équipement de laboratoire sophistiqué.

Une première étape consiste à faire un dépistage « screening » ou une sélection des huiles ayant un effet antibactérien potentiel. Il s'agit d'une étude préliminaire qualitative.

Une seconde étape consiste à calculer quantitativement le degré d'activité antibactérienne des HEs sélectionnées en déterminant la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de ces huiles.

VI.4.1 Techniques de screening des huiles essentielles

VI.4.1.1 Technique de l'aromatogramme

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (figure VI.2) [177]. Cet examen est équivalent à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences préalablement sélectionnées et reconnues ; et cette méthode consiste à utiliser des boîtes de pétri contenant un milieu gélosé convenable. Après ensemencement de la souche bactérienne à tester sur le milieu gélosé, des disques en papier de 6mm, auparavant imbibé d'HE à examiner, sont alors placés en surface de la gélose [178]. Après incubation, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition.

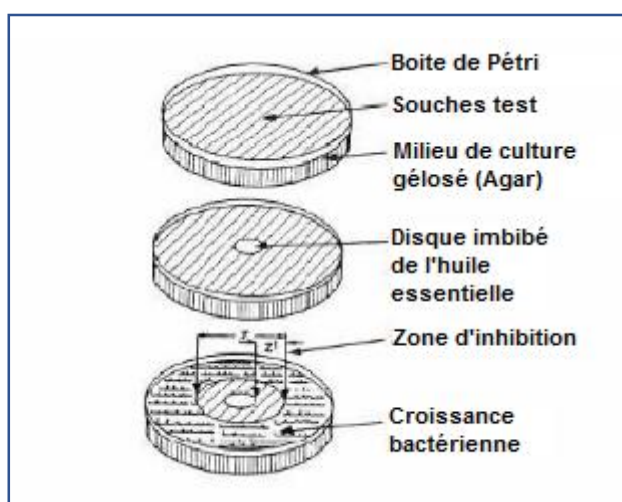


Figure VI.2 : Technique de l'aromatogramme.

VI.4.1.2 Technique de diffusion en puits

Une autre technique de diffusion sans disque, où un puits (d'environ 6mm) est creusé dans la gélose dans laquelle sera coulée une quantité d'huile essentielle brute ou diluée. Après incubation, des zones d'inhibition de croissance bactérienne sont obtenues (pour les huiles actives) et mesurées.

VI.4.1.3 Technique de diffusion en phase vapeur

Cette technique est appelée « Méthode de micro-atmosphères » [179]. Dans cette méthode, les disques imprégnés par l'huile essentielle sont déposés au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant l'incubation (couvercle en bas). Le disque n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé, et la boîte est hermétiquement fermée. Il se produit une évaporation des substances volatiles, et la lecture des résultats de ce test porte sur la croissance ou non de l'inoculum, se traduisant par un halo qui sera mesuré par un pied à coulisse (figure VI.3).

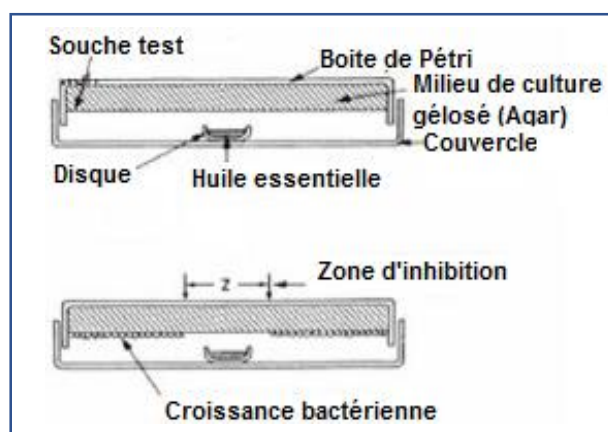


Figure VI.3 : Technique de diffusion en phase vapeur « micro-atmosphères ».

VI.4.2 Techniques de détermination de la CMI des huiles essentielles

Les méthodes par dilution ont pour but d'évaluer les concentrations minimales inhibitrices. Elles consistent à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme [180,181].

VI.4.2.1 Technique de dilution en milieu liquide

La technique de dilution en milieu liquide est utilisée aussi pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices. Une gamme de dilution de l'huile essentielle est additionnée à une série de tubes contenant un milieu de culture liquide, de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées, et incubation dans les

mêmes conditions, la concentration minimale inhibitrice est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée, c'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'est observée dans le milieu [182].

VI.4.2.2 Technique de dilution en milieu solide (Agar)

La technique de dilution en milieu solide (Agar) ou incorporation en milieu solide, est plus économique que celle qui se pratique sur milieu liquide, parce qu'elle a beaucoup d'avantages : un grand nombre de souches peuvent être testées immédiatement, la contamination est facilement détectée et le milieu liquide peut contenir des matériaux opaques. Elle consiste à réaliser des dilutions des huiles essentielles, et les incorporer dans le milieu gélosé fondu et refroidi à 45°C, et à tester sur ce milieu les souches bactériennes à étudier [183,184]. Ces souches bactériennes sontensemencées à la surface, soit en stries avec une anse calibrée soit en point avec des pipettes pasteurs.

VI.5 Etude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites

Dans cette partie de l'étude, nous avons choisi d'évaluer l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Salvia officinalis* L. et *Ruta chalepensis* L. par deux méthodes : la méthode de diffusion en milieu solide, appelée aromatogramme et la méthode de dilution en milieu solide (incorporation). Ces deux méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses, facilement reproductibles et ne nécessitent pas un équipement de laboratoire sophistiqué.

Cette étude a été achevée au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine de Annaba.

VI.5.1 Origine et choix de souches bactériennes

Les tests antibactériens ont été effectués sur des souches bactériennes cliniques, des souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) et une levure. On a essayé d'élargir la gamme de bactéries testées à Gram positif et à Gram négatif.

Bactéries

- **À Gram - :** *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* Cip®, *Escherichia coli* BLSE (beta-lactamase à spectre élargie) positive, KpC⁻ (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase négative), KpC⁺, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* VIM2 et *Acinetobacter* sp.

- **À Gram + :** *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Bacillus cereus*.

Levure

Candida albicans.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine de Annaba.

VI.5.2 Milieux de culture et conservation des souches

Selon les méthodes employées, nous avons utilisé deux milieux de cultures, à savoir : la gélose nutritive (milieu d'isolement et de conservation) et la gélose Mueller-Hinton (milieu utilisé pour les tests). Les souches bactériennes ont été conservées à la température ambiante dans des tubes stériles contenant 7ml de gélose nutritive inclinée.

VI.5.3 Préparation des suspensions bactériennes

L'activité antibactérienne a été réalisée sur des souches bactériennes jeunes et en phase de croissance exponentielle. Dans 5ml de l'eau physiologique stérile à 0.9% NaCl, 3 à 5 colonies similaires sont déchargées à l'aide d'une anse de platine. La suspension bactérienne est bien homogénéisée au vortex jusqu'à obtenir une opacité équivalente à 0.5Mc Farland (10^6 - 10^8 UFC/ml).

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 et l'inoculum doit être ensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

VI.5.4 Screening des huiles essentielles extraites (Aromatogramme)

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne des huiles essentielles à tester ; elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique utilisée est une modification de la méthode de l'antibiogramme où les disques d'antibiotiques sont remplacés par des disques imbibés d'huile essentielle.

Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur le milieu solide dans une boîte de Pétri. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflètent l'impact des huiles essentielles sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de résistantes, sensibles ou très sensibles.

✓ Préparation des dilutions des huiles essentielles

Une série de dilution des huiles essentielles a été réalisée allant de l'huile brute jusqu'à 1/16 dans le solvant organique Diméthylsulfoxyde (DMSO). On a adopté pour le DMSO son innocuité vis-à-vis des microorganismes, et pour l'absence d'interférence avec les huiles essentielles [131].

✓ Ensemencement

Dans des boîtes de Pétri, le milieu de culture gélosé Mueller-Hinton (MH) en surfusion a été coulé aseptiquement à raison de 20ml par boîte. Après la solidification, un écouvillon stérile a été imbibé dans la suspension bactérienne et essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, sans oublier de le faire pivoter afin de le décharger au maximum.



Figure VI.4 : Coulage du milieu MH et ensemencement des suspensions bactériennes.

La démarche suivante est d'étaler en frottant l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose, de haut en bas en stries serrées, à trois reprises. On répète l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois en tournant l'écouvillon sur lui-même, pour avoir une distribution égale de l'inoculum. Toute l'opération à partir du coulage du milieu gélosé jusqu'à ensemencement, a été effectuée en conditions aseptiques devant un *bec bunsen* (figure VI.4).

✓ Dépôt des disques

Les disques stériles imprégnés de différentes dilutions d'huiles essentielles ont été déposés à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose. Des disques témoins imbibés seulement par le DMSO ont été réalisés et mis au centre des boîtes.

✓ Incubation

Pour toutes les souches bactériennes testées les boîtes ont été préparées et incubées (couvercle en bas) pendant 24h à 37°C.

✓ Expression des résultats

L'activité antibactérienne lorsqu'elle existe, est évaluée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des disques chargés d'huile essentielle, à l'aide d'un pied à coulisse. D'après Celikel et Kavas [185], la sensibilité à l'huile a été classée suivant le diamètre des halos d'inhibition :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm.

VI.5.5 Quantification de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites

✓ Détermination des CMI des huiles essentielles

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration en présence de laquelle, aucune croissance bactérienne similaire à la croissance de la même souche sur la boîte témoin. Nous avons déterminé les CMI des huiles essentielles sur les souches bactériennes par la méthode d'incorporation en milieu solide (gélose), selon Amrouni et ses collaborateurs [176].

Une gamme de dilution des huiles essentielles testées a été réalisée dans 2ml de Diméthylsulfoxyde (DMSO) et les dilutions obtenues sont additionnées (incorporées) à 18ml du milieu Mueller-Hinton (MH) préalablement fondu et refroidi à 45°C, de façon à obtenir une série de dilution finale de : 2%, 1.75%, 1.5%, 1.25%, 1%, 0.75%, 0.5% et 0.25% d'huile essentielle par millilitre de milieu de culture. Ensuite les milieux obtenus sont coulés dans des boîtes de Pétris et le DMSO est utilisé comme contrôle négatif (figure VI.5).

Des spots de 2µL de différent inoculum standardisé au 0.5Mc Farland, sont déposés à la surface des milieux préalablement coulés sur des boîtes de Pétris à l'aide d'une pipette Pasteur. Toutes les boîtes sont incubées dans l'étuve et à 37°C pendant 24h. Des boîtes de culture témoins sans huile sontensemencées et incubées dans les mêmes conditions.

✓ Détermination du type d'activité : (bactéricide/bactériostatique)

Le type d'activité antibactérienne des HEs vis-à-vis des souches bactériennes a été déterminé par la méthode d'ensemencement par stries en milieu nutritif gélosé, [158,186]. Les repiquages ont été effectués à partir des différents spots utilisés pour déterminer les CMI, dépourvus de bactéries, puis déposés en stries sur gélose nutritive pour toutes les souches (figure VI.5).

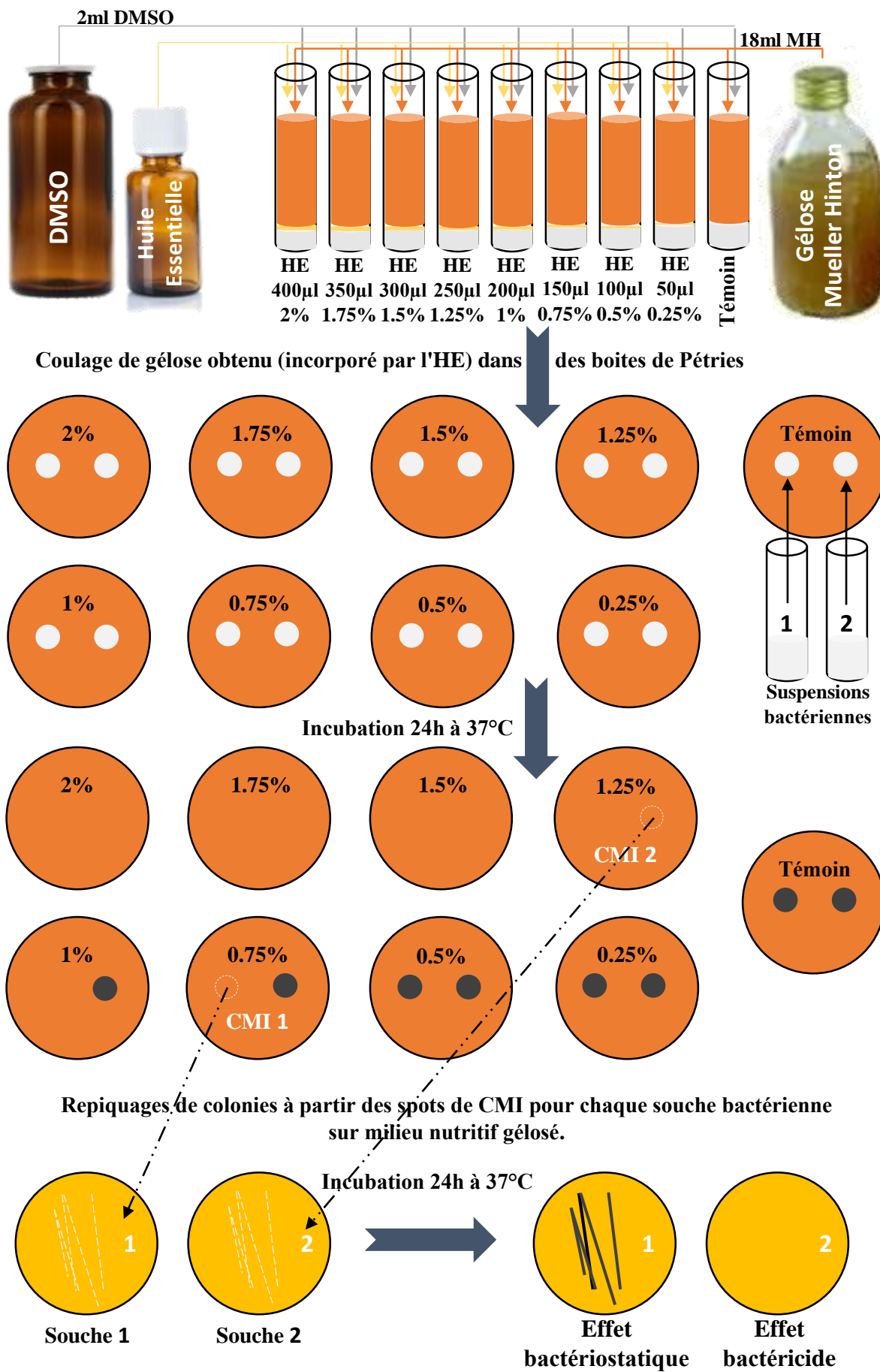


Figure VI.5 : Schéma descriptif de la technique suivie, pour la quantification de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (CMI), et leurs types d'activité.

- S'il y a croissance bactérienne, l'huile essentielle a un effet bactériostatique sur les souches testées.
- S'il y a absence de croissance, l'huile essentielle présente un effet bactéricide vis-à-vis des souches testées.

La technique utilisée pour la quantification de l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites et leur type d'activité, est détaillée par la figure ci-dessus (figure VI.5).

VI.6 Etude de la synergie des huiles essentielles extraites

Afin d'améliorer l'activité antibactérienne de nos huiles essentielles, on a proposé d'étudier leur potentiel synergique, dont les souches bactériennes testées sont celles qui présentent une certaine résistance aux huiles essentielles telles que : *P. aeruginosa* ATCC 27853, *KpC⁻* et *KpC⁺*.

L'association a été effectuée entre chaque deux huiles essentielles, et on obtient trois mélanges binaires (*E. camaldulensis* + *S. officinalis*, *E. camaldulensis* + *R. chalepensis* et *S. officinalis* + *R. chalepensis*). La synergie entre les huiles essentielles a été révélée par Isobolmethod, par la détermination de l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire, "Fractional inhibitory concentration index" (FICI) [128,187] selon l'équation suivante :

$$\text{FICI} = \text{FIC HE1} + \text{FIC HE2}$$

* FIC HE1 = CMI HE1 en présence d'HE2 / CMI HE1 seule.

* FIC HE2 = CMI HE2 en présence d'HE1 / CMI HE2 seule.

Le test a été réalisé sur milieu gélosé MH, additionné de différentes concentrations sub-inhibitrices des huiles essentielles enregistrées contre chacune des trois souches bactériennes sélectionnées. La détermination de la valeur de FICI permet de juger s'il existe un effet synergique entre les huiles essentielles combinées vis-à-vis des souches examinées :

- La combinaison des deux HEs est considérée comme synergique lorsque la valeur du FICI est inférieure ou égale à 0.5 ;
- Elle est non significative lorsque la valeur est comprise entre 0.5 et 1 ;
- La combinaison est antagoniste lorsque le FICI est supérieur ou égal à 1.

VI.7 Résultats

L'action des huiles essentielles des trois plantes médicinales s'exerce sur un large spectre de bactéries, incluant les bactéries à Gram positif, les bactéries à Gram négatif et *candida albicans*, y compris des souches de références et des souches cliniques. Les résultats de l'étude sont présentés qualitativement et quantitativement.

VI.7.1 Test d'aromatogramme

Le potentiel antibactérien des huiles essentielles a été testé qualitativement par la méthode de l'aromatogramme. La sensibilité des souches se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour des disques (figure VI.6). Nous rappelons que les disques appliqués contiennent l'huile essentielle à différentes dilutions.

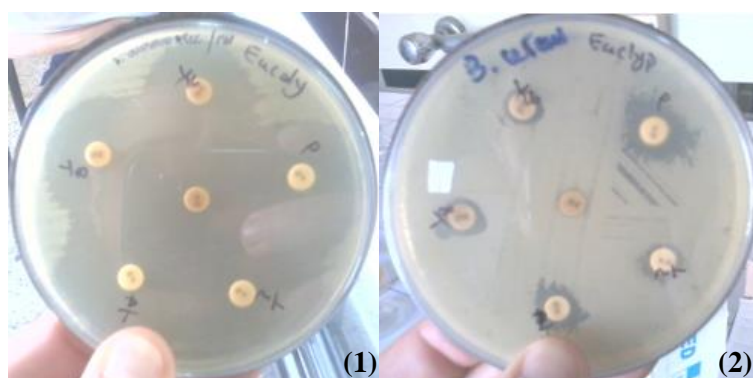


Figure VI.6 : Zones d'inhibition d'huile essentielle d'*E camaldulensis* vis-à-vis de *Bacillus cereus* (2) et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (1).

