

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



UNIVERSITE D'ABOU BEKR BEL KAÏD – TLEMCCEN



جامعة أبي بكر بلقايد- تلمسان

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie & Sciences de la Terre et de
l'Univers (SNV-STU)

Département des Sciences Agronomiques

MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DE DIPLOME

MASTER

AMELIORATION VEGETALE

Évaluation de l'activité antioxydante des huiles
essentielles d'*Ammoides Verticillata* de la région de
Tlemcen

Présenté par

M^{lle} Beldjord Amina

Soutenu publiquement le 30 Octobre 2014 devant un jury composé de :

Mr ELHAITOU M A	M.C.A	Président
M ^r TEFIANI C.	M.A.A	Encadreur
Mr. GHEZLAOUI B.E.	M.C.A	Examineur
Mr. BARKA M.S.	M.C.B	Examineur

Année Universitaire 2013/2014

Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de m'avoir permis de finaliser se travail dans de meilleurs conditions.

Je tiens à remercier mon promoteur Mr Tefiani Chokri, Maître assistante A à l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, pour l'honneur qu'elle m'a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

A Mr El Haitoum Ahmed, Maître assistant A à l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, j'adresse mes remerciements les plus sincères pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.

Je tiens à remercier profondément Mr Barka M.S, Maître assistant B. à l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Mr Ghezlaoui Bahae, Maître de conférences A. à l'université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, de l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Enfin, je remercie, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

*A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection et de
bénédictions durant toute ma vie*

A mon fiancé Benchenni Mohamed

A mon frère Mohamed

A mes sœurs Dalila Samira Rachida Mokhtaria et la petite Joujou

Ames très chères nièces Chaimae, Rahma et mon petit cœur Bouchra

A mes copines Aicha Asmaa et Meriem

A toutes les personnes qu'on marquer leurs présences dans ma vie

AMINA

Liste des figures

- Figure 01** : *Ammoïdes verticillata*.....P03
- Figure 02** : diagramme floral d'*Ammoides verticillata* observation a la coupe
binoculaire..... P05
- Figure 03** : séchage d'*Ammoïdes verticillata*P10
- Figure 04**: Structure de la molécule d'isoprèneP16
- Figure 05**: Diversité des structures de sécrétion des huiles
essentielles.....P17
- Figure 06** : Structure de quelques composés des huiles
essentielles.....P18
- Figure 07** : Mécanisme d'action de carvacrol sur la membrane
cellulaire.....P26
- Figure 08** : rendement en huiles essentielles obtenus par les différents stations
(feuilles et fleurs)..... P43
- Figure 09** : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides
verticillata* par la méthode DPPH.....P45
- Figure 10** : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides
verticillata* par la méthode TBARS.....P47

Figure 11 : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides*
verticillata par la methode ABTS.....P48

Figure 12 : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides*
verticillata par la methode du pouvoir réducteur.....P49

Figure 13 : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides*
verticillata par la methode de piégeage du radical hydroxyl.....P51

Liste des tableaux

Tableau01:Enquête thérapeutique *d'Ammoides verticillata*.....P07

Tableau 02: Estimation de la production d'huile essentielle de quelques pays en milliers de dollars.....P13

Tableau04 : Constantes physicochimiques de quelques constituants volatils.....P15

Tableau 05:exemples de la diversité des applications.....P24

Tableau06 :situation géographique et bioclimat des différentes stations....P32

Tableau 07 : caractères organoleptiques des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*.....P42

Liste des photos

Photos 01 : Carte géographie de station Ternny.....P30

Photos 02 : Carte géographie de station Ouziden.....P31

Photos 03 : Carte géographie de station Beni snous.....P31

Photos 04 : Montage pour l'hydrodistillation.....P34

Photos 05 : Etapes obtention des huiles essentielles.....P36

sommaire

Introduction.....	P 01
<u>Chapitre I : La plante étudiée <i>Ammoïdes verticillata</i></u>	
1-Présentation de la plante	P 03
2-Description botanique de la plante	P 04
a- Caractères botaniques	P 04
b –la formule florale et diagramme floral	P 05
c-systématique du genre <i>Ammoïdes</i> (ou ptychotis)	P 06
3- Enquête thérapeutique d' <i>Ammoïdes verticillata</i>	P 07
<u>Chapitre II: Les plantes médicinales</u>	
1- Introduction	P 09
2- Le moment de récolte.....	P 09
3- La procédure de la cueillette	P 09
4- Le séchage des plantes.....	P 10
5- LA conservation et stockage	P 10
6- LA phytothérapie	P 11
7- Mode d'emploi des plantes médicinales.....	P 11
<u>Chapitre III : Les huiles essentielles</u>	
1-Définition des huiles essentielles.....	P 12
2- Répartition systématique et caractères chimiques des huiles essentielles.....	P 13
3- Propriétés et activités biologiques des huiles essentielles.....	P 13

4- Propriétés physique des huiles essentielles.....	P 14
5-Chimie des huiles essentielles	P 15
6- Extraction des huiles essentielles.....	P 18
6-1. Principales méthodes d'extraction.....	P 18
6-2. Autres méthodes d'obtention des extraits volatils.....	P 20
7- Les applications alimentaires des huiles essentielles.....	P 22
8- Utilisation des huiles essentielles.....	P 25
9- Classification des huiles essentielles.....	p 25
10- Mode d'action des huiles essentielles.....	p 25
11- Parfumerie et cosmétologie.....	p 27
12- Toxicité des huiles essentielles.....	p 27
13- L'aromathérapie.....	P 27
14- Contrôle de qualité des huiles essentielles.....	P 28
 <u>Chapitre IV : Matériels et méthodes</u>	
1-Prévenance et récolte de matériel végétale.....	P 29
2-Situation géographique des stations d'étude.....	P 29
2- Extraction l'huile essentielle de plante étudié.....	P 29
2-1.Description des station.....	P 32
I- Matériels utilisés.....	P 32

I-1.Réactifs.....	P 32
I-2. Solutions de travail.....	P32
II. Méthodes.....	P 33
1-Obtention des huiles essentielles.....	P 33
1-1.Dispositif utilisé.....	P 33
1.1.1.-Mode de purification de l'huile essentielle d' <i>Ammoïdes</i>	P 33
1.1.2-Le Principe de purification.....	P 35
1.2-Calcul du rendement en huile essentielle.....	P 36
2. Activité antioxydante.....	P 37
2.1-Evaluation de l'activité anti oxydante par la mesure du pouvoir de piégeage DPPH.....	P 37
2.2- Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode des TBARS.....	P 37
2.3-Evaluation de l'activité anti oxydante par la methode ABTS.....	P 38
2.4- Pouvoir réducteur.....	P 39
2.5-Chélation du fer ferreux.....	P 39
2.6- L'hydroxyl.....	P 40

Chapitre V: Résultat et discution

1- Propriétés organoleptiques des huiles essentielles extraites.....	P42
2- Rendement en huiles essentielles.....	P42
3- <i>L'activité antioxydante</i>	P44
3-1. La méthode du radical libre DPPH.....	P44
3-2. La méthode de TBARS.....	P46
3- 3. La méthode de l'ABTS.....	P47
3-4 . Le pouvoir réducteur.....	P48
3-5. Le pouvoir chélateur du fer.....	P50
3- 3. La methode d'hydroxyl.....	P50
Conclusion et perspectives	P53
Références bibliographiques	

Introduction

De par leur composition chimique, les plantes aromatiques représentent un intérêt économique considérable par leur appartenance aux industries de la parfumerie, des cosmétiques, de l'agroalimentaire et de la pharmacie **Bruneton. (1999).**

En effet, elles sont douées non seulement de qualités parfumantes et culinaires, mais aussi de vertus médicinales variées grâce aux différents principes actifs qu'elles contiennent: alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, saponosides et huiles essentielles. Elles constituent un réservoir inépuisable de remèdes populaires des plus efficaces et une source naturelle de médicaments les plus usités **Beloued,A. (2001) Valnet, 1.(1998).**

De nos jours, il existe de nombreuses maladies contre lesquels les antibiotiques de synthèse deviennent de moins en moins efficaces. Aussi, l'utilisation fréquente d'antibiotiques entraîne chez certains sujets des infections secondaires (salmonellose, gastroentérite, ... etc. **(Hostettmann et Marston, 2002).**

Par ailleurs, l'emploi d'additif chimique dans l'industrie alimentaire conduit à la perte de la qualité et de la fiabilité des aliments.

Ainsi, les huiles essentielles utilisées depuis l'antiquité d'une manière empirique comme agents thérapeutiques des plus pratiques contre différents maux suscitent de plus en plus l'intérêt des scientifiques. Elles font l'objet d'étude active dans le monde pour leur emploi possible pour la préservation des aliments contre l'oxydation et comme remèdes contre les infections.

La famille des Apiaceae est l'une des familles les plus riches en huile essentielle. Elle comprend des légumes (carotte, celeri, fenouil, ...), des condiments (carvi, coriandre, cumin, persil, ...) **Kambouche, N.(2000).**

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y poussent spontanément. L'intérêt portée à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Leurs propriétés dues notamment à la fraction d'huile essentielle, peuvent être mises à profit pour traiter les infections mycosiques.

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on s'est intéressé, aux espèces de la famille des ombellifères qui est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et extrait à forte pouvoir antimicrobien.

Notre intérêt s'est porté à l'étude de « *Ammoides verticillata* » plante médicinale et aromatique très utilisé en médecine traditionnelle et comme condiment alimentaire par la population locale. En l'occurrence, l'espèce *Ammoides verticillata* que nous étudions pour les objectifs et les raisons suivants :

- L'évaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles vis a vis des radicaux libres en utilisant les méthodes suivantes :
 1. DPPH
 2. ABTS
 3. TBARS
 4. Pouvoir réducteur
 5. Pouvoir chélatant B

Par conséquent, notre travail exposé dans ce mémoire, est organisé en deux grandes parties qui engendrent cinq chapitres ci- après :

- La première partie aborde l'étude bibliographique qui regroupe trois chapitres
 - 1- La présentation de la plante d'*Ammoides verticillata*
 - 2- les plantes médicinales
 - 3- généralité sur les huiles essentielles
- La seconde partie définit l'étude expérimentale qui inclut deux chapitres
 - 1- Matériel et méthodes
 - 2- Résultat et discussion

Chapitre I : La plante étudiée *Ammoides verticillata*

1-Présentation de la plante

L'*Ammoïdes verticillata* appartient à la famille des Apiacée. C'est une famille très abondante et qui comprend plus de 3000 espèces avec 55 genres représentés en Algérie. Le genre *Ammoides* comprend deux espèces :

- *Ammoides verticillata* (plante annuelle)
- *Ammoides atlantica* (plante bisannuelle)

Son appellation dans notre pays est Noukh ou Nunkha tire son origine de la déformation du nom perse « Nankhah » qui provient de son utilisation en Iran, comme aromate dans le pain. en « Nan » et « kha » signifient respectivement pain et gout (**Baytopet et sitlupinar. 1986**).

La saveur de cette plante est fortement aromatique et piquante. Son odeur agréable, diffusible, intense et balsamique est persistant même après dessiccation. Les graines de cette plante sont très utilisées dans la préparation culinaire (pain, rôti, légume, soupe) grâce à leurs arôme forts. Par ailleurs, elles rendent plus digest les légumineuses, les haricots secs et les lentilles. Elles sont souvent mélangées à d'autres épices pour atténuer leur saveur amère (**Boulos., 1983**). En Algérie cette plante jouit d'une grande faveur populaire. en effet, elle est particulièrement très utilisée dans la préparation de la soupe d'escargot (**Kambouche et al., 2003**), cette plante a également un pouvoir antioxydant et est recommandée comme une source potentielle d'antioxydant naturel (**Metha et al., 1994, metha et Zayas.**

1995).



Figure 01 : *Ammoïdes verticillata* « originale »

Noms vernaculaires

Cette plante est connue sous les noms populaire Noukha, Nunkha et Nanoukha (**Merad, 1973 ; Sijelmassi, 1991 ; Trabut, 1935**). Mais, elle est surtout connue dans le monde sous le nom suivant :

En francais : <i>Ajowan</i> (wehmer, 1931, AFNOR)

En areb : <i>Taleb El Koubs</i> (Narayana et al., 1967)

Noms scientifiques

<i>Ammoides</i> ou <i>Ptychotis verticillata</i> (Desf) Brique.(Quezel et Santa , 1963).
--

<i>Trachyspermum ammi</i> (L.) Sprague (Syn.Carum copticum (L) Benth et Hook (Wehmer, 1931 ; Quezel et Santa , 1963 ; Naryana et al ., 1967 ; Grosjean, 2004)
--

<i>Trachyspermum copticum</i> (Schirner., 2004).
--

La dénomeration usuel de plante est Ajowan et la désignation botanique usuelle en France est <i>Crum copticum</i> Benth. Et Hook ; ptychotis ajowan D.C. ou bien <i>Trachyspermum copticum</i> Link. (AFNOR, 1992).

L'Afrique du nord offre des possibilités de croissance à cette plante grâce à son climat et à la nature de son sol. Malgré cela, cette plante est en voie de disparation .

2-Description botanique de la plante

a- Caractères botaniques

Ammoides verticillata est une plante grêle à tige ramifiée. elle peut atteindre 39 cm. les feuilles inférieures possèdent de nombreux segments multifides verticillés et les postérieures sont pénatifides à segments linéaires. L'inflorescence de cette plante est ombelliforme à fleurs de couleur blanche (**Merad., 1973**).

Elle appartient à la grande famille des ombellifères, qui est la plus évolution à cycle dynamique tardif. Elle apparait généralement au début du mois de Mai. Son cycle de reproduction se poursuit meme en Juillet.

Selon **Quezel et santa (1961)**, cette especes végétale est spontanée, annuelle, à souches filiformes et à tiges tres ramifiées de 10 -40 Cm sans rosettes, aux feuilles basales ; les

feuilles inférieures à nombreux segments multiples, verticillés, les supérieures pinnatifides à segments linéaires.

Ombelles principale de 8-15 rayons, fruits ovoïdes de moins de 1 mm de long. On la trouve généralement dans les champs, les pelouses, les montagnes, les forêts, les endroits rocheux et surtout les lieux arides.

Pour **Battandier et Trabut (1902)**, la plante a un calice à limbe obsolète des pétales avec une tache dorsale, des styles réfléchis dépassant peu le stylopode, un fruit ordinairement scabre, papilleux, ovoïde, renfermant six bandelettes par méricarpe, carpophore biparti, involucre oligophylle à folioles inégales ou nulles; la plante se trouvant généralement sur les éboulis.

D'après **Guinocet et Vilmorin (1975)**, c'est une plante annuelle de 15-35 cm, glaucescente à racines grêles pivotantes; tige dressée, striée grêle à nombreux rameaux étalés, feuilles adultes, stériles, pennatiséquées à 3-4 segments, très rapprochés, étroits, trifides.

Feuilles adultes fertiles pennatiséquées en lanières capillaires, paraissant verticillées.

Ombelles petites à 6-12 rayons capillaires très inégaux, les internes plus courts involucre nul, involucelle inégale; 3 sétacées, 2 spatulées et aristées. Fleurs blanches. fruit de 1 mm de long environ, ovoïde très légèrement comprimé par le dos, recouvert de poils épais; cinq cotés primaires filiformes, proéminentes.

b – la formule florale et diagramme floral

La formule florale est pentamère (**FF=5S + 5P+5E +2C**). Les sépales sont en général très réduits, les cinq pétales, les étamines, cinq alterniétales libres, insérées sur un disque plus ou moins apparent, l'ovaire est de deux carpelles antéro-postérieurs. **Figure 02 (Bekhechi., 2002)**



Figure 02 : diagramme floral d'*Ammoides verticillata* observation à la coupe binoculaire

c-systématique du genre Ammoides (ou ptychotis)

C'est la classification des êtres vivants d'après un système fondé sur l'emploi d'un seul ou d'un petit nombre de caractères génétiques, morphologique et embryologiques.

La composition chimique est devenue un caractère taxonomique supplémentaire (Lawrence., 1980).

Ammoides (ou ptychotis) verticillata est classé selon la clé de détermination botanique, d'après Quezel et Santa (1963) et Guinochet et Vilmorin (1975) comme suit :

Embranchement	Phanérogames
S. embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
s. classe	Dialypétales
Série	Calciflores
Ordre	Ombellales
Famille	Appiacés
Genre	Ammoides ou Ptychotis
Espèce	Verticillata

3- Enquête thérapeutique d'Ammoides verticillata

Les qualités thérapeutiques d'*Ammoides verticillata* sont connues depuis les plus anciens dans la médecine populaire locale. Cette espèce possède des qualités précieuses et jouit d'une grande faveur populaire (Sijelmassi A., 1991).

Par ailleurs, **Merad (1973)** avance que l'infusion d'*Ammoides verticillata* est utilisée comme antipyrétique, rafraîchissante et antispasmodique (surtout conseillée dans les spasmes gastro-intestinaux).

En outre, **Ziyyat A. et al (1997)** avancent que *Ammoides verticillata* est une plante aromatique utilisée comme fébrifuge, conseillée contre la grippe, et possède des propriétés thérapeutiques contre l'hypertension et/ou diabète.

Suite à notre enquête, réalisée auprès des herboristes et des gens campagne de la région de Tlemcen, les informations qu'on a pu recueillir ont montré que la plante a des usages culinaires et surtout thérapeutiques, et sont résumés dans le (tableau 1).

Tableau 1 : Enquête thérapeutique d'*Ammoides verticillata*

Parties utilisées	Indications	Mode d'emploi
	Fièvre Rhumes-grippe Maladies broncho-pulmonaires	Bouillir de l'eau avec la plante, mettre une serviette sur la tête, et inhaler les vapeurs dégagées. Ensuite, boire une tasse du mélange filtré avant de se coucher.
Plante entière	Fièvre typhoïde Antipyrétique Dépuratif Antispasmodique Affections rénales	Décoction ou infusion
	Règles douloureuses	Infusion
	Régulateur dermique	Décoction
	Asthme Douleurs gastriques Parasites intestinaux	Mélanger la plante lavée, séchée et broyée, avec du miel. Prendre 1 cuillerée à 2 par jour
	Céphalée - Migraine	Décoction ou infusion avec un citron. Boire une tasse le soir avant de se coucher.
	Sinusite	Mettre la plante dans de l'eau bouillante, laisser infuser, ensuite mélanger avec du henné et mettre sur les endroits atteints (sinus osseux de la face)
	Apaise la soif	Faire une décoction avec une tranche de citron, laisser

	(rafraîchissant)	refroidir puis mettre au réfrigérateur (boire comme une boisson rafraîchissante)
Feuilles	Condiment culinaire	Ajouter les feuilles broyées dans des soupes : chorba, soupe d'escargot, Conserve plus longtemps les aliments et empêche la formation de moisissures, exemple : les olives.
	Irritations dermiques Abscess – furoncle	Faire bouillir dans très peu d'eau, une poignée de feuilles fraîches d'Ammoides. Lorsque le liquide est presque complètement évaporé mettre les feuilles cuites sur une serviette, et les écraser pour en supprimer le suc. Laisser refroidir le cataplasme, puis l'appliquer sur la partie atteinte.
Racines	Diarrhée	Faire bouillir pendant 20 minutes dans un litre d'eau des racines d'Ammoides séchées au soleil. Filtrer la décoction, la sucrer avec un peu de miel et la boire en trois fois au cours de la journée
	Diurétique	Mettre dans un litre d'eau bouillante des racines d'Ammoides. Filtrer, quand l'infusion est devenue tiède, sucrer avec un peu de miel. Consommer le tout dans la journée.

CHAPITR II : Les plantes médicinales

1. Introduction

Les plantes médicinales portent à la fois sur les plantes spontanées dites « sauvage » ou « de cueillette » et sur les plantes cultivées.

a- Les plantes spontanées

Ce sont des plantes difficiles ou impossible de les cultiver. Elles représentent encore, d'après certaines firmes importatrices, 60 à 70 % DES DROUGES Européen. Quant à la valeur médicinale des plantes spontanées, elle se montre très inégale puis qu'elle varie suivant l'origine, le terrain et les conditions de croissance.

b- Les plantes cultivées

La culture des plantes évite ces inconvénients. Elle assure une matière première. En quantité suffisante, homogène au double point de vue aspect et composition chimique. Elle peut être intensifiée ou non suivant les besoins médicaux. Naturellement, la culture doit s'effectuer dans les meilleures conditions possibles et tenir compte entre autres, des races chimiques (**Bazanger- Beauquesne. et al. 1975**).

2. Le moment de récolte

Le choix de la période de cueillette dépend du rythme naturel de la vie végétale. Ce moment optimal varie, évidemment, selon les espèces de plante, mais il dépend aussi de la partie de la plante à récolter. En plus, il est toujours préférable de procéder à la récolte par un temps sec et chaud : les plantes mouillées de pluie ou de rosée s'altèrent, moisissent, fermentent, et perdent, de toute façon, toute valeur thérapeutique. Le matin est le moment le plus favorable mais on peut toutefois cueillir aussi le soir, avant la fraîcheur (**Debuigue., 1984**).

3. La procédure de la cueillette

Les conditions de culture, de récolte, de séchage et de stockage ont une action déterminante sur la qualité des drogues végétales. Ainsi il vaut mieux cueillir les plantes dans un lieu peu fréquenté, car les plantes destinées à être séchées, ne doivent en aucun cas être lavées. Donc, elles doivent être exemptes d'impuretés telles que terre, poussières, souillure, ainsi que d'infection ou de contamination animal. Elles ne présentent aucun signe de pourriture ou d'endommagement (**Wichtel., Anton. 1999**).

4. Le séchage des plantes

L'opération de séchage a pour but d'enlever aux plantes l'eau qu'elles renferment, pour assurer une bonne conservation, afin de favoriser l'inhibition de toute activité enzymatique, éviter la dégradation de certains constituants ainsi que la prolifération bactérienne (**Wichtel., Anton., 1999**).

L'idéal serait de faire sécher les plantes à l'endroit vaste et bien ventilé (**Dbuigue., 1984**).

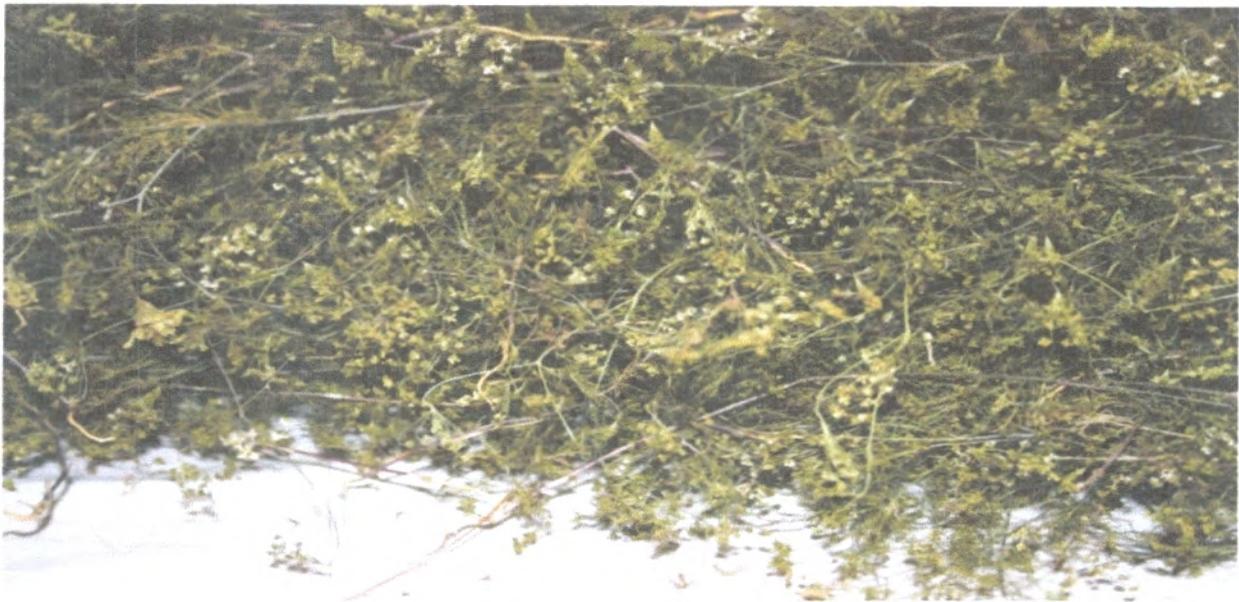


Figure 03 séchage d'*Ammoïdes verticillata* « originale »

5- LA conservation et stockage

Il est préférable d'imposer une protection vis-à-vis de la lumière à toutes les plantes, car les feuilles, fleurs, la luminosité peut accélérer de nombreux processus chimiques, et entraîner une dégradation ou une modification des constituants présentes. La température constitue un autre paramètre important et il est admis qu'une élévation de température de 10°C double la vitesse de dégradation. Donc, il est préférable de stocker les plantes dans un endroit bénéficiant d'une température et d'une humidité relative constantes (**Wichtel M., Anton R., 1999**).

6- LA phytothérapie

C'est le traitement des maladies par les plantes, transformée depuis le XIX^{ème} siècle par l'emploi des extraits de plantes, puis par celui des substances actives isolées de celles-ci (**Domar ; Bourneuf ., 1990**). La phytothérapie contemporaine est devenue une véritable science.

L'exploration de flore du globe étant loin d'être complète et de nouvelles découvertes étant faites chaque jour sur les propriétés de certaines plantes, l'étude des vertus médicinales des plantes connues ou inconnues nous réserve encore, assurément beaucoup de surprises.

On peut affirmer que non seulement la médecine par les plantes est une médecine d'aujourd'hui, mais qu'elle connaît même un regain d'actualité grâce aux progrès de la science.

Médecine lente, peut être, mais peu à peu bienfaisante et toujours inoffensive, la médecine en marge de la médecine officielle, mais devrait s'intégrer à celle-ci pour le plus grand bien du malade.

En apportant à la thérapeutique moderne sa précieuse et éternelle participation, cette médecine des premiers âges redonne au monde un peu de cette sagesse antique dont une civilisation outrancière nous a dépouillés (**Debuiue ., 1984**).

7- Mode d'emploi des plantes médicinales

Pour assurer l'action du médicament, il est nécessaire de traiter la plante, de la transformer pour en tirer la substance ayant une action spécifique.