A l'issue de l'essai, on enregistre pour l'huile essentielle d'*E camaldulensis* une large activité antibactérienne, dont 85.33% des tests entrepris (figure VI.7). Les diamètres des zones d'inhibitions varient de 7mm à 39.2mm (tableau VI.1). La moyenne des valeurs des zones d'inhibition oscille dans un intervalle très restreint. Ceci témoigne d'une constance d'activité de la drogue testée, même diluée jusqu'au 1/16.

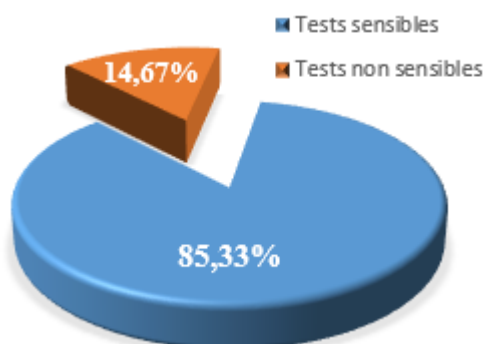


Figure VI.7 : Sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle d'*E camaldulensis*.

Toutes les souches exposées montrent une sensibilité plus ou moins importante à l'exception de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2, qui présente une résistance totale à l'huile essentielle d'*E camaldulensis*, situation qui, par ailleurs, s'observe avec toutes les espèces bacilles à Gram négatif non fermentants. L'effet antibactérien le plus important de l'huile essentielle d'*E camaldulensis* est enregistré sur les Cocci à Gram positif et *Candida albicans*. L'huile est moins active sur les Bacilles à Gram négatif, dont les souches extrêmement sensibles sont : *S. aureus* ATCC 25923 (20.75mm), *S. aureus* ATCC 43300 (39.2mm), *Serratia marcescens* (30.6mm) et *Candida albicans* (21.5mm).

Tableau VI.1 : Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*.

		Les bactéries	Ø d'inhibition (mm)				
			Brut	1/2	1/4	1/8	1/16
BGN	Fermentaire	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12.5	11.8	9.8	8.6	8.5
		<i>Escherichia coli</i> Cip®	9.6	10	8.7	8.6	/
		<i>Escherichia coli</i> BLSE positive	16.55	15.87	14.5	13.9	13
		KpC ⁻	15.25	9.4	/	/	/
		KpC ⁺	14.1	11.25	10.8	9.1	9.9
		<i>Serratia marcescens</i>	31.1	30.6	26.2	24.6	16.2
	NF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	9.25	7.4	7	/	/
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM2	/	/	/	/	/
		<i>Acinetobacter</i> sp.	10	10	10	9	8
CGP	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	24	18.8	20.75	17.3	17.5	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	39.2	37.4	34.6	31.5	27.1	
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	15.35	11.5	10.7	10	9.8	
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	18.5	17.7	18	14.1	11.3	
BGP	<i>Bacillus cereus</i>	19	12	10	10	9	
Levure	<i>Candida albicans</i>	25	21.5	19.6	17.8	16	

Cip®=ciprofloxacine résistant, BLSE= beta-lactamase a spectre élargie ; (NF)=Non Fermentaire ; KpC= *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase négative ; ATCC= American type culture collection ; (BGP)= Bacille à Gram positif ; (CGP)=Cocci à Gram Positif.

Concernant l'huile essentielle de *S. officinalis*, les résultats de l'aromatogramme sont regroupés dans le tableau VI.2. D'après les valeurs enregistrées, exclusivement 64% des tests ont montré une sensibilité à l'huile essentielle de *S. officinalis* aux différentes dilutions (figure VI.8), excepté pour *S. aureus* ATCC 43300 qui montre une résistance totale. Les zones d'inhibitions varient entre 7mm à 27.8mm. Les micro-organismes les plus sensibles sont : *E. coli* BLSE (27.8mm), KpC⁻ (25.3mm), *Candida albicans* (20mm), suivie par *S. aureus* ATCC 25923 (19.3mm) et *S. aureus* MRSA (18mm).

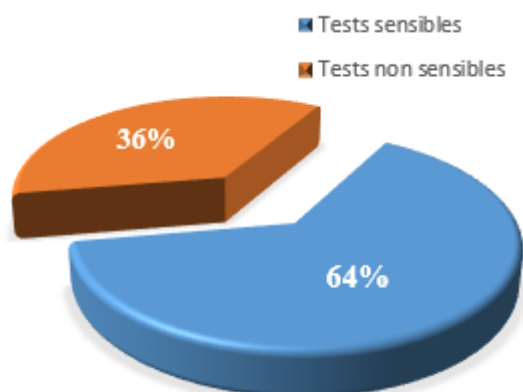


Figure VI.8 : Sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle de *S. officinalis*.

Tableau VI.2 : Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *Salvia officinalis*.

		Les bactéries	Ø d'inhibition (mm)				
			Brut	1/2	1/4	1/8	1/16
BGN	Fermentaire	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8.8	/	/	/	/
		<i>Escherichia coli</i> Cip®	14.15	8.8	8.6	7.3	/
		<i>Escherichia coli</i> BLSE positive	27.8	27	8	/	/
		<i>KpC</i> ⁻	10.6	13.8	25.3	18.6	/
		<i>KpC</i> ⁺	10	/	/	/	/
		<i>Serratia marcescens</i>	15.6	15.4	13.55	11.55	6.4
	NF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11.1	6.8	7.2	/	/
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM2	12	8.3	8.1	8.2	/
		<i>Acinetobacter</i> sp.	9	/	/	/	/
CGP	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	19.3	16.25	14.9	16.25	8.95	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	/	/	/	/	/	
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	18.75	18	15	14.5	10	
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	13.3	12.2	10	10	10.8	
BGP	<i>Bacillus cereus</i>	9.6	8	/	/	/	
Levure	<i>Candida albicans</i>	20	15.55	14.5	13.25	12	

Cip®=ciprofloxacine résistant, BLSE= beta-lactamase a spectre élargie ; (NF)=Non Fermentaire ; *KpC*⁻= *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase négative ; ATCC= American type culture collection ; (BGP)= Bacille à Gram positif ; (CGP)=Cocci à Gram Positif.

Finalement, l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* a montré une activité antibactérienne moins importante sur l'ensemble des bactéries testées, comparativement à celles d'autres plantes (tableau VI.3) dont seulement 57.33% des tests ont été adoptés (figure VI.9). Les diamètres des zones d'inhibition varient de 7mm à 30.8mm.

Les résultats de l'aromatogramme témoignent que les souches *S. aureus* ATCC 43300, *Serratia marcescens* et *Candida albicans* ont été les plus sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle de *R. chalepensis*, avec des zones d'inhibition de 30.8mm, 27.2mm et 21.8mm.

Contrairement aux souches de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* Cip et *S. aureus* MRSA qui présentent une résistance totale à l'huile essentielle de *R. chalepensis*.

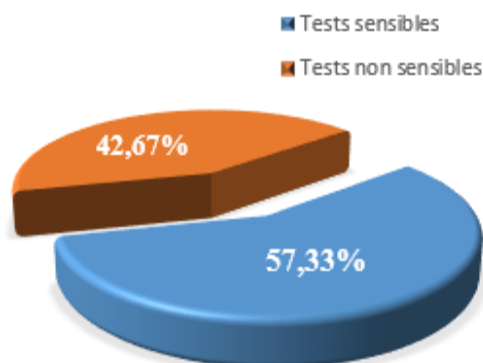


Figure VI.9 : Sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'huile essentielle de *R. chalepensis*.

Tableau VI.3 : Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis*.

		Les bactéries	Ø d'inhibition (mm)				
			Brut	1/2	1/4	1/8	1/16
BGN	Fermentaire	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	/	/	/	/	/
		<i>Escherichia coli</i> Cip®	/	/	/	/	/
		<i>Escherichia coli</i> BLSE positive	12.1	11.8	8.1	/	9.3
		<i>KpC</i> ⁻	10.5	/	/	/	/
		<i>KpC</i> ⁺	9.75	7.5	8.9	8.8	/
		<i>Serratia marcescens</i>	27.2	24.8	10.8	9.7	8.8
	NF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10.9	8.6	9.4	10.1	10
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM2	9.6	9.2	/	/	/
		<i>Acinetobacter</i> sp.	9.55	/	/	/	/
CGP	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8.25	/	/	/	/	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	30.8	20.8	20	16.9	16	
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	/	/	/	/	/	
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	11.7	9.8	10.05	/	8.5	
BGP	<i>Bacillus cereus</i>	13.35	8.2	8.2	9.7	8	
Levure	<i>Candida albicans</i>	21.8	17	18.75	18.45	14.8	

Cip®=ciprofloxacine résistant, BLSE= beta-lactamase a spectre élargie ; (NF)=Non Fermentaire ; *KpC*⁻ = *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase négative ; ATCC= American type culture collection ; (BGP)= Bacille à Gram positif ; (CGP)=Cocci à Gram Positif.

Les trois huiles essentielles testées ont présenté un large spectre d'action, agissant aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. D'après les zones d'inhibition générées, l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* présente la meilleure activité sur l'ensemble des souches testées. L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *S. officinalis* reste modérée tandis que celle de *R. chalepensis* est la plus faible.

On note que seule la souche *P. aeruginosa* VIM-2 présente une résistance totale à l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*, et montre une faible sensibilité observée avec des

concentrations élevées pour l'huile essentielle de *S. officinalis* et *R. chalepensis*. Les deux souches *Candida albicans* et *Serratia marcescens* sont plus sensibles aux trois huiles essentielles testées.

Généralement, l'activité antibactérienne est proportionnelle à la concentration de l'huile essentielle appliquée. Plus l'huile est concentrée, plus la zone d'inhibition est étendue, ce qui indique la diminution de la croissance bactérienne.

L'analyse qualitative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de l'aromatogramme, nous amène à sélectionner les souches sensibles aux huiles essentielles testées, pour l'analyse quantitative par la technique d'incorporation en milieu solide (Agar).

VI.7.2 Détermination des CMI et du type d'activité

L'analyse quantitative de l'activité antibactérienne est portée sur 13 souches de bactéries, exclusivement de *Serratia marcescens* et *S. aureus* ATCC 43300. La CMI est définie comme la plus faible concentration en présence de laquelle, aucune croissance bactérienne similaire à la croissance de la même souche sur la boîte témoin (figure VI.10).

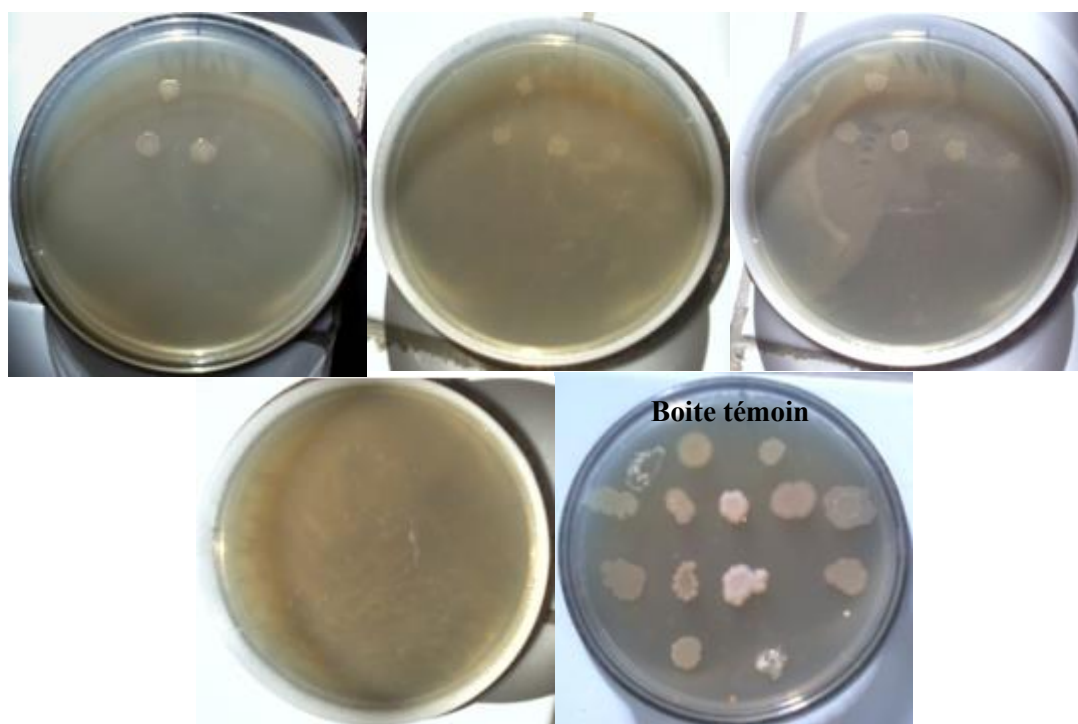


Figure VI.10 : Lecture des CMI des huiles essentielles.

L'ensemble des concentrations minimales inhibitrices obtenues sont consignées dans le tableau VI.4. L'étude a prouvé des valeurs de CMI relativement élevées pour les trois huiles : ce qui témoigne d'un pouvoir antibactérien modéré.

L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* reste toutefois la plus active comme indique l'histogramme de la figure VI.11, dont les valeurs des CMI's apparaissent toujours inférieures ou égales à celles des deux autres plantes.

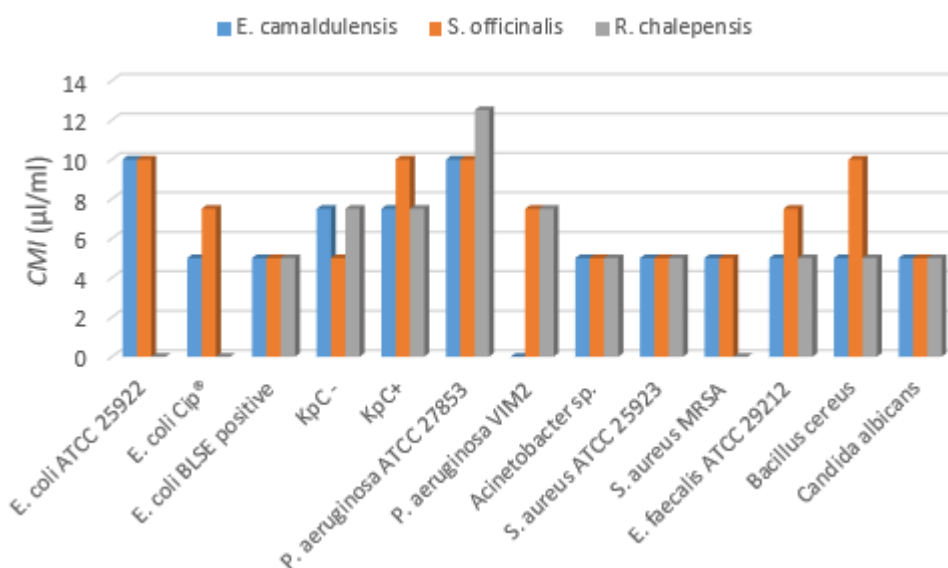


Figure VI.11 : Concentrations minimales inhibitrices des trois huiles essentielles, vis-à-vis des souches testées.

Tableau VI.4 : Valeurs des CMI's et type d'activité des trois huiles essentielle sur les souches testées.

CMI									
Souches bactériennes	<i>E. camaldulensis</i>			<i>S. officinalis</i>			<i>R. chalepensis</i>		
	%	µl/ml	T. A	%	µl/ml	T. A	%	µl/ml	T. A
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	10	Bcc	1.5	15	Bcc	/	/	/
<i>E. coli</i> Cip®	0.5	5	Bcc	0.75	7.5	Bcc	/	/	/
<i>E. coli</i> BLSE positive	0.5	5	Bcs	0.5	5	Bcc	0.5	5	Bcs
<i>Klebsiella pC</i> ⁻	0.75	7.5	Bcs	0.75	7.5	Bcs	0.75	7.5	Bcs
<i>KpC</i> ⁺	0.75	7.5	Bcs	1	10	Bcs	0.75	7.5	Bcs
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1	10	Bcs	1	10	Bcs	1.25	12.5	Bcs
<i>P. aeruginosa</i> VIM2	/	/	/	0.75	7.5	Bcs	0.75	7.5	Bcs
<i>Acinetobacter</i> sp.	0.5	5	Bcc	0.5	5	Bcc	0.5	5	Bcc
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.5	5	Bcc	0.5	5	Bcs	0.5	5	Bcc
<i>S. aureus</i> MRSA	0.5	5	Bcc	0.5	5	Bcc	/	/	/
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.5	5	Bcc	0.75	7.5	Bcc	0.5	5	Bcs
<i>Bacillus cereus</i>	0.5	5	Bcc	1	10	Bcs	0.5	5	Bcc
<i>Candida albicans</i>	0.5	5	Bcc	0.5	5	Bcc	0.5	5	Bcc

T. A : Type d'activité antibactérienne ; Bcc : Effet bactéricide ; Bcs : Effet bactériostatique.

Au début, l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* a montré souvent un effet sur la croissance bactérienne à la dilution de 0.5%, ce qui convient à la concentration de 5µl/ml auprès de la plupart des souches testées, à savoir : *E. coli* Cip, *E. coli* BLSE positive,

Acinetobacter sp, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA, *E. faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*. La valeur de CMI la plus élevée a été enregistrée chez les deux souches, *E. coli* ATCC 25922 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 où l'efficacité de l'huile essentielle n'a pu être observée qu'à la dilution de 1%, soit 10µl/ml.

En revanche, l'huile essentielle de *S. officinalis*, malgré son potentiel antibactérien qui est relativement plus petit que celui d'*E. camaldulensis*, présente un effet antibactérien contre la moitié des souches bactériennes à 0.5% d'huile, telles que : *E. coli* BLSE positive, *KpC*⁻, *Acinetobacter sp*, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA et *Candida albicans*. La plus grande valeur de CMI remarquée chez la souche *E. coli* ATCC 25922 avec une dilution de 1.5%, ce qui correspond à 15µl/ml.

L'huile essentielle de *R. chalepensis* a manifesté un effet inhibiteur jusqu'à la dilution de 0.5%, et ce, vis-à-vis des souches : *E. coli* BLSE positive, *Acinetobacter sp.*, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* et *Candida albicans*. Des valeurs de CMI plus élevées (0.75%) ont été enregistrées avec *P. aeruginosa* VIM2, *KpC*⁻ et *KpC*⁺, suivies par *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui montre la plus grande valeur de CMI (1.25% ou 12.5µl/ml).

La figure VI.12 met en évidence le type d'effet antibactérien exercé par chaque huile essentielle sur l'ensemble des souches testées. L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* montre un effet bactéricide sur la majorité des souches (66.66%), une situation qui a été observée inversement avec l'huile essentielle de *R. chalepensis*, présentant presque le même pourcentage (60%) avec un effet bactériostatique. En outre, l'effet de l'HE de *S. officinalis* reste modéré, où elle a un effet bactéricide vis-à-vis 53.85% des souches, et un effet bactériostatique vis-à-vis le reste des souches 46.15%.

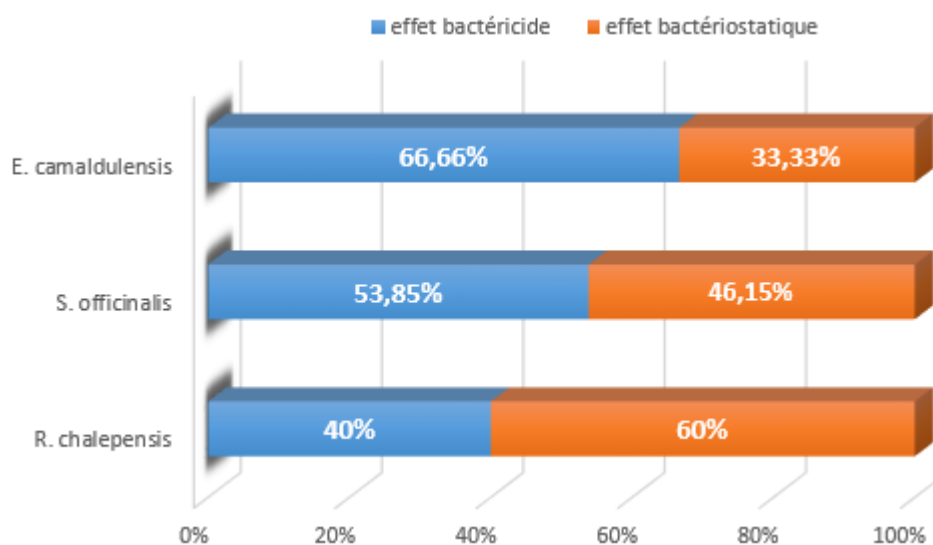


Figure VI.12 : Type d'effet antimicrobien des trois huiles essentielles vis-à-vis des souches testées.

VI.7.3 Effet synergique entre les huiles essentielles extraites

Les résultats du calcul de l'indice FIC de différentes combinaisons des huiles essentielles contre les trois souches bactériennes, sont représentés dans les trois tableaux (VI.5, VI.6 et VI.7).

La combinaison entre l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* et de *S. officinalis* montre une bonne synergie contre la souche bactérienne *KpC*⁺ et *P. aeruginosa* ATCC 27853, à l'exception de *KpC*⁻ qui présente un effet antagoniste contre la même combinaison des huiles essentielles (tableau VI.5).

Tableau VI.5 : Potentiel synergique entre l'HE d'*E. camaldulensis* et de *S. officinalis*.

HEs Souches	CMI <i>E. camaldulensis</i> (µl/ml)			CMI <i>S. officinalis</i> (µl/ml)			Indice FIC
	Seule	Combiner	FIC	Seule	Combiner	FIC	
<i>KpC</i> ⁻	7.5	3.75	0.5	7.5	3.75	0.5	1
<i>KpC</i> ⁺	7.5	1.875	0.25	10	2.5	0.25	0.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	2.5	0.25	10	2.5	0.25	0.5

CMI : Concentration minimale inhibitrice. FIC : Concentration inhibitrice fractionnelle.

En combinant l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* et de *R. chalepensis*, on montre un effet synergique seulement contre la souche bactérienne *P. aeruginosa* ATCC 27853 (tableau VI.6).

Tableau VI.6 : Potentiel synergique entre l'HE d'*E. camaldulensis* et de *R. chalepensis*.

HEs Souches	CMI <i>E. camaldulensis</i> (µl/ml)			CMI <i>R. chalepensis</i> (µl/ml)			Indice FIC
	Seule	Combiner	FIC	Seule	Combiner	FIC	
<i>KpC</i> ⁻	7.5	3.75	0.5	7.5	3.75	0.5	1
<i>KpC</i> ⁺	7.5	3.75	0.5	7.5	1.875	0.25	0.75
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	2.5	0.25	12.5	3.125	0.25	0.5

CMI : Concentration minimale inhibitrice. FIC : Concentration inhibitrice fractionnelle.

Aucune action de synergie n'a été révélée entre l'huile essentielle de *S. officinalis* et de *R. chalepensis* vis-à-vis des trois souches testées (tableau VI.7).

Tableau VI.7 : Potentiel synergique entre l'HE de *S. officinalis* et de *R. chalepensis*.

HEs Souches	CMI <i>S. officinalis</i> (µl/ml)			CMI <i>R. chalepensis</i> (µl/ml)			Indice FIC
	Seule	Combiner	FIC	Seule	Combiner	FIC	
<i>KpC</i> ⁻	7.5	3.75	0.5	7.5	3.75	0.5	1
<i>KpC</i> ⁺	10	10	1	7.5	1.875	0.25	1.25
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10	2.5	0.25	12.5	6.25	0.5	0.75

CMI : Concentration minimale inhibitrice. FIC : Concentration inhibitrice fractionnelle.

Des résultats des indices FIC rapportés dans les trois tableaux on note qu'il n'existe aucun effet synergique contre la souche bactérienne *KpC*⁻ quelle que soit l'association effectuée.

VI.8 Discussion

L'effet antibactérien a été évalué afin de valoriser trois espèces (*Salvia officinalis*, *Eucalyptus camaldulensis* et *Ruta chalepensis*) répandues dans notre région à l'East Algérien. Nous rappelons que l'intérêt de ces espèces à inhiber les micro-organismes diffère d'une plante à une autre.

Les propriétés biologiques des huiles essentielles sont liées à leur composition qui varie en fonction de plusieurs facteurs : climat, altitude, nature du sol et son pH, période de récolte et techniques de séchage et d'extraction [158-163]. En revanche, la méthode utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne et les souches bactériennes testées peuvent également être la cause de divergences dans les résultats [188].

Dans cette étude, l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* appartenant à la famille des *Myrtacées* est plus active vis-à-vis des souches testées que l'huile des autres plantes. Ce potentiel antibactérien a été mis en évidence par Sohounhlou et ses collaborateurs [189] et Mehani [70], qui ont montré que L'*Eucalyptus* est doué d'une activité biologique efficace sur les microorganismes.

Nos résultats d'aromatogramme de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* concordent avec ceux obtenus par Mehani [190] qui ont été testé l'effet de l'huile essentielle de la même plante de la région du Sud Algérien (Ouargla) sur des souches bactériennes et des levures. Leur test révèle des diamètres des zones d'inhibitions modérés : 14.5mm, 5.5mm et 14mm, à l'encontre des trois souches suivantes respectivement : *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. faecalis* ATCC 29212. Ces valeurs sont similaires à nos résultats avec des diamètres de : 12.5mm, 9.25mm et 18.5mm vis-à-vis des mêmes souches. D'après ces résultats on constate que la résistance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* à l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*, dont *S. aureus* ATCC 43300 est la plus sensible à notre huile (39.2mm).

L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* de notre région d'OEB présente un potentiel antibactérien important vis-à-vis des souches testées, où nous avons enregistré une valeur de 5µl/ml comme concentration minimale inhibitrice contre la quasi-totalité des souches. L'exception est pour *KpC⁻* et *KpC⁺* qui ont une CMI de 7.5µl/ml, et pour *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. coli* ATCC 25922 qui présentent une CMI de 10µl/ml.

Dans la même étude de Mehani [190], l'effet antibactérien a été quantifié par la détermination des CMI des souches sensibles à l'aromatogramme. L'effet inhibiteur de l'huile d'*E. camaldulensis* a été approprié aux diamètres des zones d'inhibition, mais il était sensible à des concentrations minimales inhibitrices très basses : 0.05µg/ml et 0.315µg/ml, correspondant presque à 0,00005µl/ml et 0,00035µl/ml vis-à-vis de *E. coli* ATCC 25922 et

E. faecalis ATCC 29212 respectivement. Ces résultats restent très inférieurs aux CMI de l'huile essentielle de notre région d'OEB qui montre des valeurs de 10 μ l/ml et 5 μ l/ml contre les mêmes souches de bactéries respectivement.

Dans les travaux de Hmiri et ses collaborateurs [191] sur l'effet antifongique contre les deux champignons : *Penicillium expansum* et *Alternaria alternata*, l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* du Maroc a provoqué une inhibition de la croissance des deux champignons à des concentrations de 10 μ l/ml et 30 μ l/ml respectivement. Ces CMI comparables à nos résultats contre *C. albicans* avec une valeur de 5 μ l/ml. En revanche, Su et ses collaborateurs [149] et Somda et ses collaborateurs [192] ont mis en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* de Taiwan vis-à-vis de dix espèces fongiques. Cependant, l'huile essentielle d'*Eucalyptus* de Chine a été inactive vis-à-vis du champignon *Alternaria alternata*, et cette inactivité peut être attribuée à la composition chimique de cette huile [193].

D'autre part, notre huile essentielle d'*E. camaldulensis* exerce un effet bactéricide contre 66.66% des souches testées. L'activité antibactérienne des huiles essentielles est due principalement à son profil chimique et notre huile essentielle est constituée particulièrement du *p*-Cymène (26.22%), suivi du spathulenol (16.71%), du 1,8-Cinéole (14.44), du Limonène (7,34%) et de α -Terpinéol (7.33%). L'effet antibactérien du 1,8-cinéole confère à l'huile son potentiel germicide vis-à-vis d'un grand nombre de bactéries [194,195]. Le α -terpinéol figure parmi nos composants majoritaires, et ce chémotype a prouvé dans certains travaux son efficacité antibactérienne qui est 8 fois supérieure à celle de 1,8-cinéole [196]. Ceci a fait penser que l'effet inhibiteur de ce chémotype se conjugue à celui du 1,8-cinéole pour notre essence d'*Eucalyptus*.

La famille des *lamiacées* regroupe de nombreuses espèces à huiles aromatiques. Les huiles essentielles des espèces de cette famille sont connues pour leurs multiples vertus thérapeutiques. Dans notre étude, cette famille est représentée par la plante médicinale *Salvia officinalis*. D'après la littérature, l'huile essentielle de cette dernière a un large éventail d'activités biologiques, notamment son activité antimicrobienne [21,92,103,151].

L'effet inhibiteur de l'HE de *S. officinalis* vis-à-vis des souches testées a augmenté lorsque la concentration en huile augmente, situation remarquée chez Kheyar et ses collaborateurs [172] qui ont travaillé sur la *S. officinalis* de la région de Bejaia, et qui ont montré des diamètres de zone d'inhibition de 31.5mm, 43.5mm et 15.5mm contre *E. coli*, *S. Aureus* et *P. aeruginosa* respectivement. Ces valeurs présentent un effet meilleur que notre HE qui donne des valeurs généralement modérées : 27.8mm, 19.3mm et 12mm sur le même

genre de souches respectivement. Nos résultats sont en accord que la souche *P. aeruginosa* apparue comme la plus résistante.

L'étude de Bouaziz et ses collaborateurs [100] a montré que l'huile essentielle de *S. officinalis* Tunisienne présente des effets antimicrobiens sur les bactéries, les levures et les moisissures. Ces effets étaient visibles à des concentrations minimales inhibitrices nettement inférieures à nos CMI, d'où une activité meilleure, allant de 0.015µl/ml à 0,25µl/ml à l'encontre de *E. coli* ATCC 10536, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. aureus* ATCC 10675, *B. cereus* CTM 225 et *C. albicans* ATCC 10231. L'étude précédente reste la seule de son genre qui a montré de tels résultats, dont plusieurs auteurs dans différents pays ont mentionné le potentiel antibactérien modéré de l'huile essentielle de *S. officinalis* [128,152,197-199], ce qui concorde avec nos résultats.

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *S. officinalis* de la région de Bejaia, a été montré par Adrar et ses collaborateurs [128]. Les valeurs des CMIs ont été estimées à 3.75µl/ml pour *E. coli* ATCC 25922, 7.5µl/ml pour *E. coli* 161, 5µl/ml pour *S. aureus* ATCC 25923 et 10µl/ml pour *P. aeruginosa* ATCC 867, toutes ces valeurs sont similaires de nos résultats.

En outre, dans les travaux de Longaray et ses collègues [152] et Khalil et Li [198] sur l'huile de *S. officinalis* du Brésil et de la Syrie respectivement, les concentrations minimales inhibitrices obtenues sont en accord avec nos résultats. Ces CMIs sont comprises entre 5µl/ml et 10µl/ml contre *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Les deux souches *P. aeruginosa* et *C. albicans* sont montrées sensibles à notre huile essentielle de *S. officinalis*, contrairement à l'huile de Serbie [197], qui a été inefficace vis-à-vis de ces souches. De même, les résultats obtenus par l'étude de Alizadeh et Shaabani, [199] montrent que l'HE de *S. officinalis* présente d'importantes propriétés antimicrobiennes contre les deux souches : *C. albicans* et *S. aureus*.

Le travail de Marino et ses collaborateurs [201] a révélé que l'huile essentielle de *S. officinalis* avait seulement un effet bactériostatique, contrairement à notre huile essentielle qui présente un effet bactéricide à l'encontre de plus de 50% des souches testées. Egalement [103,152], ont mentionné l'effet bactéricide et fongicide de l'HE de *S. officinalis*.

L'activité antibactérienne de l'HE de *S. officinalis* pourrait être attribuée à la présence du α -Thujone, du camphre, du 1,8-cinéole et du β -Thujone, puisque ces constituants représentent 72% du total de cette essence. En réalité, même si l'activité antibactérienne est souvent attribuée aux principaux composants, il est aujourd'hui reconnu que la synergie ou l'effet antagoniste d'un composé mineur doit être pris en considération [31].

La troisième espèce étudiée dans le présent travail, est *R. chalepensis* qui a montré un large spectre d'action par ses différents extraits d'après plusieurs auteurs [202-204]. L'huile essentielle de notre plante a eu un effet sur la plupart des souches testées, mais à faible intensité.

Nos résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R. chalepensis* concordent avec ceux obtenus par Attou [129]. Dans son étude, l'auteur a testé l'huile aromatique du *R. chalepensis* provenant de plusieurs stations de l'ouest Algérien (Ain Tolba, Sidi Safi, Souk Lethnin et Sidi Ben Adda) d'Ain T'émouchent. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus varient de (6mm à 48mm) selon les stations et les souches testées. Ils se rapprochent de nos résultats et reflètent le potentiel antibactérien modéré. La souche *E. coli* est résistante à notre huile essentielle, voir aussi sa résistante très sensible vis-à-vis de l'huile de Ain T'émouchent avec des diamètres des zones d'inhibition de 6mm à 36mm selon la station.

E. faecalis ATCC 29212 et *C. albicans* ATCC 10231, testées par l'huile essentielle des quatre stations montrent des diamètres d'inhibition de 12mm et 18mm proches de nos résultats avec des diamètres de 11.7mm et 21.8mm respectivement. *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 et *B. cereus* ATCC 11178 présentent une sensibilité plus ou moins importante, mais cette sensibilité reste similaire vis-à-vis de nos huiles essentielles.

Concernant la détermination des CMI de l'huile essentielle de *R. chalepensis* de la région de Ain T'émouchent, l'activité antibactérienne était visible pour de très faibles concentrations en huiles essentielles, allant de 15µg/ml à 250µg/ml correspondant environ à 0.018µl/ml à 0.29µl/ml, comparativement avec nos résultats avec 5µl/ml comme la plus petite valeur.

L'activité de notre huile essentielle est attribuée à la présence du 2-undecanone (33.37%), du 2-nonanone (32.87%) et du 2-decanone (11.11%) comme composants majoritaires. Ainsi, aux 1,8-Cineole (1.75%) et camphre (1.39%) qui sont des composants minoritaires. Il est à noter qu'il y a très peu d'études portant sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R. chalepensis*.

L'ensemble des résultats montrent que les huiles essentielles étudiées sont douées d'une activité antibactérienne contre les souches testées. Cette importante bio-activité des huiles essentielles étudiées est en relation avec leur composition chimique. En effet, Oussalah et ses collaborateurs [205] ont rapporté que l'effet antibactérien des huiles essentielles est attribué aux monoterpènes, et particulièrement aux phénols. Ce qui confirme la validité de la classification de Franchomme et ses collègues [37] qui dit que les aromates

de nature phénolique sont les plus actifs, l'ordre d'efficacité ainsi établi est le suivant : Phénol/ Alcool/Cétone/Ether/hydrocarbure.

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis des huiles testées, nous constatons que l'efficacité de ces huiles diffère d'une bactérie à une autre. *E. coli* ATCC 25922, *KpC⁻*, *KpC⁺*, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *P. aeruginosa* VIM2 sont les souches les plus résistantes avec des CMI les plus élevées (7.5µl/ml à 15µl/ml). Cependant, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA, *E. faecalis* ATCC 29212 et *C. albicans* sont apparues les plus sensibles aux huiles testées. Nos résultats sont en accord avec la littérature selon laquelle les bactéries à Gram positif montrent la plus grande sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles [16,172,194,206].