Etant donné la multiplicité des composants constituant les principes actifs de chaque plante et la spécificité d'action de chaque d'entre eux, il a été nécessaire d'élaborer des méthodologies diverses, qui permettent, selon le but recherché, leur extraction (**Chiej ., 1982**).

Ces manipulations sont au nombre de quatre : la décoction, la macération, l'infusion et l'extraction des sucs.

Chapitre III : Les huiles essentielles

Définition

Les huiles essentielles (HE) ou essences végétales sont des substances odorantes volatiles contenues dans les végétaux supérieurs. Ce sont des produits huileux de nature hydrophobe, extraits du matériel végétal, soit par distillation à la vapeur d'eau, soit par expression (**Valnet, 1.1984**), en fleurage ou incision". 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 taches sur le papier sont passagères (**Salle, 1.L.1991**). (**Campion, P., 1. Parra, J.2006**).

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le monde végétal. Elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles botaniques comme par exemple chez les Composées (armoise, ...), les Myrtacées (eucalyptus, ...), les Rutacées (citron, orange, ...),... et les Apiacées (carvi, coriandre, persil, ...) (**Richter, G.1993**).

Les huiles essentielles peuvent être localisées aussi bien dans les fleurs, les feuilles, les fruits que dans les écorces, les graines ou les racines... Elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en poches ou en canaux sécréteurs (**Bernard, T et al.1988**). Elles se caractérisent par leurs propriétés organoleptiques (odeur, couleur et goût).

Ce sont généralement des substances fluides, de densité souvent inférieure à celle de l'eau à l'exception des essences de cannelle, de girofle et de saffran. Elles sont incolores ou faiblement colorées en jaune pâle. Mais, il en existe des colorées : cannelle (orange) absinthe(vert) et camomille (bleu).

Elles sont solubles dans tous les solvants organiques (ether, alcools, hexane, pentane,...) et très légèrement dans l'eau. Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels I.

Leur indice de réfraction est élevé et elles possèdent un pouvoir rotatoire. On leur attribue différents indices chimiques (indice d'acide, d'ester, de carbonyle, ..). (**Luque de Castro et al.1999**)

1-Répartition systématique et caractères chimiques des huiles essentielles

Les HE n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Environ 1% des espèces élaborent des essences. Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent et en particulier les labiés (Thym, Menthe, Lavande, Origan, Sauge, etc.), les Umbellifères (Anis, Fenouil, Angélique, Cumin, Coriandre, Persil, etc.), les Myrtacées (Myrthe, Eucalyptus), les Lauracées (Camphrier, Laurier-sauce, Cannelle) (**Benayad, 2008**).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organe fleur (origan), feuillés (citronnelle), écorce (cannelier), bois (bios de rose), rhizomes (acore), fruits (badiane), ou grain carvi (**Boudjemaa et Ben Guegua, 2010**).

Tableau 02: Estimation de la production d'huile essentielle de quelques pays en milliers de dollars (**Djossou ,2006**).

Pays	Valeurs
USA	145000
Chine	110000
URSS	30000
Maroc	30000
Bulgarie	26000
Inde	25000
France	20000
Egypte	12000
Espagne	10000
Algérie	8000
Haïti	8000
Madagascar	6000
Côte d'Ivoire	3500
Burkina Faso	500
Cuba	500

3. Propriétés et activités biologique des huiles essentielles

Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donne naissance a une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie.

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses, cependant, elles

possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (**Hammoudi, 2008; Ferhat et al., 2009**).

3.1. Antibactérienne

Les phénols (carvacrol, thymol) possèdent le coefficient antibactérien le plus élevé, suivi des monoterpénols (géraniol, menthol, terpinéol), aldéhydes (néral, géranial), etc (**Benayad, 2008**).

3.2. Antivirale :

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques (**Benayad, 2008**).

3.3. Antifongique :

Les mycoses sont d'une actualité criante, car les antibiotiques prescrits de manière abusive favorisent leur extension, avec les HE on utilisera les mêmes groupes que ceux cités plus haut, on ajoutera les sesquiterpéniques et les lactones sesquiterpéniques. Par ailleurs, les mycoses ne se développent pas sur un terrain acide. Ainsi il faut chercher à alcaliniser le terrain (**Benayad, 2008**).

3.4. Antiparasitaire :

Le groupe des phénols possède une action puissante contre les parasites. (**Benayad, 2008**).

3.5. Antiseptique :

Les aldéhydes et les terpènes sont réputés pour leurs propriétés désinfectantes et antiseptiques et s'opposent à la prolifération des germes pathogènes (**Benayad, 2008**).

4. Propriétés physique

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés physiques communes. Elles sont généralement sous forme liquides à température ambiante et leur grande volatilité les oppose aux "huiles fixes" (lipides). Lorsqu'elles viennent d'être préparées, leurs teintes est généralement comprise dans une gamme allant de l'incolore, à jaune pâle. Il existe toutefois quelques exceptions, comme l'huile essentielle de camomille romaine (*Anthemis nobilis*) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chamazulène (**Faye et al., 1997**).

Leur densité est le plus souvent inférieure à l'unité. Seules 3 huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau: il s'agit des huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffras. Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire puisque constituées, pour l'essentiel, de molécules asymétriques. Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leurs odeurs (eaux distillées aromatiques). Elles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Elles sont très facilement altérables et sensibles à l'oxydation, mais ne rancissent pas. Le caractère odorant des huiles essentielles est lié à la volatilité des molécules qui les composent ce qui permet de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau (Faye et al., 1997).

Tableau 03 : Constantes physicochimiques de quelques constituants volatils (Rivera, 2006).

composés	Masse Molaire (g/mol)	Densité	Volume molaire (cm ³ /mol)
α- pinène	136	0,8580	158,51
β- pinène	136	0,8650	157,23
limonène	136	0,8450	160,95
Acétate de géranyle	196	0,9174	213,65
β- selinène	204	0,9140	223,19
Carotol	222	0,9624	230, 67

5. Chimie des huiles essentielles

Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents, parmi lesquels deux ou trois sont des composants majeurs constituant de 20 à 70% du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces. A titre d'exemple, le carvacrol et le thymol sont les composants majeurs de l'huile d'Origanum compactum, le linalol pour l'huile de Coriandrum sativum, le menthol et le menthone pour l'huile de Mentha piperita. Généralement ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques de l'huile essentielle (Garnon, 1991).

La plupart des composants des HES sont inclus dans deux groupes : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes, les deux sont synthétisés à travers deux voies métaboliques séparées **Les terpénoïdes** : Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, végétaux, plus de 15.000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones (C₅H₈), communément appelée isoprène (**Figure 04**). Selon le nombre répétitif de cette unité, les terpénoïdes sont classés en : monoterpénoïdes (C₁₀), sesquiterpénoïdes (C₁₅) et diterpénoïdes (C₂₀). Dans la composition de la plupart des huiles essentielles les monoterpénoïdes et les sesquiterpénoïdes forment la majeure partie (**Figure 05**).

Les phénylpropanoïdes

Ils sont moins fréquents par rapport aux terpénoïdes. Néanmoins, certaines plantes possèdent ces composés avec des proportions significatives. Les phénylpropanoïdes dérivent majoritairement de la phénylalanine (**Khenaka ,2011**).

Ils sont constitués d'une chaîne carbonée liée à un noyau aromatique à six carbones (**Figure 05**) (**Khenaka ,2011**).

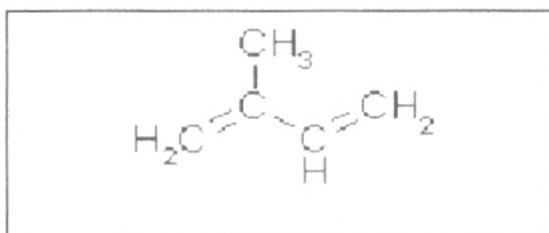


Figure 04: Structure de la molécule d'isoprène (**Calsamiglia et al., 2007**).

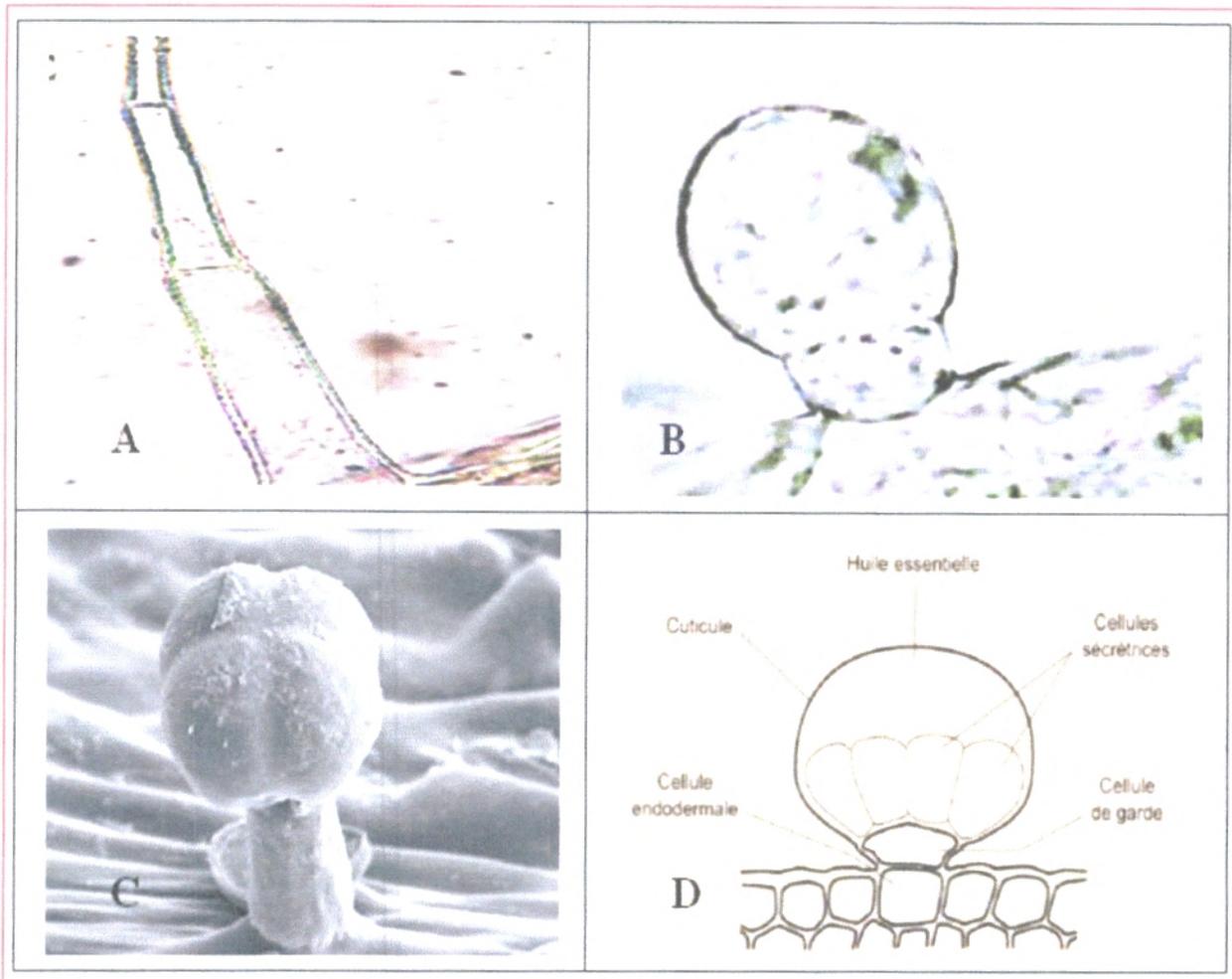


Figure 05: Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles. (A) : poil sécréteur de *Mentha pulegium*), (B) : trichome glandulaire de *Mentha pulegium*, (C) : trichome glandulaire de *Lippia scaberrima* et (D) : structure de trichome glandulaire de *Thymus vulgaris* (Combrinck et *al.*, 2007 ; Karray-Bouraoui et *al.*, 2009).