Il est probable que ce résultat soit dû à une différence dans la capacité de pénétration des composés actifs présents dans les huiles essentielles. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière de perméabilité efficace ; le lipopolysaccharide, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes [207,208].

Il est également probable que cette activité antibactérienne n'est pas due à la présence de substances particulières seulement. Les travaux de Chebli et ses collaborateurs [209] et Vilela et ses collaborateurs [210] ont montré que le 1,8-cinéole pur provoque une inhibition de la croissance mycélienne mais à des concentrations plus élevées que les huiles dans leur totalité. Ainsi l'activité de l'huile essentielle est le résultat de ses composés majoritaires et aussi de l'effet synergique des composés minoritaires [191].

Pour résumer, l'effet biologique des HEs est à mettre en relation avec sa composition chimique. Les groupes fonctionnels des composés majoritaires et minoritaires ont un effet synergique entre leurs constituants. Les huiles essentielles sont riches en monoterpènes hydrocarbures, terpinènes dotés d'une grande activité antibactérienne contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif [211]. Ces composants chimiques exercent leur activité antimicrobienne sur les microorganismes par la perturbation de l'intégrité membranaire [212].

On note que les trois huiles essentielles étudiées contiennent le 1,8-cinéole à des teneurs différentes. L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* a été la plus performante des trois huiles, vu sa teneur en 1,8-cinéole et α -Terpineol, suivie par l'huile de *S. officinalis*, et finalement *R. chalepensis*. Ainsi, les trois huiles ont un effet bactéricide et bactériostatique vis-à-vis des souches testées. Il est à noter que la seule souche *P. aeruginosa* VIM2 résistante à l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*, présente une faible sensibilité aux autres huiles.

Les résultats de l'Isobolmethod indiquent une bonne synergie entre l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* et de *S. officinalis*, suivis par le mélange binaire en *E. camaldulensis* et *R. chalepensis*, et à l'exception de l'association de l'huile essentielle de *S. officinalis* et *R. chalepensis* qui ne montre aucun effet synergique. Ainsi, la souche *KpC* semble avoir une même sensibilité vis-à-vis des HEs en différentes associations comme en individuels.

Nous avons constaté précédemment, que l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* est la plus active vu sa teneur en 1,8-cinéole, suivie par l'huile essentielle de *S. officinalis*, et finalement *R. chalepensis*. Cette constatation explique le grand effet synergique généré par l'association de l'HE de *S. officinalis* et d'*E. camaldulensis*, suivie de l'association de l'huile essentielle de *R. chalepensis* et d'*E. camaldulensis* qui augmente la teneur en 1,8-cinéole, et par conséquent leur activité. L'association de l'HE de *S. officinalis* et *R. chalepensis* n'engendre aucune action synergique en raison de la diminution de 1,8-cinéole.

L'association de l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* et de *S. officinalis*, ainsi que l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* et de *R. chalepensis*, diminue les CMI et améliore l'effet antibactérien.

VI.9 Conclusion

L'apparition de souches bactériennes résistantes et multirésistantes aux traitements chimiques à base d'antibiotiques synthétiques, pousse à la recherche d'alternatives plus efficaces et plus sûres. Dans ce cadre, ce chapitre a été consacré à l'étude de l'activité antimicrobienne des trois huiles essentielles vis-à-vis de quinze souches bactériennes dont cinq de référence.

L'évaluation qualitative et quantitative *in vivo* du pouvoir antimicrobien des trois huiles essentielles a été réalisée par la méthode d'aromatogramme et d'incorporation en milieu solide respectivement. Les différents tests montrent que les huiles essentielles sont actives sur la plupart des souches bactériennes utilisées. Des zones d'inhibition de diamètres variables sont observées à au moins une des cinq concentrations testées. Néanmoins, l'activité a été le plus souvent observée sévère pour l'extrait brut ; donc l'effet antimicrobien est proportionnel à la concentration de l'huile essentielle.

En comparant la susceptibilité des pathogènes étudiés, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries à Gram négatif, ce qui concorde avec beaucoup d'études réalisées dans cette optique. L'huile d'*E. camaldulensis* présente une meilleure activité antimicrobienne que d'autres huiles.

L'évaluation de la synergie entre les huiles essentielles met en évidence l'action synergique en associant l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*/*S. officinalis*, ainsi que l'huile

d'*E. camaldulensis*/*R. chalepensis*, et cette combinaison diminue les CMI et améliore l'activité antibactérienne de nos huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes qui représentent une faible sensibilité.

Cette activité antimicrobienne est due essentiellement à la composition chimique des huiles essentielles. Ces résultats méritent d'être approfondis par des tests *in vivo* afin de développer un moyen de lutte biologique à base de substances naturelles contre les micro-organismes causant des infections pathogènes.

CHAPITRE VII : ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

VII.1 Introduction

La détérioration des denrées alimentaires constitue une préoccupation de santé publique. En effet, une peroxydation lipidique peut survenir sous l'action des espèces oxygénée réactives (EOR) lors du traitement de la matière première, et du stockage du produit fini. Dans l'organisme, une surproduction des EOR qui contiennent les radicaux libres de l'oxygène provoque une toxicité à l'origine de diverses pathologies [213]. Pour faire face à ce problème et afin d'inhiber la production de ces espèces et les neutraliser, l'utilisation des huiles essentielles a une grande importance justifiée par leurs substances chimiques (antioxydantes) qui empêchent les réactions avec l'oxygène.

Ce chapitre est consacré à l'évaluation (*in vitro*) de la capacité antioxydante de nos huiles essentielles extraites à partir de trois espèces végétales investiguées (*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis*).

VII.2 Activité antioxydante

Le terme antioxydant était à l'origine utilisé pour désigner les substances chimiques qui empêchent les réactions avec l'oxygène. À la fin du XIXe siècle et au début du XXe siècle, les propriétés des antioxydants ont été largement étudiées pour leurs utilisations dans les procédés industriels afin de réduire, par exemple, la corrosion des métaux et la polymérisation des carburants dans les moteurs à explosion [214,215].

Ces dernières années, de nombreuses études ont apporté des précisions sur les niveaux des consommations des antioxydants, leur devenir dans l'organisme et leurs mécanismes d'action aux niveaux cellulaire et moléculaire. Par ailleurs, de nombreuses molécules antioxydantes d'origine naturelle suscitent actuellement l'intérêt professionnel de l'agroalimentaire et génèrent de nouveaux programmes de recherches [214,216].

VII.3 Radicaux libres et stress oxydatif

L'oxygène est un élément vital qui joue un rôle indispensable dans l'oxydation des cellules. Lorsque cette oxydation est incomplète, des molécules nocives appelées radicaux libres se forment. En grand nombre, les radicaux libres altèrent l'intégrité des cellules et provoquent une mort cellulaire prématurée. La principale production des radicaux libres à l'intérieur de l'organisme est le métabolisme, c'est-à-dire la transformation des aliments en énergie. Les sources externes sont le stress, le tabac, l'alcool, la pollution et les additifs alimentaires [217,218].

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses antioxydantes [219]. Le stress oxydatif engendré par l'accumulation des EOR et le dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites, est le déclencheur de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose, les atteintes hépatiques, les maladies pulmonaires, les affections rénales, le diabète et le vieillissement [220].

VII.4 Lutte contre le stress oxydatif

Afin d'inhiber la production des EOR et les neutraliser, on a recours aux antioxydants. L'effet antioxydant d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle, possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures, et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) [221].

VII.5 Agents antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui aident le corps à lutter contre les radicaux libres en les neutralisant, afin qu'ils deviennent inoffensifs [222]. Ils peuvent être classés en deux groupes selon le niveau de leur action : les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires.

VII.5.1 Antioxydants primaires

Ils sont appelés également antioxydants vrais ou antioxydants radicalaires. Ce sont des molécules (notées AH) capables d'interrompre la chaîne auto-catalytique de l'oxydation en bloquant les radicaux lipidiques R^\bullet et ROO^\bullet par le transfert d'un atome d'hydrogène pour reformer RH et ROOH. De la même manière, ils peuvent transformer les radicaux RO^\bullet en ROH, bloquant ainsi la formation des aldéhydes [214].

VII.5.2 Antioxydants secondaires

Ils sont appelés aussi préventifs car ils assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des molécules exogènes, c'est-à-dire, des substances décomposant les hydro-péroxydes en alcools, en thiols (acides aminés soufrés) ou en disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV [223]. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes [224].

VII.6 Sources des antioxydants

VII.6.1 Sources synthétiques

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Maintenant, les classes thérapeutiques comme les anti-hyper-lipoprotéïnémiques, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les β -bloquants et autres antihypertenseurs, ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes (figure VII.1) [225].

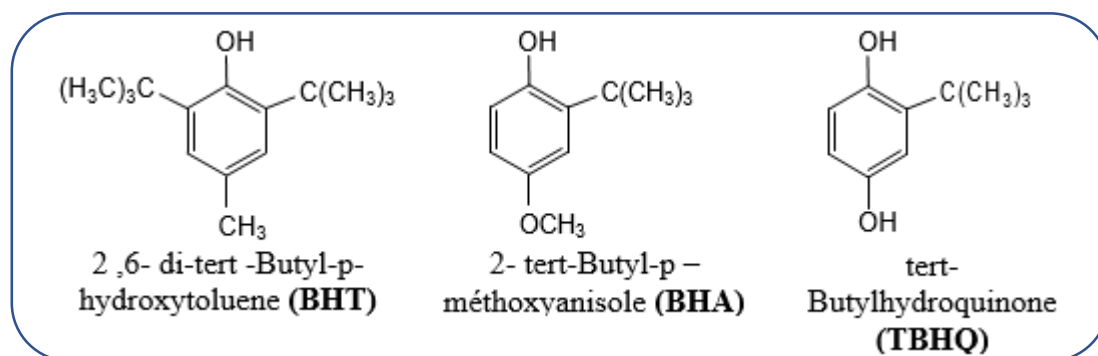


Figure VII.1 : Structures chimiques de quelques antioxydants synthétiques.

Les antioxydants synthétiques sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs pour retarder l'oxydation lipidique. En raison des risques toxicologiques potentiels de ces molécules antioxydantes telles que le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT), leurs utilisations sont remises en cause, et des recherches d'alternatives naturelles sont effectuées [226].

VII.6.2 Sources naturelles

Les substances naturelles telles que les huiles essentielles, constituent une source de molécules actives largement étudiées pour leurs vertus antimicrobiennes, insecticides, antifongiques [226], d'où leurs intérêts socioéconomiques. Les antioxydants d'origine alimentaire sont nombreux, certains sont liposolubles comme les tocophérols, β -carotène, lycopène et d'autres qui sont hydrosolubles comme l'acide ascorbique, et d'autres qui sont plus hydrosolubles que les liposolubles comme les polyphénols.

VII.7 Techniques d'évaluation de l'activité antioxydante

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique ou d'autres molécules, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité, et d'augmenter la durée de conservation du produit.

L'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, et qui n'entraîne ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, et stable dans le produit fini [227]. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo*, par piégeage de radicaux différents, dont les plus utilisées sont :

VII.7.1 Test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

Le test au DPPH permet de mesurer les propriétés antioxydantes des composés en fonction de leur capacité à piéger le radical DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle). Le DPPH• est un radical libre très stable, capable d'accepter un électron ou un atome d'hydrogène formant ainsi la forme non radicalaire 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H). Ce radical de couleur violette présente une bande d'absorption à 515nm dans le méthanol, mais lorsqu'il est mélangé avec une solution qui contient des agents antioxydants, sa forme réduite sera générée par le virement de la couleur violette en couleur jaune (figure VII.2) [228].

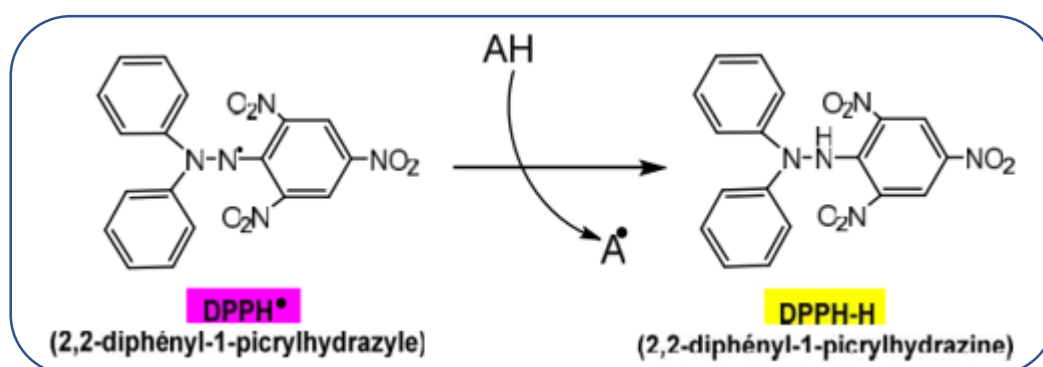


Figure VII.2 : Forme libre et réduite du DPPH.

Donc, en présence d'un antioxydant, la réduction du DPPH s'accompagne de la diminution de la coloration qui peut être suivie par spectrométrie. Le potentiel donneur d'un atome d'hydrogène d'un échantillon est le plus souvent exprimé par le paramètre EC_{50} , qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration initiale de DPPH•. Plus l' EC_{50} est petite, plus la molécule est antioxydante [228,229].

Le test au radical libre DPPH s'effectue à température ambiante, et ceci permet d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles.

VII.7.2 Test de β -carotène

Dans le test de blanchissement du β -carotène, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) par les radicaux peroxydes issus de l'acide linoléique [230].

L'addition d'un antioxydant dans ce système retarde la décoloration du β -carotène. L'auto-oxydation de l'acide linoléique n'étant pas toujours reproductible, une amélioration est apportée en utilisant l'AAPH (2,2'-azobis 2amidinopropane dihydrochloride) comme amorceur de peroxydation lipidique.

La cinétique de décoloration de l'émulsion, en présence et en absence d'antioxydant, est suivie à une longueur d'onde de 470nm pendant des intervalles de temps réguliers.

VII.7.3 Test de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le test de FRAP (capacité de réduction des ions ferriques) est un exemple pour mesurer la capacité antioxydante ; elle est basée sur l'étude du pouvoir réducteur des composés par le transfert d'un électron. Cette technique a été développée par Benzie et Strain pour mesurer la capacité antioxydante du plasma sanguin [22]. Cette technique consiste à réduire le complexe ferrique de 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine [(Fe(III)-TPTZ)] de couleur jaune, en complexe ferreux [(Fe(II)-TPTZ)] de couleur bleu à pH=3.6, dont la formation peut être suivie par spectrophotométrie à 593nm.

Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur, et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un antioxydant. Les valeurs sont obtenues en comparant à 593nm, l'absorbance d'un mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester, à celle d'un mélange réactionnel contenant une concentration connue en ion ferreux [228]. Le problème de cette méthode, est qu'elle ne donne pas des résultats avec les antioxydants qui portent les groupes SH (les thiols) [231,232].

VII.8 Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites

On peut définir les antioxydants comme des molécules qui empêchent ou diminuent l'oxydation d'autres molécules. Une réaction d'oxydoréduction, dont fait partie l'oxydation, assure le transfert des électrons d'une molécule donnée vers un agent oxydant.

L'activité antioxydante *in vitro* des trois HEs testées a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) vues sa simplicité, sa rapidité, sa sensibilité et sa reproductibilité. DPPH est largement utilisé pour sa fiabilité et sa répétabilité [233-235].

VII.8.1 Mécanisme d'action du radical DPPH

L'activité antiradicalaire a été évaluée en utilisant le DPPH, qui fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante [236]. Le DPPH (2,2 -diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre, stable, et possédant un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Cet état induit l'apparition d'une couleur violette foncé bien caractéristique de la solution DPPH.

Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire le DPPH•, ce qui nous amène au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H), passant au jaune pâle, et l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu [237]. Le suivi de la délocalisation est réalisé par spectrophotométrie à 517nm (figure VII.3).

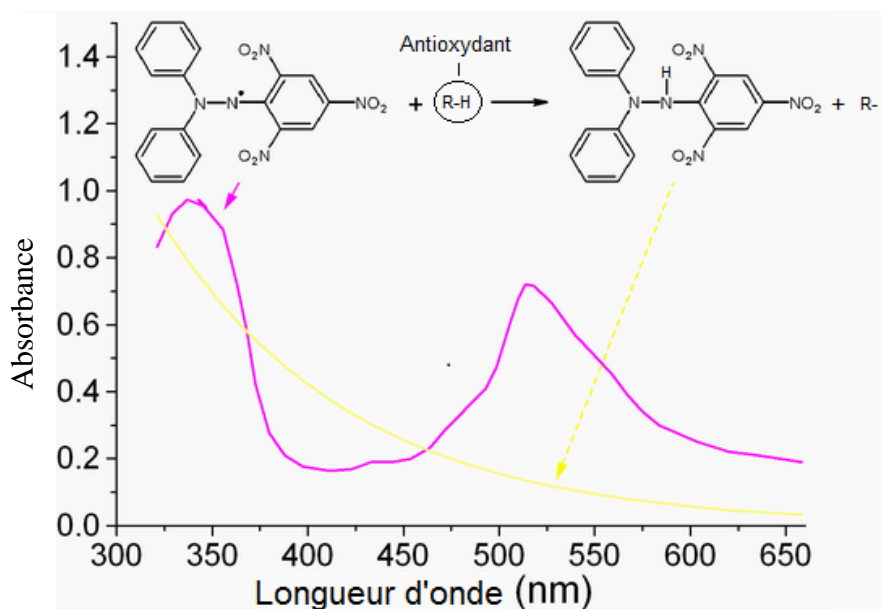


Figure VII.3 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (R-H) [238].

VII.8.2 Courbe d'étalonnage

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée, plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon \cdot l \cdot C$.

La courbe d'étalonnage est une moyenne très utilisée dans le dosage des différentes solutions, ainsi que pour examiner la fiabilité des instruments de mesures. En effet, nous avons vérifié la fiabilité du spectrophotomètre utilisé, en traçant la courbe d'étalonnage,

absorbance de la solution méthanolique du DPPH mesurée à 517nm en fonction des différentes concentrations (0.1mM, 0.075mM, 0.05mM et 0.025mM). La linéarité de la courbe d'étalonnage ($y=ax$) avec un coefficient de détermination R^2 proche à 1 assure la crédibilité des résultats expérimentaux.

VII.8.3 Mode opératoire

L'estimation de l'effet antioxydant par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a été réalisée suivant le protocole d'Adrar et ses collaborateurs [128].

La solution de DPPH a été préparée par la dissolution de 3.9mg de DPPH dans 100ml de méthanol absolu (99,8%) afin d'obtenir une solution de (0.1mM). Un volume de 3ml des huiles essentielles dilués dans le méthanol à différentes concentrations (100mg/ml, 75mg/ml, 50mg/ml et 25mg/ml) a été ajouté à 1ml de la solution méthanolique de DPPH et le mélange réactionnel incubé 30min à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances ont été mesurées à 517nm contre le contrôle négatif "blanc" (figure VII.4).



Figure VII.4 : Matériel d'évaluation de l'activité antioxydante.

Le contrôle négatif est composé de 1ml de la solution méthanolique de DPPH• additionné à 3ml de méthanol.

L'acide ascorbique ou la vitamine C (VC) a été utilisé comme antioxydant synthétique de référence (contrôle positif) à différentes concentrations (100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml et 12,5 μ g/ml) dont la lecture se fait dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

La capacité de l'antioxydant (huiles essentielles ou acide ascorbique) à piéger le radical libre est estimée en déterminant le pourcentage de décoloration (réduction) du DPPH

en solution dans le méthanol ; le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

VII.8.4 Estimation d'IC₅₀

La grandeur IC₅₀ est définie comme étant la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH•, aussi appelée EC₅₀ (concentration équivalente à 50% de DPPH réduit). Les IC₅₀ sont déterminées graphiquement par régressions linéaires des graphes tracés (taux d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées).

Pour toute l'expérimentation, chaque test est réalisé en trois fois et les résultats ont été calculés par la moyenne des trois essais.

VII.9 Résultats

Nous rappelons que l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites à partir des trois plantes a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical libre DPPH.

VII.9.1 Courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage est un moyen très important pour vérifier la crédibilité des instruments de mesure. La figure VII.5 représente l'absorbance en fonction des concentrations. D'après cette figure, on constate que le nuage des points est très proche de la droite d'équation $y=ax$ qui répond à la loi de Beer-Lambert avec un coefficient de détermination $R^2=0.9327$, ce qui indique la fiabilité de nos résultats expérimentaux.

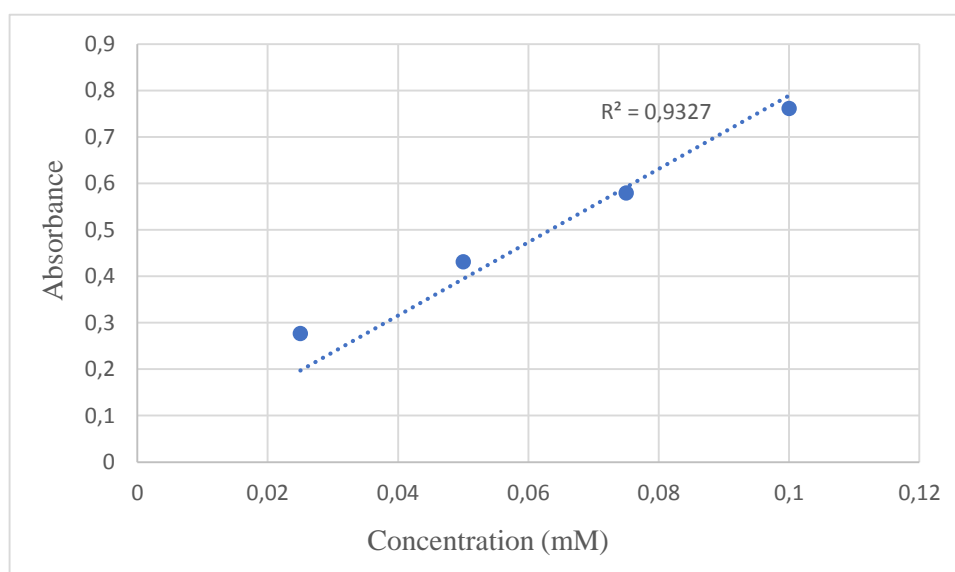


Figure VII.5 : Courbe d'étalonnage (activité antioxydante).

VII.9.2 Effet scavenger du radical libre DPPH

Le DPPH est un radical libre qui permet de déterminer le potentiel de piégeage de nos huiles essentielles grâce à sa sensibilité à détecter les composants actifs à des basses concentrations [238]. L'effet antiradicalaire a été estimé par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune (figure VII.6), mesurable à 517nm [239]. Tous les résultats des absorbances obtenus sont représentés en Annexe 02.



Figure VII.6 : Virement de la couleur violette à la couleur jaune lors de la réduction du DPPH (influence de la concentration de l'antioxydant).

Les deux figures VII.7 et figure VII.8 illustrent respectivement l'efficacité des huiles essentielles et de l'acide ascorbique (VC) à piéger le radical libre DPPH. Cette efficacité est traduite par le taux d'inhibition (I%) en fonction des différentes concentrations.

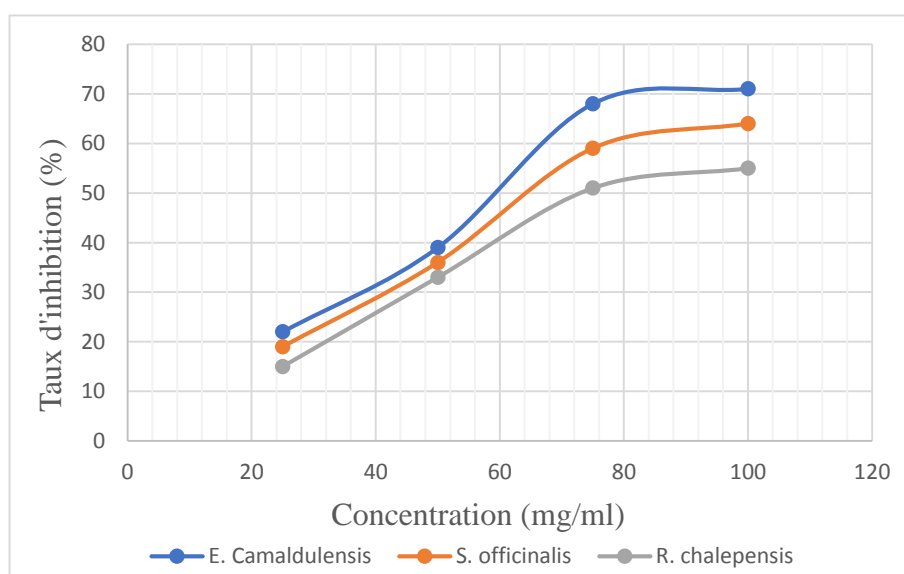


Figure VII.7 : Activité antiradicalaire des huiles essentielles d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis* (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

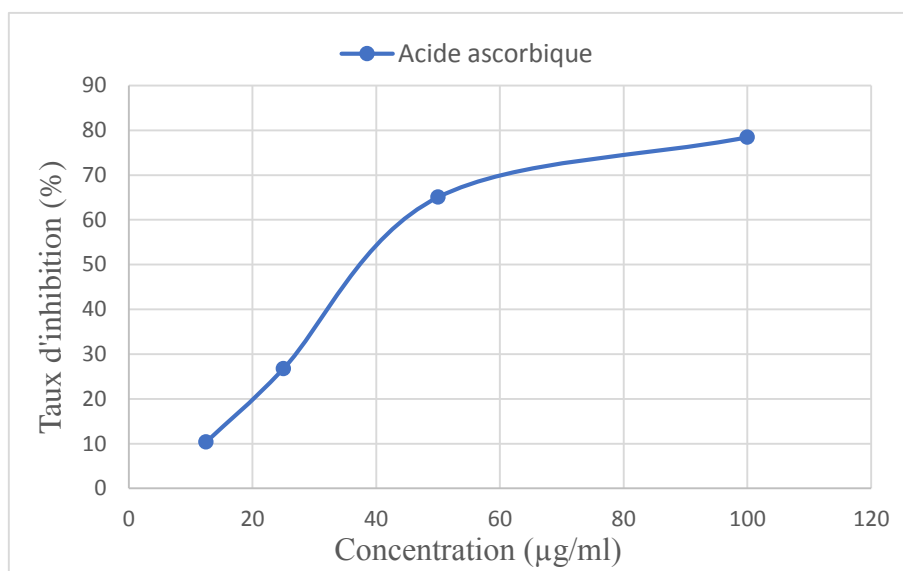


Figure VII.8 : Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD).

D'après nos résultats, l'évolution de l'activité antiradicalaire est dose-dépendante, car elle augmente avec l'augmentation des concentrations des huiles essentielles dans le milieu réactionnel. Le pourcentage d'inhibition augmente graduellement ou progressivement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à la disparition presque totale du DPPH• présent dans le milieu.

A partir des courbes des taux d'inhibition, nous pouvons déduire graphiquement les valeurs d'IC₅₀ de la VC et des HEs, et ces valeurs sont représentées dans le tableau VII.1. La valeur de l'IC₅₀ est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante (taux d'inhibition I%) d'un composé. Elle reflète la quantité d'antioxydant requise pour neutraliser 50% de la concentration initiale du radical libre dans le milieu. Plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un composé est meilleure.

Tableau VII.1 : IC₅₀ des huiles essentielles et de l'acide ascorbique.

Agent antioxydant	IC ₅₀ (mg/ml)
Vitamine C	0.037
HE <i>E. camaldulensis</i>	59
HE <i>S. officinalis</i>	64
HE <i>R. chalepensis</i>	73

Le potentiel antiradicalaire global des huiles essentielles testées a été nettement inférieur à celui de la vitamine C dont l'IC₅₀ de ce dernier est de 0.037mg/ml. Parmi ces trois HEs, L'*E. camaldulensis* arrive en tête des résultats avec un IC₅₀ égal à 59mg/ml, suivi de *S.*

officinalis avec une valeur de 64mg/ml et finalement *R. chalepensis* qui semble être la moins performante avec un IC₅₀ de 73mg/ml.

NB : Il faut mentionner que nous avons essayé de combiner entre les trois huiles essentielles afin d'améliorer leur pouvoir antiradicalaire, mais aucune synergie significative n'a pu être détectée.

VII.10 Discussion

Le pouvoir de piégeage du radical DPPH, par l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis* augmente proportionnellement avec la concentration. A partir des résultats obtenus, le pouvoir antiradicalaire de nos huiles essentielles testées reste très reculé par rapport à celui du contrôle positif (acide ascorbique) qui révèle une valeur d'IC₅₀ de 0.037mg/ml, ce qui explique sa grande capacité antioxydante.

D'après les résultats obtenus, l'HE d'*E. camaldulensis* a généré le plus fort potentiel antiradicalaire, suivi de l'HE de *S. officinalis*, puis l'HE de *R. chalepensis*, avec des valeurs d'IC₅₀ de 59mg/ml, 64mg/ml et 73mg/ml respectivement. L'activité antioxydante est attribuée à la composition chimique des huiles essentielles. Cependant, elle peut être due à l'un des constituants majoritaires ou à d'autres constituants minoritaires ou également à une synergie entre eux [240].

Nos trois HEs contiennent des monoterpènes à des teneurs différentes. Dans une étude antérieure, les huiles avec une prédominance monoterpéniques ont montré une activité assez modeste [241]. Ceci est en contradiction avec les travaux de Tepe et ses collaborateurs où ils ont démontré une grande activité antioxydante des huiles essentielles contenant des monoterpènes et/ou des sesquiterpènes oxygénés [242]. Ainsi, selon Miladi et ses collaborateurs [243], il existe une corrélation entre l'activité antioxydante des essences et la teneur de monoterpènes oxygénés, confirmé aussi par Zouari et ses collaborateurs [244], qui ont signalé que les huiles essentielles qui ne contiennent pas de composés phénoliques, mais riches en monoterpènes oxygénés ont des propriétés de piégeage de DPPH relativement importantes.

Il apparaît clairement que l'HE de *S. officinalis* présente une capacité de réduction du radical DPPH relativement faible par rapport à celle d'*E. camaldulensis*. En outre, la valeur d'IC₅₀ obtenue par notre HE est nettement supérieure aux résultats rapportés par Gürsoy et ses collaborateurs qui citent des IC₅₀ inférieurs à 1mg/ml pour la même HE mais en Turquie [245]. D'autre part, l'étude menée par Rasmy et ses collaborateurs [246] sur l'huile essentielle de *S. officinalis* en Egypte, a montré un pouvoir antioxydant satisfaisant, exprimé

à travers un effet scavenger du radical DPPH à de faibles concentrations (IC_{50} inférieurs à 10mg/ml).

Hussain et ses collaborateurs [247] dans leur étude portant sur l'HE et les extraits de *S. officinalis*, ont enregistré une concentration inhibitrice de 50% des radicaux de l'ordre de 0.0623mg/ml. Cette forte activité de piégeage du radical DPPH, est a priori expliquée par la teneur élevée en 1,8-cineole (composé majoritaire de cette huile).

D'après Bouaziz et ses collaborateurs, les huiles essentielles de *S. officinalis* ont montré une activité antioxydante remarquable ($IC_{50}=7.70\pm 0.90\mu\text{g/ml}$) supérieure à celle de l'antioxydant de synthèse BHT ($IC_{50}=8.13\pm 1.07\mu\text{g/ml}$) [100].

Les valeurs mentionnées dans la littérature ne concordent pas avec nos résultats, et cette divergence est probablement due à la différence dans la composition chimique des huiles essentielles. L'effet antioxydant des HE est probablement lié au contenu phénolique. En effet, l'étude comparative sur la faculté de réduction du radical DPPH par des chemotypes différents a montré que les chemotypes phénoliques indiquent *in vitro* des potentiels antioxydants plus exprimés et plus forts que les chemotypes non phénoliques [248].

Concernant l'HE de *R. chalepensis* qui a montré l'effet antiradicalaire le plus faible, et ce comportement semble être dû à la composition chimique de cette huile, compte tenu de sa très faible teneur en composés phénoliques. De ce fait, ce résultat était plus ou moins prévisible, situation observée chez Fakhfakh et ses collaborateurs [249] qui ont signalé dans l'étude menée sur *Ruta chalepensis* en Tunisie, l'absence d'activité de piégeage du radical DPPH par cette HE en raison de l'absence de phénols ou de composés terpéniques oxygénés mais une prédominance des cétones aliphatiques et des composants d'esters.

D'une manière générale, on peut dire que les HES testées issues de la région d'Oum el Bouagui et de Sétif, présentent un faible effet scavenger du radical DPPH. Afin de comparer nos valeurs enregistrées pour le test de piégeage du radical DPPH avec celles de la littérature scientifique, nos recherches n'ont finalement abouti que sur très peu d'études.

VII.11 Conclusion

Dans la présente étude, la méthode de piégeage du radical libre DPPH a été utilisée afin de témoigner de l'activité antiradicalaire des huiles essentielles de trois espèces de notre région, à savoir : l'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis*. L'effet antiradicalaire a été établi mais à des concentrations très élevées, puisqu'ils sont quand même capables de réduire la forme stable du radical DPPH.

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les HE étudiées possèdent un effet antiradicalaire dose-dépendante (augmente relativement avec la concentration des

huiles essentielles). Néanmoins, l'activité antiradicalaire des HEs testées reste très faible par rapport à celle de l'antioxydant de synthèse (acide ascorbique) qui montre une valeur d'IC₅₀ de 0,037mg/ml reflétant son potentiel antioxydant élevé.

L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* a engendré le plus fort potentiel antiradicalaire, suivi de l'HE de *S. officinalis*, puis l'HE de *R. chalepensis* avec des valeurs d'IC₅₀ de 59mg/ml, 64mg/ml et 73mg/ml respectivement.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Un grand nombre de plantes médicinales contiennent des composés chimiques qui possèdent des propriétés biologiques, surtout l'activité antimicrobienne et antioxydante. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes. La recherche de nouvelles plantes aromatiques à caractère thérapeutique a surtout servi à montrer le bien fondé de leurs utilisations par les tradipraticiens.

Notre pays recèle une biomasse végétale riche et variée qui constitue une source immense pour l'élaboration et la mise au point de nouvelles molécules actives à but thérapeutique. L'utilisation des formulations volatiles à base de plantes aromatiques et médicinales peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits actuels de synthèses.

Dans le cadre de la revalorisation de ces ressources naturelles, trois espèces végétales aromatiques et médicinales (*Eucalyptus camaldulensis*, *Salvia officinalis* et *Ruta chalepensis*) ont fait l'objet d'optimisation des paramètres d'hydrodistillation et l'étude phytochimique de leurs huiles essentielles, ainsi qu'une évaluation de leur potentiel antioxydant et antimicrobien.

Les trois huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation, dont les rendements massiques enregistrés sont de 0.34%-0.51%, 0.41%-0.9% et 0.49%-0.81%, pour l'huile essentielle d'*E. camaldulensis*, *S. officinalis* et *R. chalepensis*, respectivement. Le rendement en huile essentielle de chaque plante est donné par un interval grâce au plan d'expérience qui exige de faire plusieurs essais d'extraction pour chaque espèce afin d'optimiser leurs paramètres.

La modélisation de l'hydrodistillation des huiles essentielles nous amène à une extraction plus efficace, dont les paramètres étudiés sont : la granulométrie, le débit de condensation et le temps d'extraction. Les modèles mathématiques retenus ont été testés statistiquement par l'analyse **ANOVA**. Les résultats de l'analyse montrent que les trois modèles développés sont bien adaptés aux données expérimentales. Après optimisation des paramètres d'extraction, nous avons obtenu des rendements massiques meilleurs, et par conséquent des quantités en huiles essentielles plus importantes en maintenant pour chaque espèce les conditions opératoires suivantes :

- *E. camaldulensis* : $Y=0.52\%$, granulométrie 1mm, débit de condensation 3.4ml/min et temps d'extraction 210min ;

- *S. officinalis* : Y=0.98%, granulométrie 2mm, débit de condensation 1.4ml/min et temps d'extraction 210min ;
- *R. chalepensis* : Y=0.84%, granulométrie 2mm, débit de condensation 3.4ml/min et temps d'extraction 204min.