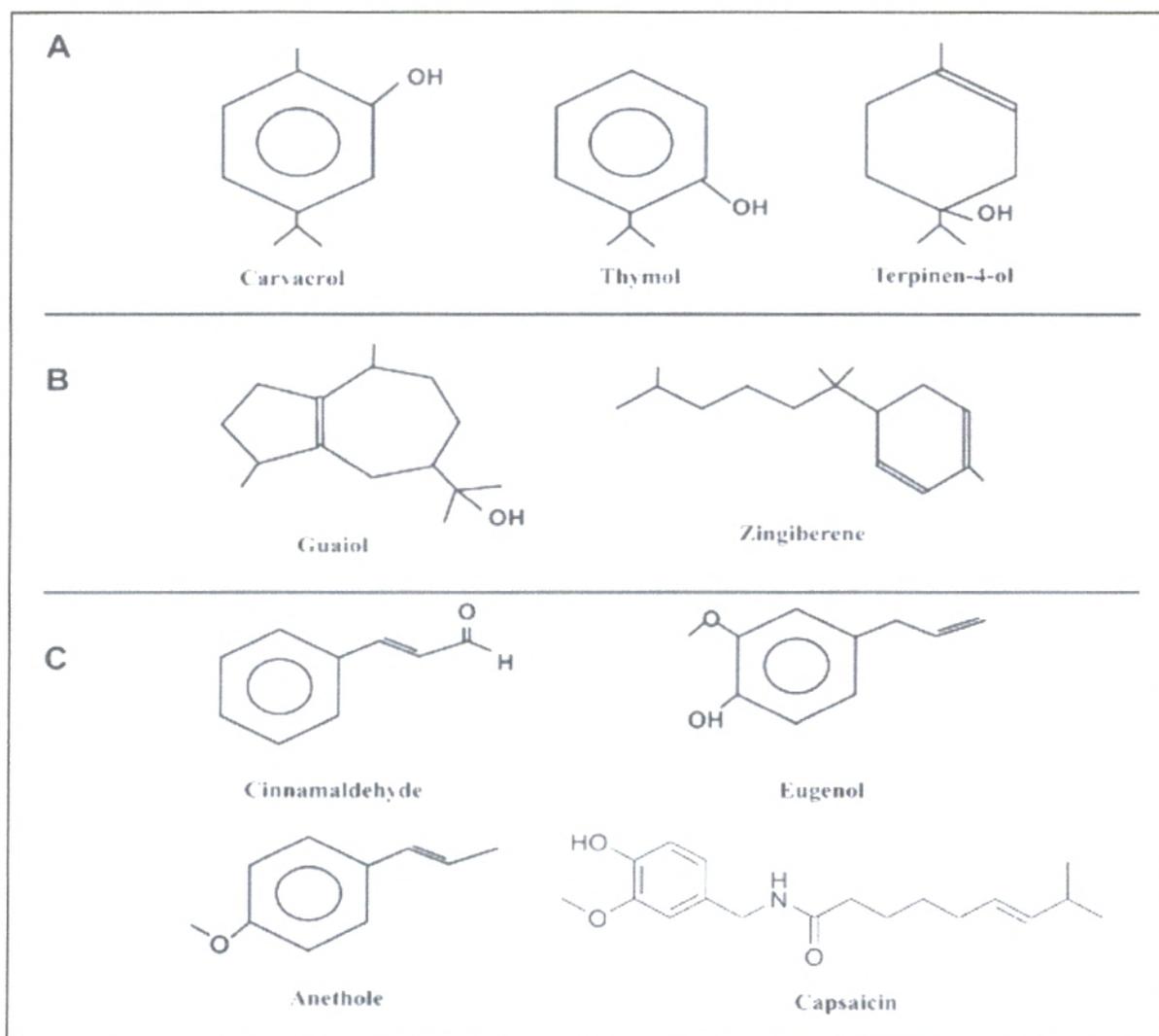


Figure 06 : Structure de quelques composés des huiles essentielles (A) : monoterpénoïdes, (B) : sesquiterpénoïdes et (C) : phénylpropanoïdes (Calsamiglia *et al.*, 2007).

6. Extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction (Samate Abdoul, 2001).

6.1. Principales méthodes d'extraction

Il existe plusieurs méthodes de distillation dont voici les principales :

6.1.1. L'entraînement à la vapeur d'eau

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation (**Bruneton, 1993**).

En fonction de sa densité, elle peut être recueillie à deux niveaux:

- au niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, ce qui est fréquent ;
- au niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau.

Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l'hydrodistillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydrodiffusion (**Bruneton, 1993**).

6.1.2. L'hydrodistillation

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité, de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation (**Brian, 1995**).

6.1.3. La distillation à vapeur saturée

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées. La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées (**Brian, 1995**).

6.1.4. L'hydrodiffusion

Elle consiste à pulser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie du temps, de vapeur et d'énergie (Roux, 2008).

6.1.5. L'expression à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'encore des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008).

6.2. Autres méthodes d'obtention des extraits volatils

6.2.1. Extraction par solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité; de ce fait, de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure (Brian, 1995).

6.2.2. Extraction par les corps gras

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est

une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite. Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras (**Brian, 1995**).

6.2.3. Extraction par micro- ondes

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelée Vacuum Microwave Hydrodistillation (VMHD) consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en oeuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats. Cette technique présente les avantages suivants: rapidité, économie du temps d'énergie et d'eau, extrait dépourvu de solvant résiduel (**Justin Nzeyumwami K., 2004**).

6.2.4. Extraction par un solvant organique volatil

Cette technique est la plus pratiquée avec l'hydrodistillation. Elle consiste à épuiser la matière première de ses constituants odorants au moyen d'un solvant, puis à chasser celui-ci de l'extrait par évaporation sous vide. Il existe deux cas particuliers, les hydrolats (extraction par solvant en présence d'eau) et les alcoolats (extraction avec de l'éthanol dilué) pour lesquels on récupère les composés odorants conjointement avec le solvant lors de la distillation pratiquée pour éliminer l'eau présente dans les isolats. Le choix du solvant dépend de nombreux paramètres techniques et économiques, notamment :

- la sélectivité (pouvoir solvant),
- la température d'ébullition (stabilité thermique des constituants),
- la miscibilité dans l'eau,
- la facilité de recyclage,
- la sécurité de manipulation : les solvants choisis seront, dans la mesure du possible, non toxiques tant pour le manipulateur que pour le consommateur (**Mueller et al., 2004**).

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont surtout des hydrocarbures aliphatiques (hexane, éther de pétrole), des hydrocarbures aromatiques (toluène), des alcools ou des solvants carbonylés, et moins fréquemment des hydrocarbures halogénés (dichlorométhane). La méthode d'extraction mise en œuvre dépend aussi de la nature de la matière première végétale. On peut extraire soit à chaud, c'est-à-dire à température proche de la température d'ébullition du solvant, soit à température ambiante. On travaille, en général, dans un extracteur statique afin d'éviter la dégradation de la matrice végétale et la solubilisation concomitante de composés indésirables (**Mueller et al., 2004**).

Les solutions aromatiques obtenues, appelées miscella, sont évaporées sous vide, à température la plus basse possible afin d'éviter la dégradation des molécules odorantes. Le solvant organique extrait également des composés indésirables, en particulier des matières grasses (huile, cires, etc...). Celles-ci sont d'ailleurs responsables de la dénomination «concrète» qui traduit la tendance des produits à se solidifier à température ambiante. Un traitement secondaire est donc nécessaire pour séparer les fractions aromatique et grasse. Il consiste à entraîner, à l'éthanol, les composés aromatiques. Cette opération est pratiquée à basse température (environ -20°C). On obtient, après évaporation de l'éthanol, un produit appelé «absolue» qui comporte la majorité des composés volatils (**Sokhna et al., 1997**).

7. Les applications alimentaires des H.E

Les études qui ont été réalisées jusqu'à maintenant, montrent que les H.E peuvent être appliquées à tous les aliments. Ainsi, les H.E d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes; l' H.E. de menthe pour les produits frais (salades, yaourts...); les H.E. à base de carvacrol ou de citral pour les poissons; les H.E. de thym, de noix de muscade ou de gingembre pour les céréales (plus particulièrement celles riches en carvacrol pour le riz); et les H.E. à base de carvacrol ou de cinnamaldéhyde pour les fruits (**Caillet et Lacroix, 2007**).

Les H.E. sont aussi utilisées pour apporter de la saveur et un arôme raffiné au café, au thé, aux vins et aux liqueurs distillées (**Caillet et Lacroix, 2007**).

Les études de **Caillet et Lacroix (2007)** ont montré que l'incorporation d' H.E. dans la viande hachée du boeuf a contribué au maintien de la qualité microbiologique et à la réduction de l'oxydation des gras au-delà de sa durée normale d'entreposage. Ils ont aussi démontré que l'utilisation des H.E. pouvait augmenter la sensibilité des bactéries à différents procédés de conservation des aliments (chauffage, pasteurisation, atmosphère modifiée). Selon la bactérie et le procédé utilisé, la

sensibilisation augmente de 2 à 10 fois. Par exemple, l'H.E. mélangée à des carottes hachées, emballées sous air ou sous atmosphère modifiée (AM ou MAP: Modified Atmospheres Packaging en anglais) permet de multiplier par trois la sensibilité de *Listeria sp.*, de même que pour de la viande hachée emballée sous les mêmes conditions, une augmentation très significative de la sensibilité d'*E. Coli* (2.5 fois) et de *Salmonelle* (4.5 fois) est constatée en présence d' H.E. Aussi, l'H.E. combinée à un chauffage doux (55 °C pendant 1 minute) a permis d'inhiber totalement *Salmonelle*, alors qu'en absence d'huile, un chauffage de plus d'une heure était nécessaire pour arriver au même résultat. Cependant, le seuil d'efficacité des huiles les plus efficaces étant très bas, souvent inférieurs à 0.1%, leur ajout en très faibles quantités n'altère pas les qualités organoleptiques de l'aliment

Des investigations ont été effectuées pour évaluer l'efficacité de quatre H.E. de plantes: Laurier, clou de girofle, cannelle et thym en tant que conservateurs normaux. L'effet d'H.E aux concentrations de 0,1 de 0,5 et de 1 % a été étudié en fromage à pâte molle à faible teneur en matière grasse et à matière grasse naturelle contre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enteritidis* à 4°C et à 10°C respectivement, sur une période de 14 jours. Ils ont conclu que les H.E. des plantes choisies agissent comme inhibiteurs potentiels contre *L. monocytogenes* et *S. enteritidis* dans ce produit alimentaire (**Boubric et Boussad ,2007**).

Les traitements du pâté tout préparé de foie de porc avec le romarin retardent la croissance de *Listeria monocytogenes* .*Aeromonas hydrophila* et *Listeria monocytogenes* ont été inhibées sur la viande cuite (poitrine de poulet) par des extraits d'eugénol et de piment (**Boubric et Boussad ,2007**).

Tableau 03: exemples de la diversité des applications (Grysole, 2005).

Huiles essentielles	Parfumerie		alimentation	Médecine
	cosmétiques	technique		
Basilic	parfum		Arôme pour sauces et condiments	Antispasmodique régulateur du système
citronnelle		Arôme pour savons, désinfectant, éloigne les insectes	Arôme pour boisson et sucreries	
Eucalyptus			Arôme pour boissons, sucreries, sucreries, crèmes glacées	Anti-inflammatoire
Géranium	parfum		Arôme pour sucreries, chewing-gum	Anti-spasmodique, relaxant
lemongrass				Vasodilatateur, sédatif
Menthe poivrée		Saveur pour dentifrice	Saveur pour liqueurs, glaces, chewing-gum, chocolat	Antalgique, anesthésique, tonique, stimulant du système nerveux
Menthe verte			Saveur pour boissons, sucreries, crèmes glacées	Saveur pour les sirops par exemple

8. Utilisation des huiles essentielles

Ces HE agissent selon leur tropisme ; ce terme signifie que chaque huile exerce ses pouvoirs curatifs sur un organe ou une zone en particulier, ces substances volatiles pénètrent les tissus et l'organisme. Par exemple, l'HE de basilic est particulièrement actif au niveau de la digestion. Celle de cyprès améliore la circulation. Il est donc très important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des HE car leur usage peut comporter des inconvénients. Par exemple, une HE de menthe des champs est indiquée pour stimuler les personnes fatiguées, elle soulage les douleurs névralgiques mais ne doit jamais être utilisée dans un bain, sous peine d'irritation sérieuse de la peau. Outre ces propriétés principales, elles ont toutes une vertu (**Blayn, 1980 ; Maach et Jemali, 1986**).

9. Classification des huiles essentielles

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens, et grâce à l'indice aromatique obtenu par des aromagramme, les huiles essentielles sont classées en groupe :

- Les huiles majeures
- Les huiles médiums
- Les huiles terrains (**Chakou et Bassou, 2007**).

10. Mode d'action des huiles essentielles

Plusieurs théories sont proposées pour expliquer le mécanisme par lequel les HES exercent leur activité antimicrobienne. La composition complexe des HES tend à prouver que cette activité serait due à plusieurs mécanismes d'action différents, liés à la nature chimique de ces composés (**Skandamis et al., 2001 ; Carson et al., 2002 Burt, 2004 ;**).

La plupart des mécanismes d'action sont attribués à l'interaction des composants des HES avec la membrane cellulaire (**Benchaar et al., 2008**). Les HES sont constituées de molécules lipophiles capables de pénétrer la double couche phospholipidique, leur accumulation entre les phospholipides entraîne alors un changement de conformation et un mauvais fonctionnement de la membrane cellulaire, perturbant ainsi le transport membranaires des substances nutritives (**Sikkema et al., 1994 ; Ultee et al., 1999**). Les HES peuvent aussi perturber le gradient ionique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique ce qui diminue la stabilité membranaire et perturbe aussi le transport membranaire. Mais certaines bactéries sont capables de contrebalancer cet effet par l'utilisation de la pompe ionique, dans ce cas la croissance ralentit grâce à l'épuisement de l'énergie de la pompe (**Cox**

et al., 2001 ; Griffin et al., 1999 ; Ultee et al., 1999). Un mécanisme d'action proposé implique le groupement hydroxyle des phénols, comme le carvacrol, qui agirait comme un transporteur transmembranaire des cations et des protons monovalents, cet effet perturbe le gradient ionique et le fonctionnement membranaire des cellules microbiennes (Figure 07) (Ultee et al., 2002).