Pour une meilleure exploitation industrielle, il convient d'extraire l'huile essentielle par hydrodistillation dans les conditions opératoires mentionnées pour chaque espèce ; la teneur en HE serait à son maximum. Au-delà de ces conditions, les espèces végétales perdent quantitativement leur huile essentielle.

Le contrôle des huiles essentielles par les caractéristiques organoleptiques et les propriétés physico-chimiques permet de mettre en évidence leur qualité et de les distinguer par rapport aux intervalles des normes et de la littérature d'une façon générale. Les résultats de notre travail nous a permis d'assurer la pureté et la bonne qualité de nos huiles essentielles.

Les profils chimiques des HES ont été obtenus par analyse CPG/SM. L'analyse de l'HE d'*E. camaldulensis* a permis l'identification de 35 composés correspondant à 99.99% de cette HE. Elle est constituée majoritairement de : *p*-Cymene (26.22%), spathulenol (16.71%), 1,8-Cineole (14.44%), Limonene (7.34%), α -Terpineol (7.33%) et Terpinen-4-ol (3.14%). L'analyse de l'HE de *S. officinalis* a permis de recenser 34 constituants représentant 99.99% de l'huile essentielle totale obtenue, dont l'élément majoritaire est le α -Thujone (28.36%), suivi par le camphre (21.53%), le 1,8-cinéole (16.27%) et β -Thujone (6.2%). En revanche, l'analyse de l'HE de *R. chalepensis* a permis d'identifier 37 constituants représentant 99.99% de cette essence, dont l'élément majoritaire est le 2-undécanone (33.37%), suivi par le 2-nonanone (32.87%) et le 2-Decanone (11.11%).

Concernant l'estimation des propriétés biologiques de nos huiles essentielles, l'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant une large gamme de microorganismes, afin de donner une idée sur l'étendue du champ de l'activité antimicrobienne. Nous avons testé nos HES sur quinze souches bactériennes (cliniques et de référence). L'évaluation qualitative et quantitative *in vivo* du pouvoir antibactérien des trois huiles essentielles a été réalisée par la méthode d'aromatogramme et d'incorporation en milieu solide.

Les différents tests montrent que les huiles essentielles sont actives sur la plupart des souches bactériennes utilisées. En comparant la susceptibilité des pathogènes étudiés, les bactéries à Gram positifs sont plus sensibles à l'action des huiles que les bactéries à Gram négatifs, ce qui concorde avec beaucoup d'études réalisées dans cette optique. L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* présente la meilleure activité antibactérienne, suivie de l'HE de *S. officinalis*, puis l'HE de *R. chalepensis*.

Afin d'améliorer le potentiel antibactérien des trois huiles essentielles, nous avons étudié leur effet synergique. L'évaluation de la synergie entre les huiles essentielles met en évidence l'action synergique en associant l'huile essentielle d'*E. camaldulensis* avec l'HE de *S. officinalis*, ainsi que l'huile d'*E. camaldulensis* avec *R. chalepensis*. Cette combinaison diminue les CMI et améliore l'activité antibactérienne de nos huiles essentielles vis-à-vis des souches bactériennes qui représentent une faible sensibilité.

L'effet antibactérien est dû essentiellement à la composition chimique des huiles essentielles, et les résultats obtenus méritent d'être approfondis par des tests *in vivo* afin de développer un moyen de lutte biologique à base de substances naturelles, contre les micro-organismes causant des infections pathogènes. De ce fait, les trois huiles essentielles pourront être proposées, éventuellement, comme un principe actif de choix dans le traitement local des inflammations, individuellement ou en association.

En revanche, l'activité antiradicalaire de nos huiles essentielles a été estimée *in vitro* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les profils d'activité antiradicalaire obtenus ont montré que le pouvoir antiradicalaire est proportionnel à la concentration des huiles essentielles. L'huile essentielle d'*E. camaldulensis* a engendré le plus fort potentiel antiradicalaire, suivi de l'HE de *S. officinalis*, puis l'HE de *R. chalepensis*, avec des valeurs d'IC₅₀ de 59 mg/ml, 64mg/ml et 73mg/ml respectivement. Cependant, cette activité antiradicalaire reste très faible par rapport à celle de l'antioxydant de synthèse (acide ascorbique) qui montre une valeur d'IC₅₀ de 0.037mg/ml reflétant son potentiel antioxydant élevé.

Nous avons essayé de combiner entre les trois huiles essentielles afin d'améliorer leur pouvoir antiradicalaire, mais aucune synergie significative n'a pu être détectée.

Finalement, en regardant les résultats obtenus, on peut dire de manière générale, que les propriétés biologiques des huiles essentielles seraient liées à la complexité de la composition chimique et à la synergie entre les composants majoritaires et minoritaires.

Notre étude a permis de revaloriser les plantes investiguées et trouver de nouvelles applications dans plusieurs secteurs de pointe tel que la pharmacopée. Les résultats de cette recherche pourraient avoir, à moyen terme, une incidence sur le développement durable du pays : les potentialités des huiles essentielles de trois plantes étant à peine, elles ouvrent d'intéressantes perspectives de recherche pour les prochaines années. Afin de mieux valoriser ces sources naturelles il incombe aux bio-technologistes en végétaux de mener des études supplémentaires.

En perspectives, nous proposons de :

- Approfondir notre étude sur l'hydrodistillation à partir de l'optimisation d'autres paramètres influençant sur ce procédé, à savoir : la pression, le rapport masse végétale/eau et la durée de séchage afin d'améliorer le rendement ;
- Fractionner et isoler les différents constituants des huiles essentielles afin de connaître la ou les molécules responsables de leurs activités ;
- Elargir le spectre des bactéries test-objet ;
- Evaluer l'effet antibactérien et antioxydant *in vivo* sur un modèle biologique ;
- Elargir le spectre d'activités étudiées telle que l'activité anti-inflammatoire ;
- Protéger et cultiver à grande échelle pour conserver cette bio-richesse et valoriser ces espèces.

Nous terminerons en rappelant qu'il existe dans la nature des ressources inattendues, solutions de demain. Les protéger est l'affaire de tous. Malgré les progrès en matière de médicaments à base de plantes, il reste à l'homme beaucoup à découvrir des secrets cachés de la nature. Une recommandation de base que nous formulons aux populations c'est une utilisation sensée des plantes médicinales, conduirait à des effets secondaires néfastes pour la santé humaine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Bourrain J.L. Allergies aux huiles essentielles : aspects pratiques. Revue française d'allergologie, (2013), 53, p: 30-32.
- [2] Jacqueline Smadja. Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA). Université de La Réunion. Colloque GP3A-Tananarive, 2-3 juillet, (2009).
- [3] Nashwa T, Hassan H.M, Sameh M.M. A, Radwan I.A, Hammouda O, El-Gendy A.O. Comparative chemical and antimicrobial study of nine essential oils obtained from medicinal plants growing in Egypt. Journal of basic and applied sciences, (2014), 3, p: 149-156.
- [4] Benbelaïd F, Khadir A, Abdoune M.A, Bendahou M, Muselli A, Costa J. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, (2014), 4(6), p: 463-472.
- [5] Pavlić B, Vidović S, Vladić J, Radosavljević R, Cindrić M, Zeković Z. Subcritical water extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by-products-Process optimization by response surface methodology. J. of Supercritical Fluids, (2016), 116, p: 36–45.
- [6] Glisic S, Jasna I, Mihajlo R, Dejan S. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. J. of Supercritical Fluids, (2010), 52, p: 62–70.
- [7] Aleksic V, Knezevic P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. Microbiological Research, (2014), 169, p: 240– 254.
- [8] Mu'azu K, Mohammed D.I.A, Waziri S.M. Development of Mathematical Model for the Prediction of Essential Oil Extraction from *Eucalyptus Citriodora* Leave. Journal of Basic and Applied Scientific Research, (2012), 2(3), p: 2298-2306.
- [9] Timung R, Barik C. R, Purohit S, Vaibhav V.G. Composition and anti-bacterial activity analysis of citronella oil obtained by hydrodistillation: Process optimization study. Industrial Crops and Products, (2016), 94, p: 178–188.
- [10] Afsaneh M, Mina A. Application of response surface methodology: design of experiments and optimization: a mini review. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, (2014), 4, p: 2434-2439.
- [11] Daniel G, Verônica M. The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology. Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology, First Edition. John Wiley & Sons (2014).
- [12] Vijaya Ch.S.V, Maravajhala V. Response surface methodology during optimization studies - an overview. Journal of Scientific Research in Pharmacy, (2016), 5(9), p: 124-129.

- [13] Khenaka K. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogènes ruminale chez l'ovin, Mémoire de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine, (2011), p: 19, 24.
- [14] Richter G. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie Presses polytechniques et universitaires, Romandes, (1993), p: 292.
- [15] Bernard T, Perineau F, Bravo P, Delmas M et Gaset A. Extraction des huiles essentielles: chimie et technologie. Informations chimie, Oct, (1988), 298, p: 179-184.
- [16] Bakkali F, Averbeck K, and Idaomar, M. Biological effects of essential oils, Food and Chemical Toxicology, (2008), 46, p: 446-475.
- [17] Roulier G. Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. 2^{ème} Ed par Dangles, (1990).
- [18] Wegrzyn R. Lamendinh H. Huiles essentielles et aromathérapie bucco-dentaire. Chir. Dent. Fr, (2005), 1225, p: 62-66.
- [19] Lardry J-M et Haberkorn V. L'aromathérapie et les huiles essentielles. Kinesither Rev, (2007), 6, p: 14-7.
- [20] Nogaret-Ehrhart A.S. La phytothérapie : se soigner par les plantes. Ed. Eyrolles, (2008), Paris.
- [21] Babar A, Naser A.A, Saiba S, Aftab A, Shah A.K, Firoz A. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. Asian Pac J Trop Biomed, (2015), 5(8), p: 601–61.
- [22] Benzie I.F.F, Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, (1996), 239, p: 70-76.
- [23] Carole M. 200 plantes qui vous veulent du bien. Franc, (2013), p. 120-214.
- [24] Hazzit M. Arômes alimentaires. Thèse de magister, USTHB, Alger, Algérie, (2002), p: 96.
- [25] Boz I, Burzo I, Zamfirache M.M, Toma C, Padurariu C. Glandular trichomes and essential oil composition of *Thymus pannonicus* All. (Lamiaceae). *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, (2009), p: 36-39.
- [26] Anton R et Lobstein A. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, (2005), p: 522.
- [27] Finar I.L, « Organic chemistry ». Longman Scientific et Technical, (1994), Ed 2.
- [28] Chemat F, Fabiano-Tixier A.S, Hellal A, Boutekedjiret C, Fernandez X. « Activités chimiques et biologiques des huiles essentielles ». In Chemat, F. and Fernandez, X. (Eds.), *La chimie des huiles essentielles*. Ed. Vuibert, Paris, (2012), p: 212–248.

- [29] Boutekedjiret C. Etude des procédés d'extraction appliqués à la récupération des essences de romarin : transfert de matière et modélisation. Thèse de doctorat. DPT génie chimique. E.N.P, Alger, Algérie, (1999).
- [30] Hellal Z. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Mémoire de Magister, université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie, (2011).
- [31] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, (2004), 94, p: 223-253.
- [32] Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans F.J, Reglero G. Chemical composition activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, (2005), 68, p: 790-795.
- [33] Kimbaris A.C, Siatis N.G, Daferera D.J, Tarantilis P.A, Pappas C.S, Polissiou M.G. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compound from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason Sonochem*, (2006), 13, p: 54-60.
- [34] Lucchesi M.E. 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, (2005).
- [35] Neffati A. Etude de la composition chimique et évaluation d'activités biologiques de l'huile essentielle d'une Apiaceae de Tunisie : *Pituranthos chloranthus*. Thèse de doctorat en Sciences de l'université de Caen, (2010).
- [36] Kim N.S, Lee D.S. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, (2002), 982(31), p: 31-47.
- [37] Franchomme P, Penoel D, Mars J, Jollois R. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstrations, illustrations et applications d'une science médicale naturelle. (Ed. jollois), (1990).
- [38] Richard H. Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier. Paris, (1992), p: 339.
- [39] Hemwimon S, Pavasant P, Shotiprux A. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, (2007), 54, p: 44-50.
- [40] Piochon M. Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire pour la maîtrise en ressources renouvelables. Université du Québec à Chicoutimi, (2008), p: 9.

- [41] Pourmortazavi S.M, Hajimirsadeghi S.S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatil oil analysis, *Journal of chromatography A*, (2007), 1162, p: 2-24.
- [42] Rouessac F, Rouessac A, Brooks S. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*, Ed. John Wiley and Sons, (2007), p: 31.
- [43] Mendham J, Vogel A.I, Denny R.C, Toullec J, Barnes J, Barnes J.D, Mottet M, Tomas M.J.K. *Analyse chimique quantitative de Vogel*, Ed. De Boeck Université, (2005), p: 231-314.
- [44] Burgot G, Burgot J.L. *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques électrophorèses, méthodes spectrales et méthodes thermiques*, 3ème Edition Tec & Doc Lavoisier, (2011), p: 10.
- [45] Nait A.K. Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'eucalyptus poussant dans la région de Tizi-Ouzou. Mémoire de magister, université Mouloud Mameri, Tizi-Ouzou, Algérie, (2012).
- [46] Adams R.P. *Identification of essential oil components by gaz chromatography/mass spectroscopy*. Carol Stream, IL, USA: Allured, (1995).
- [47] Dorman H.J.D, Deans S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, (2000), 88(2), p: 308-316.
- [48] Schelz Z, Molnár J, Hohmann, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, (2006), 77(4), 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.013>
- [49] Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of the essential oils. *Journal of Phytotherapy research*, (2004), 18, p: 435-448.
- [50] Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oil; *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*, (2006), 6, p: 39.
- [51] Soto-Mendivil E.A, Moreno-Rodriguez J.F, Estarron-Espinosa M, Garcia-Fajardo JA et Obledo-Vazquez E.N. Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *E-Gnosis [online]*, (2006), 4(16), p: 1-7
- [52] Ouraïni D, Agoumi A, Alaoui M.I, Alaoui K, Cherrah Y, Alaoui M.A, Belabbas M.A. Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*, (2007), 1, p: 6-14.
- [53] Domaracky M, Rehak P, Juhas Š, Koppel J. Effects of Selected Plant Essential Oils on the Growth and Development of Mouse Preimplantation Embryos In Vivo *Physiol. Res*, (2007), 56, p: 97-104.
- [54] Beirão ARB, Bernardo-Gil MG. Antioxidants from *Lavandula luisieri*. 2nd, *Mercosur Congress on Chemical Engineering*. Portugal, (2006), p: 8.

- [55] Madhavi D.L, Deshpande S.S, Salunkhe D.K, (1996). Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. p: 65.
- [56] Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, (2002), 30, p: 620-650.
- [57] Hussain A.I, Anwar F, Chatha S.A.S, Jabbar A, Mahboob S, Nigam P.S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, (2010), 41, p: 1070-1078.
- [58] Hussain A.I. Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. Thèse de Doctorat. Pakistan, (2009), p: 257.
- [59] Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, (2000), 88, p: 170-175.
- [60] Guinoiseau E. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de doctorat, (2010), p: 06.
- [61] Kurita N, Myaji M, kurane R, Takahara Y, Ichimara K. Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds rom oils of higher plants. *Agric. Boil. Chem*, (1979), 43, p: 2365-2371.
- [62] Porter N. Essential oils and their production. *Crop & Food Research*, (2001), p: 39.
- [63] Bouamer A, Bellaghit M et Mollay A. Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe verte et la menthe poivrée de la région de Ouargla ; Mémoire DES. Université Kasdi Marbah, Ouargla, Algérie, (2004).
- [64] Saller R, Berger T, Reichling J. Pharmaceutical and Medicinal Aspects of Australian Tea Tree Oil ~ Phytomedicine, (1998), 5(6), p: 489-495.
- [65] Hooser S.B. D-limonene, linalool, and crude citrus oil extracts – Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice — March, (1990), 20(2), p: 383-385.
- [66] Knight M.J, Hansen S.R, Buck W.B. Toxicity of Melaleuca oil and related essential oils applied topically on dogs and cats -Vet human toxical –April, (1994), 36(2), p: 139-142.
- [67] Haddouchi F, Lazouni HA, Meziane A, Benmansour A. Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique SCIENCE*, (2009), 05(2), p: 246-259.
- [68] Chabert G. Myrtacées et aromathérapie. Thèse de doctorat, université Joseph Fourier, Grenoble, France, (2013).

- [69] Darui-M.H. Etude phytochimique et biologique des espèces *eucalyptus globulus* (myrtaceae), *smyrnium olusatrum* (apiaceae), *asteriscus maritimus* et *chrysanthemum trifurcatum* (asterarceae). Thèse de doctorat, université Badji-Mokhtar Annaba, Algérie, (2012).
- [70] Mehani M. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la région de Ouargla. Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah- Ouargla, Algérie, (2015).
- [71] Institut national de recherche forestière. « La forêt Algérienne » éditer par Bainem-Alger, (1996).
- [72] Guignard J.L. Abrégé Botanique Systématique Moléculaire, 12 Eds Révisée. MASSON, (2001).
- [73] Boily Y, Vapuyvelde L. Screening of Medicinal Plants of Rwanda for Antimicrobial Activity. Journal of Ethnopharmacology, (1986), 6, p: 1-13.
- [74] Bayala B. Etude des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Thèse de doctorat. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand, (2014).
- [75] Kelly S. Eucalyptus. Thomas Nelson Australia, (1996), 11, p: 22-30.
- [76] Iwu M.M. Handbook of African Medicinal Plants. CRC Press, Boca Raton, (1995), p: 236.
- [77] Bamayi H, Kolo L, Okogun I.I, Ijah U.J.J. The antimicrobial activities of methanol extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. Journal of Nigerian Society of Experimental Biology, (2004), 16(2), p: 106-111.
- [78] Cruz F.D J, Järvenpää E.P, Huopalahti R, Sivik B. Comparison of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. oils from Mozambique as obtained by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction. J. Agric. Food Chem, (2001), 49, p: 2339-2342.
- [79] Herzi N, Bouajila J, Camy S, Cazaux S, Romdhane M, Condoret J.S. Comparison between supercritical CO₂ extraction and hydrodistillation for two species of eucalyptus: yield, chemical composition, and antioxidant activity. J. Food Sci, (2013), 78, p: 667–672.
- [80] Akin M, Aktumsek A, Nostro A. Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus, African Journal of Biotechnology, (2010), 9(4), p: 531-535.
- [81] Kiendrebeogo M, Coulibaly A.Y, Nebie R.C.H, Zeba B, Lamien C.E, Lamien-Meda A, Nacoulma O.G. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso. Rev. Bras. Farmacogn, (2011), 21, p: 63-69.