D'autres mécanismes d'action sont liés à la coagulation des constituants cellulaires par la dénaturation des protéines (Gustafson et Bowen, 1997). Les HES extraites de cannelle et de l'ail peuvent inhiber l'activité enzymatique des bactéries du rumen telle l'espèce *Enterobacter aerogenes*. D'autres HES inhibent la croissance microbienne par l'inactivation des acides nucléiques (Calsamiglia et al., 2007).

L'action des HES dépend aussi de la nature des microorganismes ciblés. Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action des HES, par rapport aux bactéries à Gram négatif. Cela peut être expliqué par la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif, elle représente en effet une barrière capable de diminuer la perméabilité des composés hydrophobes (Calsamiglia et al., 2007). Cependant, les molécules à faible poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent traverser cette barrière (Dorman et Deans, 2000 ; Ultee et al., 2002).

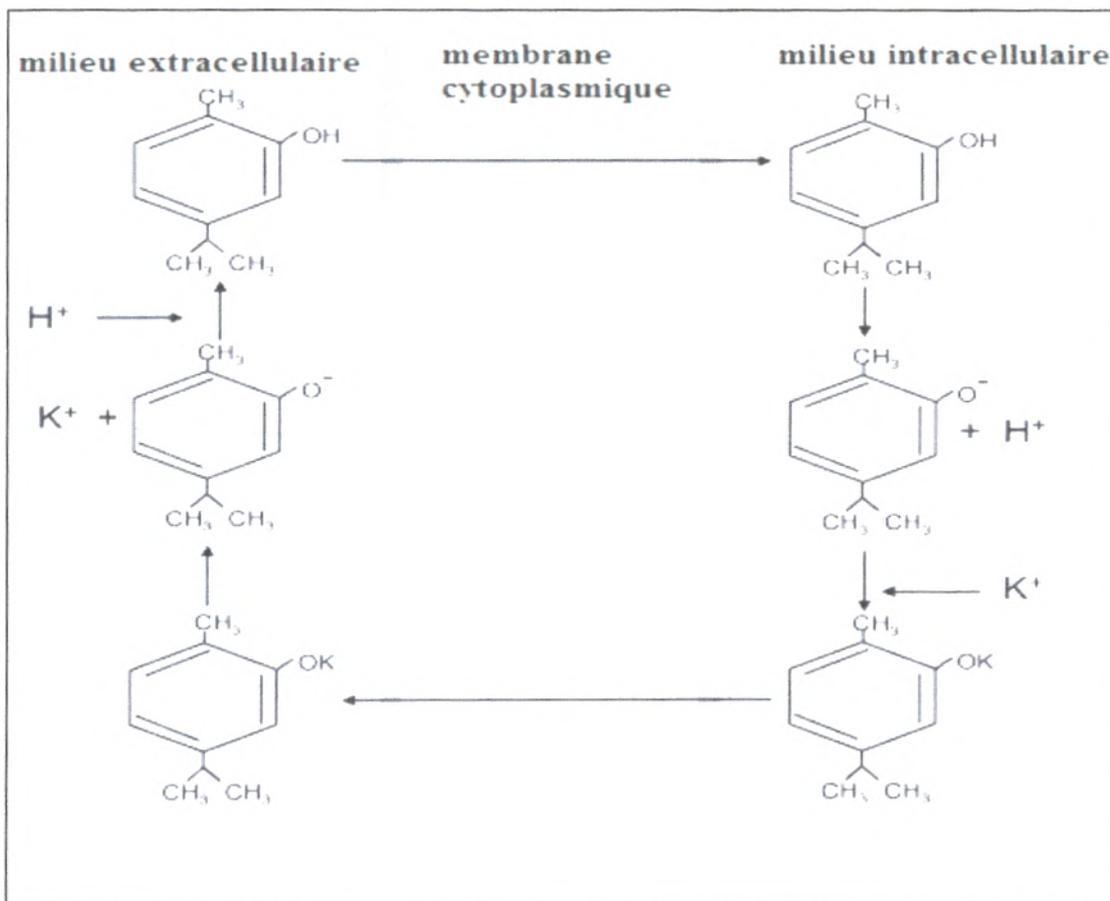


Figure 07 : Mécanisme d'action de carvacrol sur la membrane cellulaire (Ultee et al., 2002).

11. Parfumerie et cosmétologie

Un grand nombre d'H.E (400 à 500) est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums et produits de toilette. Ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique tout en leur assurant une odeur agréable (**Roulier, 1992**). De même, certains constituants chimiques isolés à partir d'HE peuvent faire l'objet de transformations chimiques donnant naissance à de nouvelles odeurs; ainsi, à partir de l'eugénol tiré de l'essence de girofle, on aboutira à l'isogénol qui a une odeur d'œillet (**Vigne, 1987**).

12. Toxicité des huiles essentielles

Les études scientifiques montrent que les huiles essentielles peuvent présenter une certaine toxicité. Il faut cependant remarquer que celle-ci varie selon la voie d'exposition et la dose prise (**Degryse et al., 2008**).

Les huiles essentielles semblent n'être toxiques par ingestion que si celle-ci est faite en de grandes quantités et en dehors du cadre classique d'utilisation. Les huiles ne seront toxiques par contact que si des concentrations importantes sont appliquées (**Degryse et al., 2008**).

Selon **Englebin(2011)**, les huiles essentielles sont des substances très puissantes et très actives, c'est la puissance concentrée du plant aromatique, il ne faut donc jamais exagérer les doses, quelque soit la voie d'absorption, car toute substance est potentiellement toxique à dose élevée ou répétée. Paracelse a dit : "rien n'est poison, tout est poison, tout dépend de la dose "Il faut également savoir qu'une période trop prolongée provoque l'inversion des effets et /ou l'apparition d'effets secondaires indésirables.

13. L'aromathérapie

L'aromathérapie, qui signifie littéralement "soin par les odeurs" est le terme que l'on utilise pour désigner la thérapie basée sur l'utilisation des huiles essentielles. Il s'agit donc de la capacité et de l'art de soigner avec les huiles essentielles (**Buronzo, 2008**).

L'aromathérapie est l'utilisation des huiles essentielles à des fins thérapeutiques. C'est une "biochimio-thérapie" naturelle sophistiquée qui repose sur la relation existant entre les composants chimiques des huiles essentielles et les activités thérapeutiques qui en découlent. Elle recourt à une méthodologie rigoureuse qui s'inspire de données scientifiques solides confirmées tant par la clinique que par le laboratoire. C'est une thérapie naturelle de qualité supérieure (**Baudoux, 2008**).

14. Contrôle de qualité des huiles essentielles

Selon la pharmacopée française et européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants. La meilleure carte d'identité quantitative qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographie en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique et de rechercher d'éventuelles traces de produits indésirables tels des pesticides ou des produits chimiques ajoutés (**Pibiri, 2006**).

Une huile essentielle pure et naturelle est caractérisée par sa composition strictement «végétale », contrairement aux essences synthétiques ou «identiques naturelles» intégralement reconstituées à partir de composés chimiques de synthèse (**Pibiri, 2006**).

MATERIELS ET METHODES

I-Matériels

1- Prévenance et récolte de matériel végétale

Notre plante *Ammoïdes verticillata* provient de 4 stations différentes de la wilaya de Tlemcen (**Ternny, Ouziden, Beni snous**).

Après la cueillette à différentes périodes à partir 18/05/2014 jusqu' a 22/06/2014, nos échantillons sont nettoyés, étalés et séchés pendant 36 semaines dans des conditions bien précises et respecte à savoir :

- ✓ A l'abri de la lumière
- ✓ A l'abri de l'humidité
- ✓ A une T° ambiante et dans un endroit bien aéré.

Seul la partie aérienne (fleurs, feuilles)

2-Situation géographique des stations d'étude

Les principaux facteurs géographiques qui influent de façon significative sur la végétation en Algérie, comme ailleurs, sont le climat (précipitation, températures, vents, radiation solaire etc..), le sol et l'altitude. En outre c'est surtout l'équilibre délicat de ces facteurs qui joue un rôle primordial à la fois dans le développement individuel des plantes et dans leur distribution (**Beniston, 1984**).

Le tapis végétal très diversifié de la région de Tlemcen offre une série de peuplements (herbacés, arbustifs et arborés). Ces espèces végétales occupent de vastes étendues au niveau des plaines et des versants montagneux.

Ainsi, il a été choisi 1 et parfois 3 stations au niveau de chaque point cardinal de la région de Tlemcen, à savoir : Ternny, Ouziden, Beni snous.

Station 02 : Ternny

Elle se trouve à 12 Km du Sud de la ville de Tlemcen longée par la route national (7). Cette station est sur haut plateau nord des monts de Tlemcen.

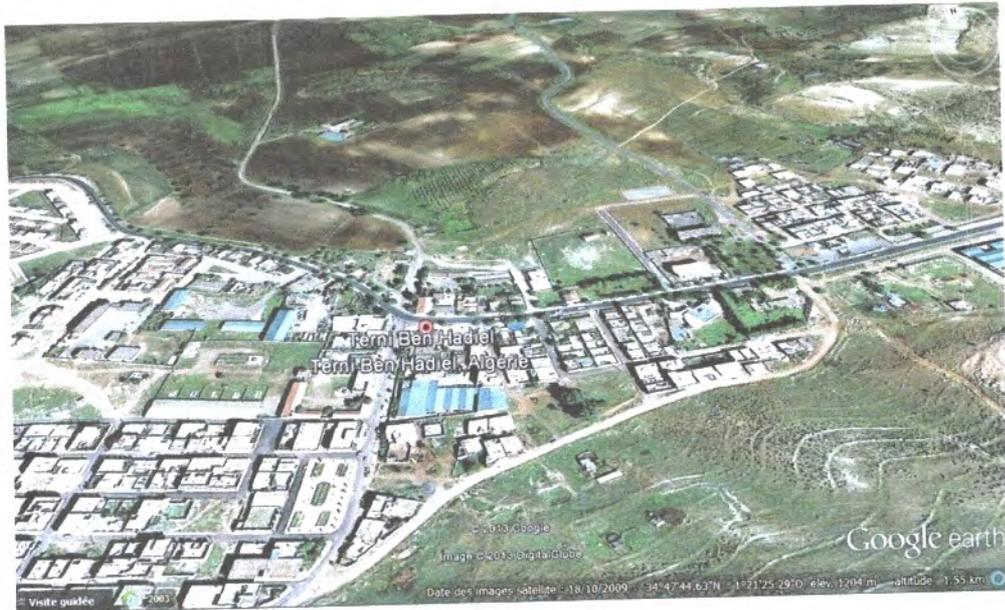


Photo 04: Carte géographique de station Ternny (Google Earth, 2014).

Station 03 : Ouziden

Elle se trouve sur 6 Km du Nord Est de la ville de Tlemcen longée par la route national(22). Cette station est sur le bassin de Tlemcen.



Photo 05: Carte géographique de station Ouziden (Google Earth, 2014)

Station03 : Beni snous

Elle se trouve sur 41 Km sud-ouest de la ville de Tlemcen. Cette station est située dans les monts de Tlemcen. Cette station est sur le bassin de Tlemcen.



Photo 05 : Carte géographique de station Beni snous (Google Earth, 2014)

2.1-Description des stations

Les différentes stations sont décrites dans le tableau

Tableau (03) : situation géographique et bioclimat des différentes stations.

Station	Localisation	Etages bio climatiques	Altitude (m)	Latitude (nord)	Longitude (ouest)
Ternny	Montes de Tlemcen	Semi- aride tempéré doux	1055	34°47'	1°21'
Ouziden	Bassin de tlemcen	Semi- aride chaud ou tempéré doux	871	34°56'	1°17'
Beni snous	Monts de Tlemcen	Semi- aride tempéré doux	835	34° 38' 35"	33' 41"

3. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH), Ferrosine [3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1, 2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt], acide trichloracétique (TCA), EDTA, , FeCl₃, ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆] et Na₂CO₃ proviennent de Sigma (Allemagne). Chlorure ferreux (FeCl₂), Acide linoléique et, TBA (1%), Tampon de phosphate, sulfate de fer, méthanol, ethanol, 2-désoxyribose.

4. Solutions de travail

- L'acide gallique (200 µg/ml): préparé dans l'eau distillée.
- solution tampon tri-Hcl (PH 7,5- 20mM)
- Solution de DPPH (0,1mM): préparée dans l'éthanol.
- Solution de FeCl₂ (0,6mM): préparée dans l'eau distillée (test de chélation du fer ferreux).
- Ferrosine (5 mM): préparée dans le méthanol 80%.
- FeCl₂: (0,6mM): préparée dans l'eau distillée (test de chélation du fer ferreux).
- EDTA (100 µg/ml) : préparé dans l'eau distillée.
- FeCl₂ (0,4%) : préparé dans de l'HCl 3,5% (test de peroxydation de l'acide linoléique).

- FeCl₃ (0,1%) : préparé dans l'eau distillée.
- TCA (10%) : préparé dans le tampon PBS (0.2M, pH 6,6)
- Solution tampon phosphate(50 mmol/ l, pH = 7.4)
- TBA (10 g/l)

II. Méthodes

1-Obtention des huiles essentielles

1.1-Dispositif utilisé

Le dispositif utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle d'*Ammoïdes* (Ou *Ptychotis*) *verticillata* est un extracteur semi industriel par l'entraînement à la vapeur d'eau.

Ce montage est constitué d'un ballon métallique contenant 5 litres d'eau, placé au-dessus d'une source de chaleur, et surmonté d'une enceinte également métallique contenant le matériel végétal, coupé en petits morceaux et placé sur une grille recouverte d'une compresse.

Cette enceinte est elle-même reliée à des réfrigérants (**Banquour, 1984**) qui condensent les vapeurs d'eau que l'on recueille sous forme de distillât dans une fiole à décanter (photo 3). Après plusieurs essais d'extraction, nous avons opté pour une durée d'extraction de 3 heures.

1.1.1.-Mode de purification de l'huile essentielle d'*Ammoïdes verticillata*

Le distillât récupéré va être purifié (élimination de toute trace d'eau). Pour cela, on utilise un appareil appelé "trompe à vide", constitué d'un entonnoir en verre fritte, d'un erlenmeyer et d'un aspirateur.

Le distillât est versé dans l'entonnoir préalablement lavé avec de l'acétone, contenant le Na₂SO₄ qui a la capacité d'absorber toute trace de molécules d'eau.

Pour éviter toute dégradation de l'huile due à l'action de l'air et de la lumière, notre échantillon est gardé au nos des tubes réfrigérateur à 4°C dans des tubes fermés et enveloppés de papier.



Photo 04: Montage pour l'hydrodistillation « laboratoire N°4 d'Agronomie» (Original)

1.1.2-Le Principe

Cette technique fait intervenir quatre étapes.

✓ ***Entrainement à la vapeur :***

On fait bouillir un mélange d'eau et de substance naturelle contenant le composé à extraire (huile essentielle). la vapeur entraîne les huiles essentielles contenues dans le produit brut. Enfin on condense ces vapeurs à l'aide d'un réfrigérant.

✓ ***Relargage***

Les huiles essentielles que l'on désire extraire sont des composés organiques en partie solubles dans l'eau. Le relargage consiste à les rendre moins solubles dans l'eau en ajoutant du chlorure de sodium. De cette façon il sera plus aisé de récupérer ces huiles essentielles.

✓ ***Décantation***

On la réalise dans une ampoule à décanter dans laquelle le mélange précédent se sépare en deux phases non miscibles. Une phase aqueuse, en générale plus dense, se situe dans la partie inférieure et une phase organique, de densité plus faible et contenant la (ou les) huiles (s) essentielle(s) se situe au dessus.

✓ ***Séparation***

Afin d'éliminer le peu d'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, on fait agir un déshydratant.

Relargage et décantation

séparation

Ampoule à décante

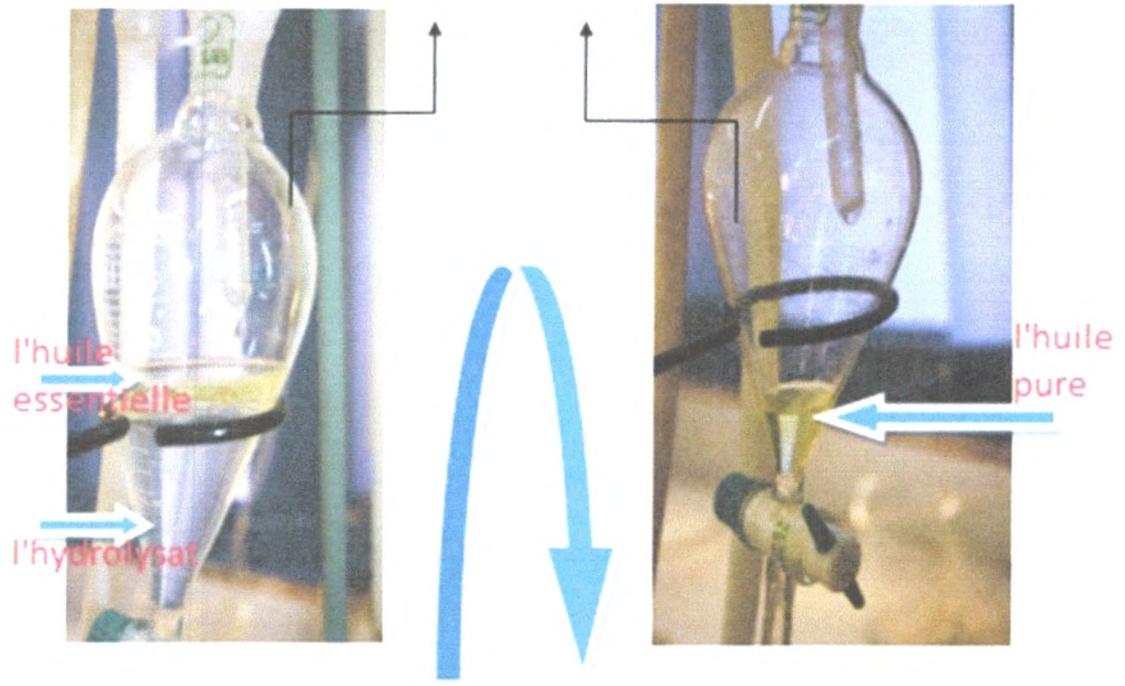


Photo 05: Etapes obtention des huiles essentielles(Original)

1.2-Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse sèche du matériel végétale à traiter (**Carré, 1953.In : Bekhchi, 2002**).

. Le rendement exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$R^{mt} = m/m_0 \times 100$$

(-) R^{mt} : rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage.

(-) m : masse en gramme de l'huile essentielle.

(-) m_0 : masse en gramme de la masse végétale à traiter sèche.

2. Activité antioxydante

Les flavonoïdes sont des molécules connues pour leurs propriétés antioxydantes (**Robak et Gryglewski, 1988**). Afin d'évaluer cette activité antioxydante des extraits naturels de notre plante, des méthodes ont été adoptées qui sont : DPPH, ABTS, TBARS, pouvoir chelatant, pouvoir réducteur,

2.1-Evaluation de l'activité anti oxydante par la mesure du pouvoir de piégeage DPPH

L'activité anti oxydante a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH*. Le test de DPPH est réalisé selon la méthode décrite par **Bruits et Bucar (2000)** ; où 50µl de chacune des solutions méthanoliques des HE testées à différentes concentrations sont mélangées avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,004%). Après 30 min, l'absorbance est lue à 517nm. Paramètres de calcul de l'activité antioxydante :

– Pourcentage d'inhibition : Pourcentage d'inhibition du DPPH (I%) est calculé de la manière suivant:
 $I\% = (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) \times 100 / A_{\text{blanc}}$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol), A échantillon : Absorbance du composé d'essai. – IC50 : Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante . – TC50 : C'est le temps atteint avec une concentration d'antioxydant égale à IC50 .

– Efficacité anti radicalaire EA : $EA = 1 / IC50 \times TC 50$ **harififar et al (2007)**

2.2- Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode des TBARS

Suivant La méthode de **Choi et al. (2002)** en utilisant une induction de la peroxydation lipidique par le couple acide ascorbique/sulfate de fer (réaction de Fenton) a été adaptée pour cet essai. A 600 µL d'extraits de plantes, est ajouté respectivement 300 µL de solution tampon Tris-HCl (pH 7,5 ; 20 mM), 500 µL d'acide linoléique (20 mM) et 100 µL de sulfate de fer (4 mM). La peroxydation débute après addition de 100 µL d'acide ascorbique (5 mM). Le mélange réactionnel obtenu est incubé au bain marie à 37°C pendant 60 minutes. Après cette étape, 2 mL de TCA (10 %) sont ajoutés dans tous les tubes. Ensuite, à 1 mL d'aliquote recueilli dans chacun des mélanges réactionnels préparés auparavant, est ajouté 1 mL de TBA (1 %). Les mélanges réactionnels obtenus sont placés dans un bain bouillant à 95°C pendant 20 minutes. L'acide gallique est utilisé comme molécule de référence. Un essai blanc est réalisé en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 532 nm et le pourcentage d'inhibition de l'acide linoléique est déterminé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = (1 - (\text{DO essai} / \text{DO blanc})) \times 100$$

2.3-Evaluation de l'activité anti oxydante par la methode ABTS:

La détermination de piégeage des radicaux ABTS a été effectuée comme indiqué par **Aazza et al.(2011)** Les essais ont été effectués en triple. La concentration de l'échantillon fournissant 50% d'inhibition (CI50) a été obtenue en traçant le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations d'huiles essentielles.

La solution de l'ABTS à été préparée par solubilisation de l'ABTS dans de l'eau distillée et après 18 h, on prépare 12 épindofs contiennent 200 µl de méthanol et marquée sur les bouchons épindofs les dilutions par l'ordre de décroissance (1/2 jusqu'à 1/4096), dans le première épindof on introduit 200 µl de l'hydrolysate ou des extraits aqueux de *Ammoides verticillata* et on mélange bien puis à l'aide d'une micropipette on prend de chaque dilution 200 µl et on le verse dans l'autre dilution et on homogénéise et on procède de la même manière suite jusqu'à la dernière dilution.

Pour chaque dilution on prépare 3 tubes à épindofs qui constituent les trois répétitions qu'on met 900 µl de la solution méthanolique de l'ABTS, puis on ajoute 25 µl de chaque dilution de l'huile essentielle ou de l'hydrodistillat qu'on laisse 6 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

Une mesure d'absorbance d'un échantillon contenant 900 µl de la solution de l'ABTS a été considérée comme témoin négatif. Les absorbances sont mesurées directement par spectrophotomètre à 517 nm et après l'avoir taré et remis à zéro par du méthanol.

2.4- Pouvoir réducteur

Le test sur le pouvoir réducteur met en avant la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron (Jayaprakasha et al., 2001)

Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode de Topçu et ses collaborateurs (2007) avec quelques modifications. Différentes concentrations d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) sont mélangées avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium [K₃Fe(CN)₆] (1%). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Ensuite, 2,5 ml de TCA (10%), 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de FeCl₃ (0,1%) sont additionnés et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf le FeCl₃. La valeur EC₅₀ est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5 et est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

2.5-Chélation du fer ferreux

Le test sur la chélation des ions Fe²⁺ quand à lui, met en avant la capacité d'une molécule à fixer les ions Fe²⁺. Les ions Fe²⁺ jouent un rôle important lors de la production des radicaux libres notamment lors de la réaction de Fenton, qui survient à chaque fois qu'une molécule d'H₂O₂ est en contact d'ions Fe²⁺ et qui est à l'origine de la production des radicaux hydroxyl (OH), un des radicaux les plus réactifs. Le fer joue aussi un rôle dans la phase de propagation de la lipoperoxydation ainsi que dans la formation du radical O₂-(Huang, et al., 2005)

La capacité chélatrice s est déterminée selon la méthode de Le et ses collaborateurs (2007) qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe²⁺-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe²⁺. Cinq cent microlitres des solutions d'extraits ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations sont additionnées à 100 µl de FeCl₂ (0.6 mM) et 900 µl de méthanol. Après 5 min d'incubation, cent microlitres de ferrosine (5 mM) sont ajoutés, et le mélange est agité et laissé réagir pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe²⁺-ferrosine est mesurée à 562 nm. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = \left[\frac{Ac - At}{Ac} \right] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle.

At : Absorbance du test.

Pour une caractérisation meilleure de l'efficacité des extraits, la concentration effectrice (EC50) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet chélateur ainsi que l'activité chélatrice exprimée en mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait sont calculées.

2.6-Piégeage du radical hydroxyle :

Le $\cdot\text{OH}$ est le radical libre extrêmement réactif formé dans les systèmes biologiques à partir d'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le fer et le cuivre suivant la réaction de Haber Weiss (**Castro et Freeman, 2001**). Ce radical possède un électron libre avec un potentiel de réduction plus élevé (2310 mV) lui permet de réagir avec les lipides, les protéines les polypeptides et l'ADN particulièrement la thiamine et la guanine (**Siddhuraju et Becker, 2007**). In vitro, la capacité à piéger le radical hydroxyle par les extraits des plantes est basée sur la réaction de Fenton en mesurant la génération du radical $\cdot\text{OH}$ et son effet sur l'oxydation et la dégradation des molécules biologiques tels que le désoxyribose de l'ADN. Dans cette technique le système implique l'auto Oxydation du complexe Fe^{2+} -EDTA dans un milieu aqueux pour former O_2 qui est rapidement dismuté en H_2O_2 à pH 7.4. Après, ce dernier est interagit avec Fe^{2+} pour former les radicaux $\cdot\text{OH}$ en présence de l'acide ascorbique comme catalyseur (réaction de Fenton) ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ -EDTA = $\text{OH} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ -EDTA) La dégradation du désoxyribose par $\cdot\text{OH}$ dégage certains produits estimés en malonaldéhyde (MDA), d'un chromogène rose lors du chauffage avec l'acide thiobarbiturique et dans un milieu acide. La présence des anti-radicaux protège et diminue la production des MDA (**Halliwell et al., 1987**). Notant que, le rôle d'ascorbate est la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} et cela provoque la réaction de Fenton (Fe^{3+} -EDTA + ascorbate Fe^{2+} -EDTA + ascorbate oxydé). La méthode de désoxyribose adoptée dans cette étude est celle de **Halliwell et al (1987)**. Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants : 0.4 ml de la solution tampon phosphate (50 mmol/l, pH = 7.4), 0.1 ml de l'extrait à différentes concentrations, 0.1 ml de l'EDTA (1.04 mmol/l), 0.1 ml de FeCl_3 (1 mmol/l) et 0.1 ml de 2-désoxyribose (60 mmol/l). La réaction est commencée par l'addition de 0.1 ml de l'acide ascorbique (2 mmol/l) et 0.1 ml de H_2O_2 (10 mmol/l). Après l'incubation à 37°C pendant 1 heure, 1 ml de l'acide thiobarbutirique (TBA) (10 g/l) est ajouté dans le milieu réactionnel suivi par 1 ml de l'acide chlorhydrique (HCl) (25%). Les mélanges sont placés au bain marie à 100°C pendant 15 min et puis sont refroidit avec de l'eau. L'absorbance des solutions est mesurée à 532 nm avec le spectrophotomètre contre le blanc. La capacité du piégeage du radical hydroxyle est évaluée avec le pourcentage d'inhibition de l'oxydation de

2-désoxyribose par les radicaux hydroxyles.