- [82] Cheng S, Huang C, Chen Y, Yu J, Chen W Chang S. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species, *Bioresour. Technol.*, (2009), 100, p: 452-456.
- [83] Ghasemi V, Moharramipour S, Tahmasbi G. Biological activity of some plant essential oils against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), an ectoparasitic mite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *Exp. Appl. Acarol.*, (2011), 55, p: 147-154.
- [84] Habila N, Agbaji A.S, Ladan Z, Bello I.A, Haruna E, Dakare M.A, Atolagbe T.O. Evaluation of In Vitro Activity of Essential Oils against *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma evansi*. *J. Parasitol. Res.*
- [85] Erler F, Ulug I, Yalcinkaya B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia*, (2006), 77, p: 491-494.
- [86] Negahban M, Moharramipour S. Fumigant toxicity of *Eucalyptus intertexta*, *Eucalyptus sargentii* and *Eucalyptus camaldulensis* against stored-product beetles. *J. Appl. Entomol.*, (2007), 131, p: 256-261.
- [87] Lucia A, Licastro S, Zerba E, Gonzalez A.P, Masuh H. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essential oils. *Bioresour. Technol.*, (2009), 100, p: 6083-6087.
- [88] Alzogaray R.A, Lucia A, Zerba E.N, Masuh H.M. Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germanica*. *J. Econ. Entomol.*, (2011), 104, p: 595-600.
- [89] Rasooli I, Shayegh S, Astaneh S. The effect of *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils on dental biofilm. *Int. J. Dent. Hyg.*, (2009), 7, p: 196-203.
- [90] Botineau M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Ed Tec & doc, Lavoisier, Paris, (2010), p: 1021-1043.
- [91] Aleksovski S.A, Sovová H. Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L. *J. of Supercritical Fluids*, (2007), 40, p: 239–245.
- [92] Ghorbani A, Mahdi E. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components, *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, (2017), p: 1-8.
- [93] Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York, (1981), p: 1262.
- [94] Djerroumi A et Nacef M. 100 plantes médicinales d'Algérie. Ed Palais du livre, (2004), p: 135-131.
- [95] Teuscher E, Lohstein A et Anton R. Plantes aromatiques condiments et leurs huiles essentielles. Ed. Tec et Doc, (2005), p: 522.
- [96] Radulescu V, Silvia C, Eliza O. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi volatile compound of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, (2004), 1027, p: 121-126.

- [97] Duling E.N, Owen J.C, John B.G, Rosmary F.W, Kevin A.M, Yeap L.F, Nigel B.P. Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture. Food chemistry, (2007), 101, p: 1417-1424.
- [98] Kahina A. Composition chimique et activités antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de l'aneth (*Anethum graveolens* L.), de la sauge (*Salvia officinalis* L.) et de la rue des montagnes (*Ruta montana* L.). Mémoire de magister, Ecole nationale supérieure agronomique El-Harrach-Alger, Algérie, (2013).
- [99] Akalın M.K, Tekin K, Akyüz M, Karagöz S. Sage oil extraction and optimization by response surface methodology. Industrial Crops and Products, 76, (2015), p: 829–835.
- [100] Bouaziz M, Yangui T, Sayadi S, Dhouib A. Disinfectant properties of essential oils from *Salvia officinalis* L. cultivated in Tunisia. Food and Chemical Toxicology, (2009), 47, p: 2755–2760.
- [101] Alessandra R, Carmen F, Daniela R, Felice S, Sebastiano D, Venera C, Sergio R, Maurizio B. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. Food and Chemical Toxicology, (2013), 55, p: 42–47.
- [102] Fu Z.H.W, Xiaofei H, Zhaolin S, Chunchao H. The Pharmacological Properties of *Salvia* Essential Oils. Journal of Applied Pharmaceutical Science, (2013), 3(07), p: 122-127.
- [103] Hamidpour M, Hamidpour R, Hamidpour S, Shahdari M. Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. Journal of Traditional and Complementary Medicine, (2014), 4(2), p: 82-88.
- [104] Heywood V.H. Les plantes à Fleurs, Ed. Nathan, Paris, (1996).
- [105] Ozenda P. Les Végétaux : Organisation et diversité biologique, Ed. Dunod, (2000), p: 425.
- [106] Mioulane P. Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins ; Larousse ; Ed : PROTEA, (2004), p: 7-50.
- [107] Bossard R et Cuisance P. Arbres Et Arbustes D'ornement Des Régions Tempérées Et Méditerranéennes, Paris, France, (1981).
- [108] Quezel P et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II-ed, CNRS, Paris, (1963).
- [109] Wiart C. Medicinal Plants of the Asia – Pacific: Drugs for the future? Ed: WORLD SCIENTIFIC, (2006), p: 401-416.
- [110] Bonnier G. La Grande Flore en Couleur ; Ed: BELIN, (1999), Tome 3, p: 205-206.
- [111] Takhtajan A. Flowering Plants; Ed 2: SPRINGER, (2009), 375, p: 33-41.

- [112] Clevely A et Richmond K. Plantes Et Herbes Aromatiques, Connaître Et Préparer, Larousse, Paris, (1997).
- [113] Baba-Aissa F. Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ; Ed : LIBRAIRIE MODERNE-ROUIBA, (1999), p: 243-244.
- [114] Merad C. Contribution à la Connaissance de la Pharmacopée Traditionnelle Algérienne. Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie, Institut Des Sciences Médicales, (1973), p: 101-370.
- [115] Moine L.E. Les Plantes Aromatiques et Médicinales, Ed, MOLIERE (Paris), (2001), p: 92.
- [116] Dodt K.C. The Essential Oils Book (Creating Personnel Blends for Mind and Body), Ed: STOREY BOOKS, (1996), p: 21-52.
- [117] Merghache S, Hamza M, Tabti B. Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie. Afrique science, (2009), 05(1), p: 67-81.
- [118] Mejri J, Abderrabba M, Mejri M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L.: Influence of drying, hydrodistillation duration and plant parts. Industrial Crops and Products, (2010), 32, p 671-673.
- [119] Bendriss H. Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales : "*Ruta chalpensis* et *Marrubium vulgare*". Mémoire de magister, Université Hassiba Ben Bouali Chlef, Algérie, (2003).
- [120] Benjilali B. Extraction des plantes aromatiques et médicinales : cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Le pharmacien du Maghreb, (2004).
- [121] Heni S. Sélection d'extraits bioactifs des espèces du genre *Thymus* comme conservateurs antibactériens naturels. Thèse de doctorat, université Badji-Mokhtar, Annaba, Algérie, (2016).
- [122] Chabanne A, Boyer J, Michellon R, Seguy L. Impacts des couvertures végétales sur la production de *Pelargonium x Asperum* et sur la biologie du sol (macrofaune) à l'Ile de La Réunion. World Congress on Conservation Agriculture Madrid, 1-5 October, (2001), p: 35.
- [123] Djebili K, Hadjourega G. Extraction, caractérisation et étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de géranium rosat et de santoline. Mémoire de fin d'études, Département de biologie, université de Blida, (2006), p: 15-55.
- [124] Taleb T.K. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur le bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae). Thèse de doctorat, université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie, (2015).

- [125] Foudil C.Y. Etude Comparative Des Huiles Essentielles Algériennes d'*Eucalyptus Globulus* Labill et *Camaldulensis*. Université Des Sciences et de La Technologie Houari Boumedienne, Algie, Algérie, (1991).
- [126] Abdellah F, Mohamed F, Abdelaziz C, Saadia Z. The essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* and its natural hybrid (clone 583) from Morocco. *Flavour and Fragrance Journal*, (2002), 17, p: 395–397.
- [127] Shama H, Mohamed R, Zakaria H, Badr S, Mohamed G et Mustapha E.A. Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, (2011), 80, p: 824-836.
- [128] Adrar N, Oukil N, Bedjou F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.007>.
- [129] Attou A. Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de Magister, université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie, (2011).
- [130] Majdoub O, Dhen N, Souguir S, Haouas D, Baouandi M, Laarif A, Chaieb I. Chemical composition of *Ruta chalepensis* essential oils and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum*. *Tunisian Journal of Plant Protection*, (2014), 9(1), p: 83-89.
- [131] Ouibrahim A. Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L, *Ocimum basilicum* L et *Rosmarinus officinalis* L) de l'Est Algérien. Thèse de doctorat. Université Badji-Mokhtar, Annaba, Algérie, (2015).
- [132] Bennadja S, Tlili A.K.Y, Djahoudi A, Hadeif Y, Chefrouf A. Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) on eight bacterial strains. *Journal of Life Sciences*, (2013), 7(8), p: 814-819.
- [133] Bousbia N, Vian M.A, Ferhat M.A, Petitcolas E, Mekhati B.Y, Chemat F. Comparaison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food chemistry*, (2009), 114(1), p: 355–362.
- [134] Fadil M, A. Farah, B. Ihssane, T. Haloui, S. Rachiq. Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. by response surface methodology. *J. Mater. Environ Sci*, (2015), 6(8), p: 2346-2357.
- [135] Ramanoelina P.A.R, Bianchini J.P, Adriantsiferana M, Viano J, Gaydou E.M. Chemical composition of niaouli essential oil from Madagascar. *Journal of essential oil research*, (1992), 4(6), p: 657-658.

- [136] Hilan C, Sfeir R, Jawish D, Aitour S. Huiles essentielles de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des *Lamiceae*. *Lebanaise Science Journal*, (2006), 7(2), p: 13-22.
- [137] Figueiredo D.A.C, Barroso J.G, Pedro L.G, Scheffer J.C. Factory affecting secondary metabolites production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragrance Journal*, (2008), 23, p: 213-226.
- [138] Bouferkas F, Touabet A, Foudil Y. Extraction et analyse des essences de trois espèces d'*Eucalyptus* Algérien et l'étude de comportement chromatographique de deux pomymères synthétiques. Thèses d'ingénieur d'application chimie industrielle, université des sciences et de la technologie Houari Boumedienne. Alger, Algérie, (1996), p: 38.
- [139] Singh A.K, Nagui A.A, Bbhattacharya A.K. Chemical constituent of essential oils in different *Eucalyptus* grown in Kumaon hills (Ramikhet) INDIA. *Herba Hung*, (1989), 28(3), p: 55-58.
- [140] Baser K.H, T. Özek, S.H. Beis. *J. Essent. Oil Res*, (1996), 8, p: 413-414.
- [141] Kanko C, Sawaliho B.E, Kone S, Koukoua G, N'Guessan YT. « Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». *Comptes rendus Chimie*, (2004), 7, p: 1039–1042.
- [142] Fellah S, Romdane M, Abderraba M. Extraction et étude des huiles végétales de *Salvia officinalis* L. Cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie*, (2006), 16(2), p: 193-202.
- [143] Cliff D.S, Harerimana P.C. Extraction de l'huile essentielle complète des fleurs de *Cananga odorata* de la plaine de l'Imbo : vers la vulgarisation d'une nouvelle filière de plantes industrielles au Burundi. *Revue de l'université de Burundi, Série Sciences Exactes*, (2013)2, 8, p: 1-17.
- [144] Singh R, Chandra R, Bose M, Luthra P.M. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Curr. Sci*, (2000), 83(6), p: 737-740.
- [145] Ben Marzoug H, Mehrez R, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, Abderraba M, Khouja M, Bouajila J. *Eucalyptus oleosa* Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits), *J. molecules*. (2011), ISSN: 1420-3049.
- [146] Elaissil A, Medini H, Chraief I, Marzouk H, Bannour F, Farhat F, Ben Salah M, Chemli R et Khouja M.L. Contribution to the qualitative and quantitative study of eleven *Eucalyptus* species essential oil harvested of Hajeb's Layoun arboreta (Tunisia). *Rev. Arid Areas*, (2007), 1, p: 173-178.
- [147] Farah A, Fechtal M, Chaouch A. Effet de l'hybridation interspécifique sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles *d'eucalyptus* cultivés au Maroc, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, (2002), 6(3), p: 163-169.

- [148] Dongmo P.M.J, Ngoune L.T, Dongmo B.N, Kuate J, Zollo P.H.A, Menut C, Antifungal potential of *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus camaldulensis* essential oils from Cameroon against *Phaeoramularia angolensis*, *European Journal of Scientific Research*, (2008), 24(3), p: 348-357.
- [149] Su Y, Ho C, Wang E.I, Chang S. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of *four Eucalyptus*, *Taiwan J. For. Sci.*, (2006), 21(1), p: 49-61.
- [150] Verdeguer M, Blazquez M.A, Boira H. Phytotoxic effects of *Lantana camara*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Eriocephalus africanus* essential oils in weeds of Mediterranean summer crops, *Biochem. Syst. Ecol.*, (2009), 37, p: 362-369.
- [151] Rus C. F, Pop G, Alexa E, Şumălan R. M, Copolovici D. M. Antifungal activity and chemical composition of *Salvia officinalis* L. essential oil. *Research Journal of Agricultural Science*, (2015), 47(2), p: 186-193.
- [152] Longaray D.A.P, Moschen-Pistorello I.T, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia trilobal* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, (2007), 100, p: 603–608.
- [153] Inigo R.P.A, M.E.L Be Viana, C.A.N Catalan, D.I.A De Iglesias. *Essenze Deriv. Agrum*, (1981), 5(1), p: 349-351.
- [154] Rustaiyan A, M Khossravi, F Sultani–Lotfabadi, M Yari, S Masoudi, A Monfared. *J. Essent. Oil Res.*, (2002), 14, p: 378-379.
- [155] Bagchi G.D, P.D Dwivedi, S Mandal, A.A Naqvi, S Kumar. *Indian Perfumer*, (2003), 47(1), p: 39–41.
- [156] Verzera A, L Mondello, S Ragusa, G Dugo. *Essenze Derivati agrumari*, (2000), 70, p: 207-210.
- [157] Baghlaif A.O, S. K. A. EL–Beih, B.A.H. EL–Tawil. *Herba Hung.*, (1983), 22, p: 39-42.
- [158] Atailia I, Djahoudi A. Composition chimique et activité antibactérienne de l’huile essentielle de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L’Hér.) cultivé en Algérie. *Phytothérapie*, (2015), 13, p: 156-162.
- [159] Bampouli A, K Kyriakopoulou, G Papaefstathiou, V Louli, M Krokida, K Magoulas. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, (2014), 1, p: 81–91.
- [160] Bourkhiss M, M Hnach, B Bourkhiss, M Ouhssine, A Chaouch, B Satrani. Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Grosolutions*, (2009), 20.

- [161] Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Chessa M, Cerri R Casanova J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, (2002), 17, p: 15-19.
- [162] Santos D.L, Heleno D.F, Leonardo L.B, José R.P, Leonice M.F, Pierre A.S, Pedro H.F, Stone S, Tatiana S.F. Chemical composition of essential oils of leaves, flowers and fruits of *Hortia oreadica*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, (2016), 26, p: 23–28.
- [163] Suzana F.A, Leonardo L.B, Joelma A.M, Roberto F.V, Pedro H.F, Renê O.C, José R.P, Maria T.F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, (2013), 23(2), p: 224-229.
- [164] Hanco V, Poilâne C, Chen J. In 17^{ème} Journées Nationales sur les Composites, Poitiers Futuroscope, France, (2011).
- [165] Jacques Goupy. Tutoriel les plans d'expériences, (2006)3, 4, p: 75-101.
- [166] Chopra S, Gayathri V.P, Sanjay K.M. Release modulating hydrophilic matrix systems of losartan potassium: Optimization of formulation using statistical experimental design. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2007), 66, p: 73-82.
- [167] Ragonese R, Macka M, Hughes J, Petocz P. The use of the Box – Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2002), 27, p: 995–1007.
- [168] Liu S, Yang F, Zhang C, Ji H, Hong H, Deng C. Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of Passiflora seed oil by response surface methodology. *J. of Supercritical Fluids*, (2009), 48, p: 9–14.
- [169] Annadurai G, Sheeja, R.Y. Use of Box-Behnken design of experiments for the adsorption of verofix red using biopolymer. *Bioprocess Engineering*, (1998), 18, p: 463–466.
- [170] Wijngaard H.H, Brunton N. The optimization of solid–liquid extraction of antioxidants from apple pomace by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, (2010), 96, p: 134–140.
- [171] Guan X, Yao H. Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat branprotein using response surface methodology. *Food Chemistry*, (2008), 106, p: 345–351.
- [172] Kheyar N, Meridja D, Belhamel K. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia, Algerian J. Nat. Products, (2014), 2(1), p: 18-26.

- [173] Newman D.J, Cragg G.M, Snader K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, (2003), 66, p: 1022-1037.
- [174] Toure D. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat, (2015), p: 34.
- [175] Maragakis L.L, Perencevich E.N, Cosgrove S.E. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* (2008), 6, p: 751-763.
- [176] Amrouni S, M Touati, Y Hadeif, A Djahoudi. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénèmase. *Phytothérapie*, (2014), 12, p: 309-313.
- [177] Girault M, Bougeon J. L'aromatogramme. *Cahier de biothérapie*, (1971), n°29.
- [178] Bondi D, Cianci P, Geraci C, Giuseppe R. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour Frag J*, (1993), 8, p: 331-337.
- [179] Beylier-Maurel M.F. Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana E.P.P.O.S*, (1976), 58, p: 283-286.
- [180] Derwich E, Benziane Z, Boukir A. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, (2010), 6(3), p: 191-198.
- [181] Oussou K.R, Yolou S, Boti J.B, Guessennnd K.N, Kanko C, Ahibo C, Casanovad J. Etude chimique et activite antidiarrique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, (2008), 24(1), p: 94-103.
- [182] Kechkar M. Extraction de la *silymarine* et étude de son activité antimicrobienne. Mémoire de magister. Université Mentouri Constantine, Algérie, (2008), p: 99.
- [183] Traoré M.C. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, (2006), p: 175.
- [184] Tepsorn R. Antimicrobial activity of *thai* traditional medicinal plants extract incorporated alginate-tapioca starch based edible films against food related bacteria including foodborne pathogens. Thèse de doctorat. Thailand, (2009), p: 370.
- [185] Celikel N, Kavas G. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci.*, (2008), 26, p: 174–181.
- [186] Baghloul F, Mansori R, Djahoudi A. In vitro antifungal effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Aspergillus niger*. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol*, (2016), 7, (Online First). DOI: 10.5455/njppp.2017.7.7021513102016.

- [187] Amrouni Sarah. Activité complémentaire d'extraits de Lamiacées (répondues en Algérie) dans le traitement des infections bactériennes chez l'homme. Thèse de doctorat, université Badji-Mokhtar Annaba, Algérie, (2015).
- [188] Hammer K.A, Carson C.F, Riley T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol*, (1999), 86, p: 985–990.
- [189] Sohounhloue D.K, Agbaka A, Dockimo E.B, Djossou L, Fouabi k.J. *SOC. Ouest. Afr. chim*, (1999), 8, p: 87.
- [190] Mehani M, Ladjel S. Biological Activity of Essential Oil of *Eucalyptus Camendulensis* on Some Fungi and Bacteria. *Journal of Engineering Research and Applications*, (2014), (4), p: 71-73.
- [191] Hmiri S, Rahouti M, Habib Z, Satrani B, Ghanmi M, EL Ajjouri M. Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *mentha pulegium* et d'*eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, (2011), 80, p: 824–836.
- [192] Somda I., Leth V, Séréme P. Antifungal effect of *Cymbopogon citratus*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Azadirachta indica* oil extracts on sorghum seed-borne fungi, *Asian Journal of Plant Sciences*, (2007), 6(8), p: 1182-1189.
- [193] Feng W, Zheng X. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food control*, (2007), 18, p: 1126-1130.
- [194] Daroui H.M. Etude phytochimique ET biologique des espèces: *Eucalyptus globulus* (*Myrtaceae*), *Smyrniun olusatrum* (*Apiaceae*), *Asteriscus maritimus* ET *Chrysanthemum trifurcatum* (*Asterarceae*). These de doctorat. Université Badji-Mokhtar, Annaba, Algérie, (2012).
- [195] Sivropoulou A, Nicolaou C, Papanikolaou E, Dokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. of Agric. and Food Chemistry*, (1997), 45, p: 3197-3201.
- [196] Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother*, (2001), 47, p: 565-573.
- [197] Miladinović D, Miladinović L. Antimicrobial activity of essential oil of *sage* from Serbia. *Physics, Chemistry and Technology*, (2000), 2(2), p: 97–100.
- [198] Khalil R, Li Z. Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. *African Journal of Biotechnology*, (2011), 10(42), p: 8397-8402.
- [199] Tularat S, Theerathavaj S, Sroisiri T, Boonyanit T, Binit S. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. *Asian Pac J of Trop Biomed*, (2013), 3(5), p: 376-380.

- [200] Alizadeh A, Shaabani M. Essential Oil Composition, Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity in *Salvia officinalis* L. Cultivated in Iran. *Advances in Environmental Biology*, (2012), 6(1), p: 221-226.
- [201] Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int. J. Food Microbiol*, (2001), 67, p: 187-195.
- [202] Mansour S. Al-said, M Tariq, M.A Al-yahya, S Rafatullah, O.T Ginnawi, A.M Ageel. Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal Herb still used in traditional medicine. *Journul of Ethnopharmacology*, (1990), 23, p: 305-312.
- [203] Ouerghemmi I, Iness B.R, Fatma Z.R, Soumaya B, Luisa P.S, Riadh K, Brahim M, Moufida S.T. Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *Journal of food and drug analysis*, (2017), 25, p: 350-359.
- [204] Ulubelen A, N Tan, A Aorskachan. From roots of *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*, (1990), 29(12), p: 3990-3992.
- [205] Oussalah, M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of action of *Spanish oregano*, *Chinese cinnamon*, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot*, (2006), 69, p: 1046–1055.
- [206] Nedorostova L, Kloucek P, Stolcova L, Pulkrabek J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria, *Food Control*, (2009), 20(2), p: 157-160.
- [207] Hogan D, Kolter L. Why are bacteria referactory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology*, (2003), 5, p: 472-477.
- [208] Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, (2003), 67(4), p: 593-656.
- [209] Chebli B, Achouri M, Idrissi H.L.M, Hmamouchi M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr, *J. Ethnopharmacol*, (2003), 89, p: 165-169.
- [210] Vilela G.R, Almeida G.S, Regitano, D'arce M.A.B, Moraes M.H.D, Brito J.O. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill. against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *J. Stored Prod. Res*, (2009), 45, p: 108-111.
- [211] Oyedeji O.A, Adeniyi B.A, Ajayi O, Konig W.A. Essential oil composition of Piper guineense and its antimicrobial activity. Another chemotype from Nigeria. *Phytotherapy Research*, (2005), 19: p. 326-364.
- [212] Knobloch K.A, Pauli B, Iberl H, Weigand N, Weis. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. of Ess. Oil Res*, (1989), 1, p: 119-123.

- [213] Meziti A. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Étude *in vitro* et *in vivo*. Mémoire de magister en biochimie appliquée option. Université El-Haj Lakhdar, Batna, Algérie, (2009), p: 18.
- [214] Reynal B, Multon J.L. Additif et auxiliaire de fabrication dans les industries agroalimentaire, Ed. Tec & Dec, (2009), p: 119, ISBN: 978-2-7430-1071-3.
- [215] Blot W, Li JY, Taylor P. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease – specific mortality in the general population. *The Journal of the National Cancer Institute*, (1993), 85, p: 1483-1491.
- [216] Guinebert E, Durand P, Prost M, Grinand R, Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole, (2005), p: 554-558.
- [217] Georgetti S.R. Evaluation of the Antioxidant Activity of Different Flavonoids by the Chimiluminescence Method. AAPS. *Journal of Pharmaceutical Science*, (2003), 5(2), p: 5.
- [218] Atawodi S.E. Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, (2005), 4(2), p: 128-133.
- [219] Diallo A. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (Myrtacées), Thèse de Doctorat en Pharmacie université de Bamako, (2005), p: 11-13.
- [220] Favier A. Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la Compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, L'actualité Chimique, (2003), p: 108-115.
- [221] Barus C. Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et diphasique - Application aux produits cosmétiques, Thèse de Doctorat université de Toulouse, (2008), p: 8.
- [222] Lévy-Dutel L. Scotto E., Les saveurs du bien être : Vivre heureux et centenaire, Ed. Eyrolles, (2011), p: 31. ISBN: 978-2-212-54681-1.
- [223] Rolland Y. Antioxydants naturels végétaux, *Oléagineux. Corps Gras Lipides (CPL)*, (2004), 11(6), p: 419-24.
- [224] Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs. Ed. Yves Dacosta, Paris, (2003), p: 317.
- [225] Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2000), 48, p: 2755–2759.

- [226] Faleiro L, Miguel G.M, Guerrero CAC, Brito J.M.C. Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L) L. ssp. *Mastichina* and *Thymus albicans*. In: Proceedings of the II WOCMAP congress on medicinal and aromatic plants, part 2: pharmacognosy, pharmacology, phytomedicine, toxicology, (1999).
- [227] Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon H. Les antioxydants dans les aliments. Les applications pratiques. Woodhead Publishing limited. CRC Press. Cambridge Angle-terre, (2001).
- [228] Litescu S.C, Eremia S, Radu G.L. « Methods for the Determination of Antioxidant Capacity in Food and Raw Materials », In Giardi, M.T.; Rea, G. and Berra, B. (Eds.), Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors. Landes Bioscience and Springer Science, (2010), p: 241–249.
- [229] Villano D, Fernandez-Pachon M.S, Moy M.L, Troncoso A.M, Garcia-Parrilla M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, (2007), 71, p: 230-235.
- [230] Hambaba L, Boudjellal K, Abdeddaim M, Aberkane M.C, Boudiaf K. Étude in vitro des activités antimicrobienne et antioxydante des extraits du fruit d'*Elaeagnus angustifolia* L. *Phytothérapie*, (2012), 10, p: 350–356.
- [231] Pinchuk I, Shoal H, Dotan Y. Lichtenberg D., Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. *Chemistry and Physics of Lipids*, (2012), 165, p: 638– 647.
- [232] Alam M.N, Bristi N.J, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, (2013), 21, p: 143– 152.
- [233] Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Bryne D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, (2006), 19, p: 669– 675.
- [234] Siddhuraju P. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *Lebensmittel- Wissenschaft & Technologic*. (2007), 40, p: 982–990.
- [235] Gil M.I, Thomàs-Barberan F.A, Hess-Pierce B, Holcroft D.M, Kader A.A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48, p: 4581-4589.
- [236] Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel- Wissenschaftund –Technologie*, (1995), 28, p: 25-30.

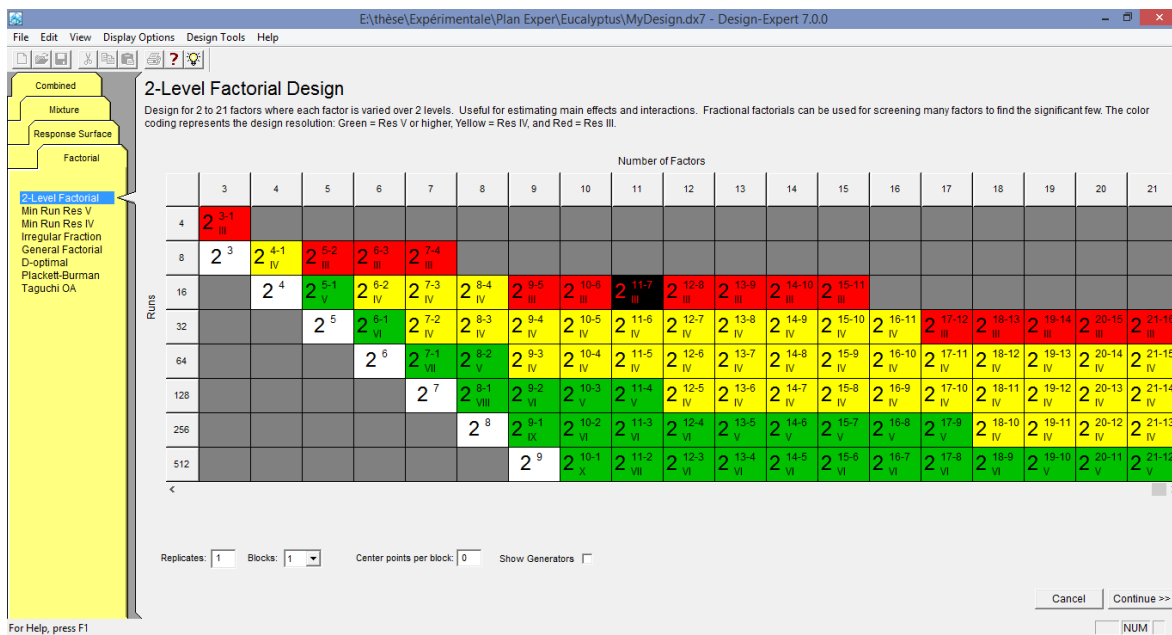
- [237] Talbi H, A Boumaza, K El-mostafa, J Talbi, A Hilali. Evaluation de l'activité antioxydante et composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. Environ. Sci. (2015), 6(4), p: 1111-1117.
- [238] Yi Z, Yu Y, Liang Y, Zeng B. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. LWT, (2008), 41, p: 597-603.
- [239] Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem. (2007), 100, p: 1409-1418.
- [240] Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis* L. oil compared to its main compounds. Food chemistry. (2008), 108(3), p: 1019-1022.
- [241] Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M.B, Taghizadeh M, Astaneh S.A, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chem. (2007), 102, p: 898-904.
- [242] Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G, Polissiou M, Sokmen A. Antibacterial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* p (Vahl). Food Chemistry, (2004), 84, p: 519-525.
- [243] Miladi H, Ben Slama R, Mili D, Zouari S, Bakhrouf A, Ammar E. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. Natural Science. (2013), 5(6), p: 729-739.
- [244] Zouari N, Fakhfakh N, Zouari S, Bougatef A, Neffati M, Ayadi M.A. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (*Lamiaceae*). Food Bioprod. Process. (2011), 89(4), p: 257-265.
- [245] Gürsoy N, Tepe B, Akpulat H.A. Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Salvia palaestina* (Benth) and *S. ceratophylla* (L.). Records of Natural Products, (2012), 6(3), p: 278-287.
- [246] Rasmy N.M, Hassan A.A, Foda M.I, El-Moghazy M.M. Assessment of the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts on the Shelf Life of Mayonnaise. World Journal of Dairy of Food Science. (2012), 7(1), p: 28-40.
- [247] Hussain A.I, Anwar f, Iqbal T, Bhatti I.A. Antioxidant attributes of four *lamiaceae* essential oils. Pak. J. Bot, (2011), 43(2), p: 1315-1321.
- [248] Jukic M, Miloš M. Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential oils (*Thymus vulgaris* L.). Croatica Chemica Acta. (2005), 78(1), p: 105-110.

- [249] Fakhfakh N, Zouari S, Zouari M, Loussayef C, Nacim Zouari N. Chemical composition of volatile compounds and antioxidant activities of essential oil, aqueous and ethanol extracts of wild Tunisian *Ruta chalepensis* L. (Rutacea). Journal of Medicinal Plants Research. (2012), 6(4), p: 593-600.

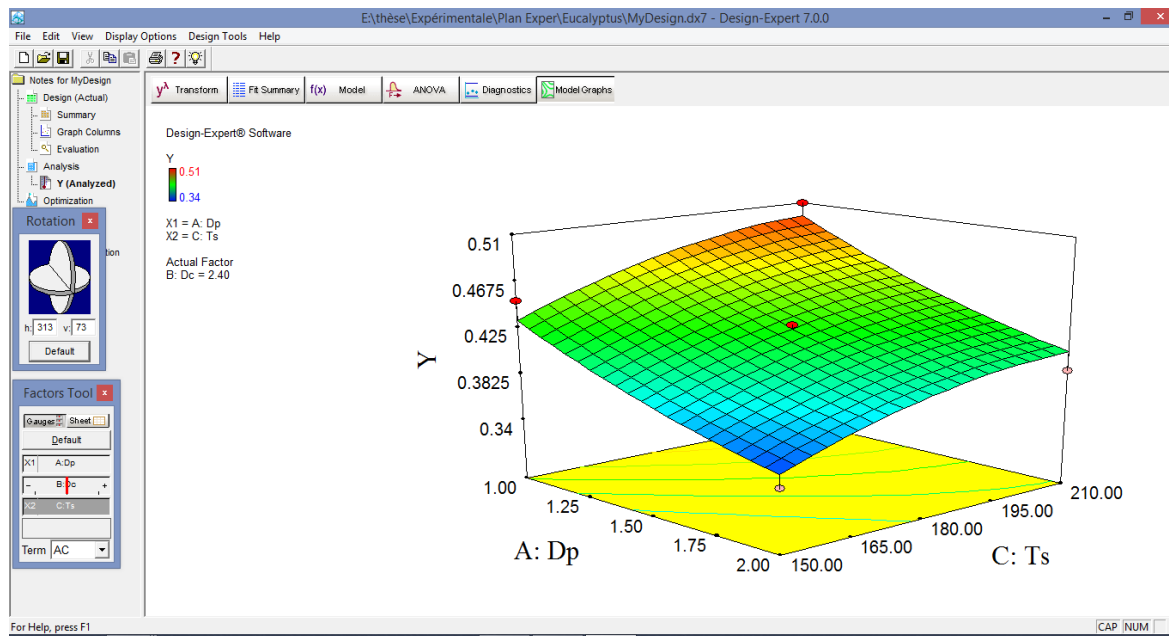
ANNEXE

ANNEXE 01

Fenêtre principale de logiciel Design-Expert 7.



Présentation de surfaces de réponses 3 dimensions.



ANNEXE 02

Résultats d'étalonnage (DPPH)

Concentration (mM)	Absorbance
0.1	0.761
0.075	0.579
0.05	0.431
0.025	0.277

Résultats d'absorbances des huiles essentielles (effet antiradicalaire DPPH)

Concentration (mg/ml)	<i>E. camaldulensis</i>			<i>S. officinalis</i>			<i>R. chalepensis</i>		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
25	0.182	0.179	0.183	0.187	0.192	0.190	0.196	0.198	0.195
50	0.137	0.143	0.141	0.149	0.147	0.150	0.157	0.152	0.154
75	0.074	0.073	0.076	0.093	0.097	0.095	0.115	0.110	0.117
100	0.072	0.066	0.063	0.083	0.081	0.086	0.103	0.107	0.105

Absorbance du blanc : 0.232

Résultats des taux d'inhibitions moyens des huiles essentielles (effet antiradicalaire DPPH)

Concentration (mg/ml)	Taux d'inhibition moyen (%)		
	<i>E. camaldulensis</i>	<i>S. officinalis</i>	<i>R. chalepensis</i>
25	22.1	19.15	15.23
50	39.08	36.2	33.11
75	68.14	59.12	51.03
100	71.18	64.07	55.2

Résultats d'absorbance et des taux d'inhibitions moyens d'acide ascorbique (effet antiradicalaire DPPH)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance			Taux d'inhibition moyen (%)
	1	2	3	
12.5	0.2066	0.2081	0.2073	10,39
25	0.1701	0.1696	0.1694	26,78
50	0.081	0.84	0.08	65,08
100	0.046	0.051	0.050	78,47

Absorbance du blanc : 0.232