Le pourcentage du piégeage est calculé en basant sur la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de piégeage \%} = [A_0 - (A_1 - A_2)] * 100 / A_0$$

Où :

A_0 : représente l'absorbance du contrôle sans extrait, A_1 représente l'absorbance après l'addition de l'extrait et de désoxyribose, A_2 représente l'absorbance de l'extrait sans désoxyribose.

Chapitre V : résultats et discussions

1- Propriétés organoleptique de l'huile essentielle extraite

L'examen organoleptique de cette huile (**tableau 07**) consiste en un essai olfactif, toutefois, il est nécessaire de décrire l'aspect de ces huiles essentielles et de leurs saveurs.

Tableau 07 : Caractères organoleptiques des huiles essentielles *d'Ammoides verticillata*.

Huiles essentielles	Couleur	Aspect	Odeur	Saveur
<i>D'Ammoides verticillata</i>	Jaune	Liquide mobile limpide	Aromatique	Forte et piquante

2- Rendement en huile essentielle

- Calcule des rendement des feuilles et fleurs

Nous avons constaté que les rendements de la partie fleurs de Ternny et Ouziden sont plus importants que ceux de la partie feuilles, par contre le rendement de la partie fleurs de la station Beni Snous est plus important que la partie feuilles.

L'extraction de notre échantillon effectué par hydrodistillation a fourni un rendement moyen en H.E variable compris entre 1% à 3.7% obtenus à partir des trois stations. On constate que les rendements de la partie feuilles de la station de Ternny est plus importants que celui de Beni Snous et Ouziden par contre les feuilles enregistrent le taux de rendement le plus faible (**Figure 08**).

L'étude phytochimique d'*Ammoides verticillata* effectuée par **Ahmed Brahmi et Haddam (1998)**, leur a permis d'obtenir des rendements en huiles essentielles variable allant de 1.38 à 3.92%.

D'autre part, les rendements en huile essentielle de cette espèce obtenus par **Chiali et Elaihar (2000)** sont compris entre 2.52 et 3.29%. Ces résultats sont très proches de nos résultats.

En outre, les résultats obtenus par **Katzer (1998)** sont supérieurs que les nôtres car il avance que le rendement en huile essentielle des graines d'*Ammoides verticillata* varie entre 2.5 et 5%.

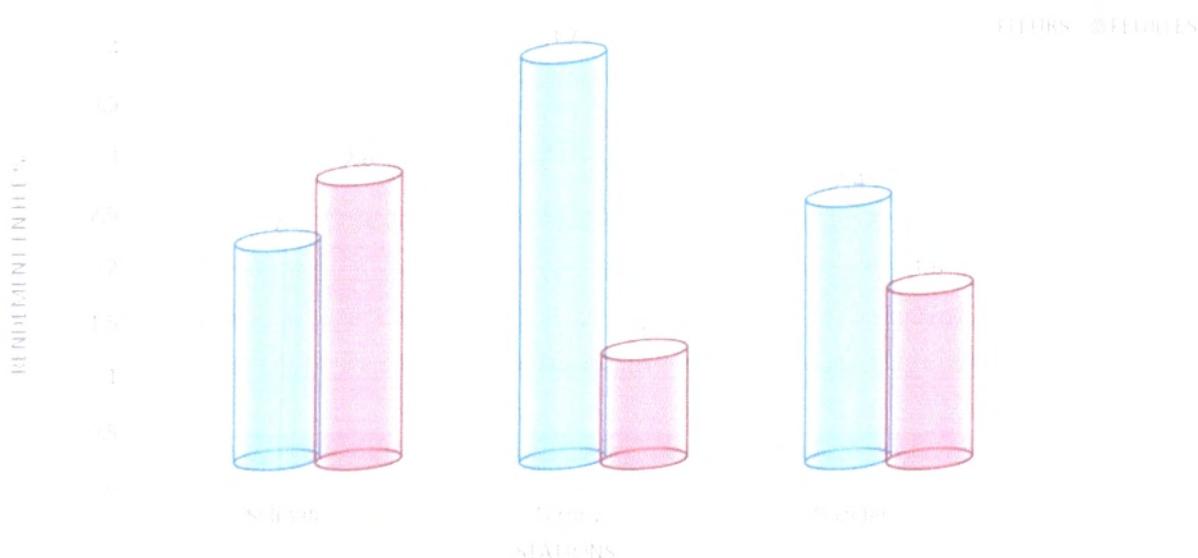


Figure 08 : rendement en huiles essentielles obtenus par les différents stations « feuilles et fleurs ».

Dans une autre étude réalisée par **Bekhechi (2002)**, le rendement moyen en huiles essentielle des échantillons d'*Ammoides verticillata* ont donné un taux qui varie entre 2.7 et 5.3%.

D'après **El Ouariachi et al. (2011)**, l'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation de la partie aérienne de *A. verticillata* récoltées à partir d'Ahfir (Maroc) donne des rendements de 2%.

Par ailleurs, le rendement en huile essentielle des grains d'*Ammoides verticillata* (plante cultivée en Inde) obtenue par hydrodistillation varie entre 4 et 6% (**Guenther, 1950 ; Narayanan et al., 1966**).

Ces observations nous permettent de supposer que les différences des teneurs en huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* sont étroitement liées aux conditions culturales, tant climatiques ; dispersion géographique, altitude ; nature du sol. **Desjobert et al. (1997)**

avancent que l'étude complète des huiles essentielles doit passer par la prise en compte des facteurs édaphiques et pour l'obtention d'un meilleur rendement, il est nécessaire de :

- ✓ Choisir un étage bioclimatique semi-aride, tempéré doux.
- ✓ Le sol doit être limoneux-argileux-sableux à texture équilibrée ou argilo-siliceux.
- ✓ Faire l'extraction des huiles essentielles par la méthode d'hydrodistillation.

3- Évaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata*

L'activité antioxydant peut être due à différent mécanisme, dont parmi la prévention de l'initiation de l'altération des chaînes, la décomposition des peroxydes, l'abstraction continue de l'hydrogène, capacité réductrice (**Bounatirou et al. 2007**). La capacité antioxydante de molécules peut être évaluée soit *in vivo*, sur des organismes vivants, soit *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante, *in vitro*, des extraits naturels, différentes méthodes ont été développées. Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs, par transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'électron (**Prior et al., 2005**). A travers l'étude bibliographique, il apparaît clairement qu'une seule méthode ne suffit pas pour caractériser une prévision complète de l'efficacité antioxydante. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physico-chimiques des molécules, il est recommandé d'utiliser plusieurs tests pour confirmer une activité antioxydante (**Rolland, 2004**). Donc nous avons choisi le test d'ABTS, du DPPH, du TBARS, le piégeage du radical hydroxyl et l'activité chélatante afin d'évaluer l'activité antioxydante de nos huiles essentielles ; ceci nous permettra de mieux généraliser les résultats.

3-1- Piégeage du radical DPPH'

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH', l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également

l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène (Masuda et al., 1999 ; Villano et al., 2007).

Le DPPH présente une coloration violette sombre mais lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes sa couleur vire vers le jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de cette coloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (Rolland, 2004).

L'utilisation du radical par le DPPH a le même mécanisme que celui des antioxydants des aliments (Bounatirou et al., 2007).

Le radical DPPH a été fortement inhibé par les huiles essentielles les différentes parties des plantes des différentes stations étudiées (Figure 09), cette bonne activité s'est manifesté par des concentration inhibitrices de 50% des radicaux libre (IC50) de l'ordre de 0,1316 et 0,1541mg/ml pour les feuilles des stations Terni et Ouzidane et avec une activité plus poussé pour les fleurs des deux stations avec des IC50 de l'ordre de 0,07852 et 0,1232mg/ml. La station de Beni Snous a révélé une activité antioxydante plus importante que les deux autres stations qui s'est traduit par des IC50 de l'ordre de 0,07647 et 0,07881 mg/ml.

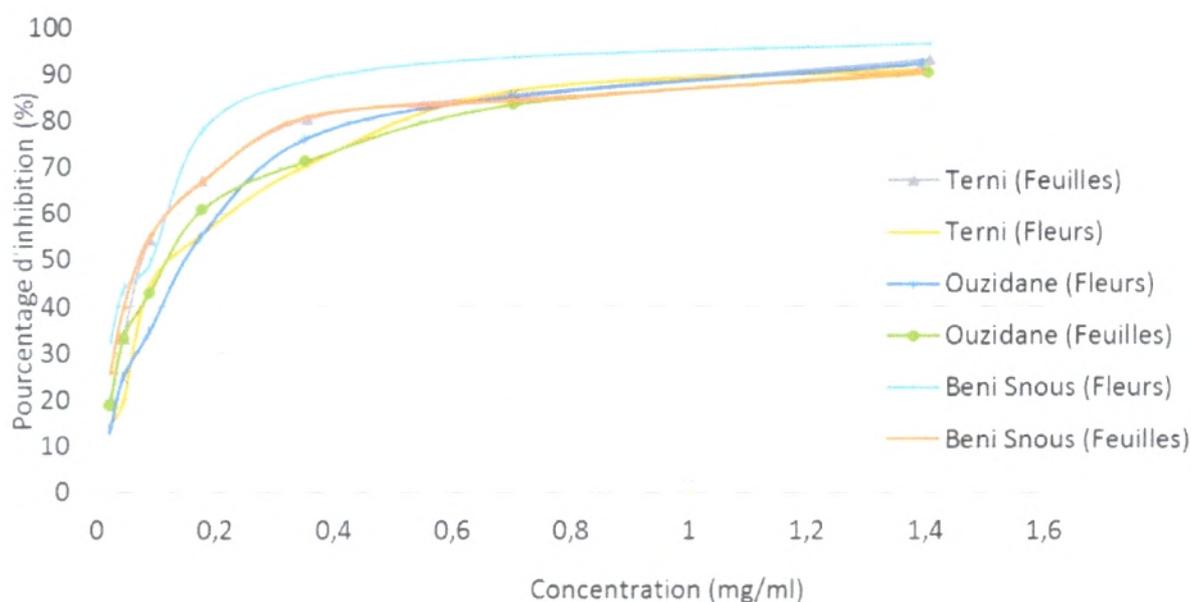


Figure 09 : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* par la méthode DPPH.

Selon **Amarti et al., (2010)** qui ont étudié l'activité antioxydante de quatre espèces de thym du Maroc, qui ont enregistré un bon effet antioxydant tel que *T. capitatus*, *T. ciliatus* et *T. bleicherianus* avec $IC_{50} = 0,069\text{mg/ml}$, $0,074\text{mg/ml}$ et $0,078\text{ mg/ml}$ respectivement, Ces résultats montrent que l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* possède une bonne activité antioxydante.

Comparée à une étude faite par **Bounatiron et al. (2007)** sur les huiles essentielles de *Thymus capitalus* de Tunisie, les huiles essentielles de *T. ciliatus* ont donné une activité antioxydante nettement supérieure que celle de *T. capitalus* et qui ont enregistré un taux d'efficacité antioxydante de l'ordre de $82,7 \pm 4,7\%$ pour une concentration de l'ordre de $0,5\text{mg/ml}$. La même concentration a été faite en comparant l'efficacité antioxydante des huiles essentielles de notre étude avec celles obtenues par **Tepe et al. (2005)** en étudiant *T. sipyleus* et avec des IC_{50} de l'ordre de $0,22\text{ mg/ml}$ pour *T. sipyleus* subsp. *Sipyleus* var. *rosulans* et $2,67\text{ mg/ml}$ pour *T. sipyleus* subsp. *Sipyleus*. De même, dans une étude faite sur les huiles essentielles de *T. spathulifolius* **Sokmen et al. (2004)** ont trouvé une IC_{50} de l'ordre de $0,243\text{ mg/ml}$.

3-2- Inhibition de la peroxydation lipidique par la méthode des TBARS

La **figure 10** nous donne une idée sur l'importante efficacité des huiles essentielles des différentes stations étudiées à inhiber le peroxyde lipidique détecté par la méthode TBARS avec des IC_{50} de l'ordre de $0,0296\text{ mg/ml}$ et $0,0225\text{mg/ml}$ (respectivement pour les fleurs et feuilles) pour la station de Terni, $0,0378$ et $0,0551\text{ mg/ml}$ pour la station de Ouzidane et de $0,0361$ et $0,0918\text{mg/ml}$ pour la station de Beni Snous.

Dans une étude réalisée par **Dandlen et al., (2010)**, l'activité antioxydante évaluée par la méthode TBARS a également montré une très bonne capacité antioxydante tel que *T. zygis* subsp *sylvestris* , avec $IC_{50} = 0.066$ à 0.087 mg/ml . Ces résultats montrent que l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp *eu-ciliatus* possède une activité antioxydante mais elle est sensiblement moins efficace.

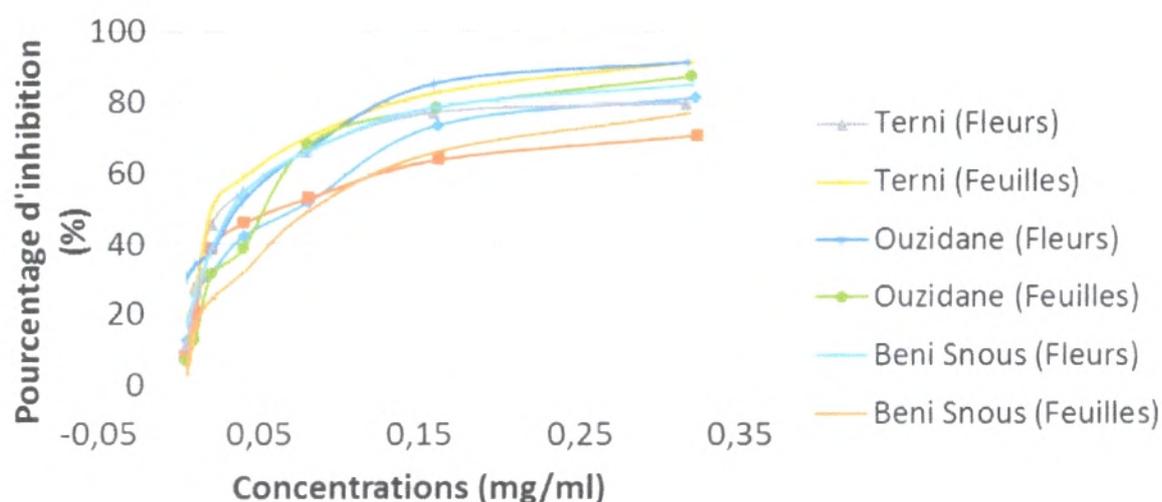


Figure 10 : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides certicillata* par la méthode TBARS.

Hazzit et al. (2009) ont enregistré une activité antioxydante similaire à la notre en étudiant les huiles essentielles de *T.algeriensis* de Chréa à 800m d'altitude ($IC_{50}=0,1067$ mg/ml) par contre la même espèce de *T.algeriensis* de Chréa mais récolté à une altitude de 1500 m s'est révélé non active. Dans la même étude *T.pallescens* récolté de plusieurs régions sont démontré des efficacités antioxydantes moins importantes comparées à *T.ciliatus*. Dans l'étude de **Viuda –Martos et al. (2010)** *Thymus vulgaris* à démontré une forte activité antioxydante testé par la méthode de TBARS avec une IC_{50} de 0,090 mg/ml.

Bounatiron et al. (2007) ont aussi enregistré une bonne efficacité antioxydante des huiles essentielles de *T.capitalus* en floraison et en poste floraison avec des IC_{50} inférieurs à 0,1 mg/ml par contre le stade végétatif donne une efficacité moindre avec des IC_{50} supérieures à 0,25 mg/ml.

3-3- Piégeage du radical $ABTS^{\cdot+}$

Le radical $ABTS^{\cdot+}$ préformé est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium (**Re et al., 1999**). La méthode d'ABTS présente une coloration bleue turquoise lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes. La forme réduite confère à la solution une coloration jaune, le virage vers cette coloration et l'intensité de la coloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance anti-radicalaire (**Miguel, 2010**).

Les résultats de l'activité antioxydante par le piégeage du radicale ABTS montrent que les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* possèdent une importante activité avec des concentrations d'IC₅₀ comprise entre 0,00472 mg/ml et 0,00395mg/ml pour les stations de Tirmi et Ouzidane et de moins de 0,0022 mg/ml pour la station de Beni Snous.

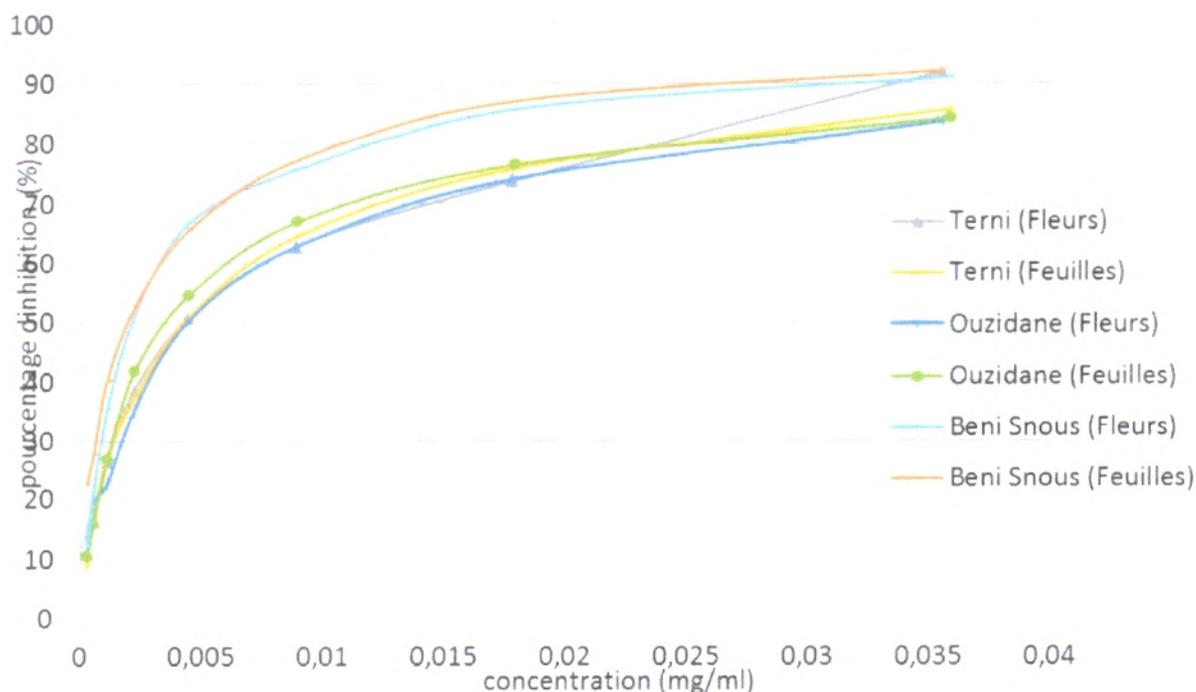


Figure 11 : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* par la méthode ABTS.

Nos résultats ont donné une efficacité antioxydant évaluée par la méthode ABTS nettement meilleurs à ceux enregistré par **Bakchiche et al. (2013)** en étudiant les huiles essentielles d'*Artemisia campestris* (IC₅₀ =1,013 mg/ml) et *Juniperus phoenica* (IC₅₀ =2,020mg/ml) par contre **Ozturk (2012)** en étudiant les huiles essentielles de *Satureja thymbra* a enregistré une activité antioxydante sensiblement similaire à nos huiles essentielles avec une IC₅₀ de 0,0093 mg/ml.

3-4- Pouvoir réducteur

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydo-réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ fournit des ions Ferriques (Fe³⁺) qui seront réduits en Ferreux (Fe²⁺) par les

antioxydants présents dans l'extrait végétal. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**.

La **figure 12** nous donne une idée sur l'efficacité de nos huiles essentielles des différentes stations pour réduire les ions Ferriques (Fe^{3+}) en Ferreux (Fe^{2+}). Cette réduction est fortement liée aux concentrations de ces huiles essentielles.

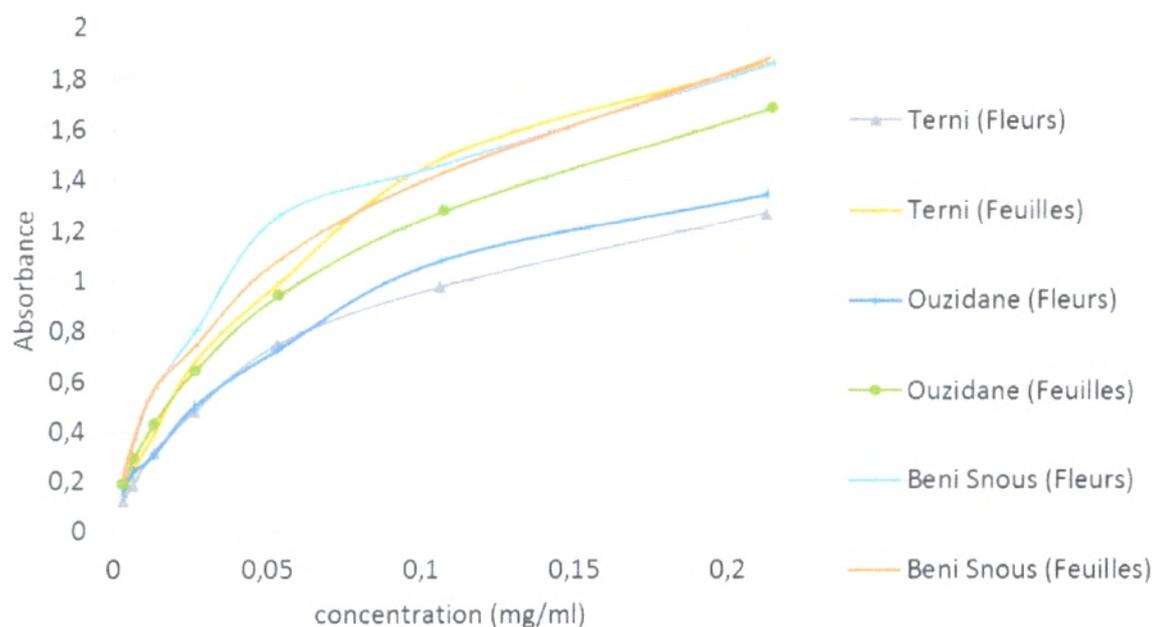


Figure 12 : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* par la méthode du pouvoir réducteur.

Plusieurs auteurs ont étudié le pouvoir réducteur des huiles essentielles de plusieurs espèces de Lauraceae d'Himalaya (**Joshi et al., 2010**), *Myrtus communis* var. *italica* (Wannes et al., 2010), *Hymenocrater longiflorus* (**Ahmadi et al., 2010**), *Origanum onites* L. (**Ozkan et al., 2010**) et *Psammogeton canescens* (**Gholivand et al., 2010**). Dans ces cas l'activité antioxydante mesurée par le piégeage du radical DPPH s'est avéré faible que les auteurs l'attribue à la faible concentration de composés phénoliques présentes dans ces huiles par contre le pouvoir réducteur s'est révélé plus efficace et a donné des résultats similaires références (acide ascorbique) même à forte concentrations.

3-5- Pouvoir chélateur du fer

Pour évaluer le pouvoir chélateur d'un extrait donné, le composé stabilisant le plus utilisé est la ferrozine (**Zhao et al., 2006**). En effet, la ferrozine forme avec le fer libre, présent dans un milieu réactionnel, un complexe ferrozine-Fe²⁺ de couleur violette intense. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer, renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des extraits à chélater cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

L'étude de l'activité chélatante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* a révélé une non activité chélatante des différentes huiles essentielles des différentes stations et parties des plantes étudiées.

Dans une étude faite par **Bounatirou et al. (2007)**, ils ont constaté que les huiles essentielles de *Thymus capitatus* Hoff. et Link. n'ont pas démontré une activité chélatante, le même constat a été fait avec **Sarikurkcü et al. (2010)** en étudiant les huiles essentielles de *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. Par contre, **Viuda-Martos et al. (2010)** ont constaté une activité chélatante avec une IC₅₀ de l'ordre de 17,32 mg/ml en étudiant les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* d'Espagne.

En étudiant l'effet chélatant des huiles essentielles de *Myrtus communis* **Wannes et al., (2010)** ont constaté que les fleurs ont exercé un effet chélatant contrairement aux feuilles et tiges qui n'ont pas démontré une activité chélatante.

3-6- Piégeage du radical hydroxyle

Ce test consiste à évaluer la capacité, de l'extrait de plante, à piéger les groupements hydroxyle (OH[•]) formés par la réaction de Fenton:



Les OH[•] générés, qui ne sont pas piégés, attaquent et dégradent le désoxyribose et les produits de dégradation sont révélés par l'acide thiobarbiturique. L'activité de piégeage des radicaux hydroxyles est étudiée en mesurant leurs capacités à prévenir la dégradation oxydative du désoxyribose, selon un test développé par **Lopes et al. (1999)**.

Les huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* ont exercées une excellent activité antioxydante (**Figure 13**) par le piègeage du radical hydroxyle en enregistrant des IC50 de l'ordre de 0,01876 et 0,01761 mg/ml (respectivement pour les fleurs et les feuilles) pour la station de Terni, 0,03545 et 0,00586 mg/ml (respectivement pour les fleurs et les feuilles) pour la station d'Ouzidane et la meilleure activité a été enregistré avec la station de Beni Snous avec des IC50 de l'ordre de 0,00066 et 0,00095 mg/ml (respectivement pour les fleurs et les feuilles).

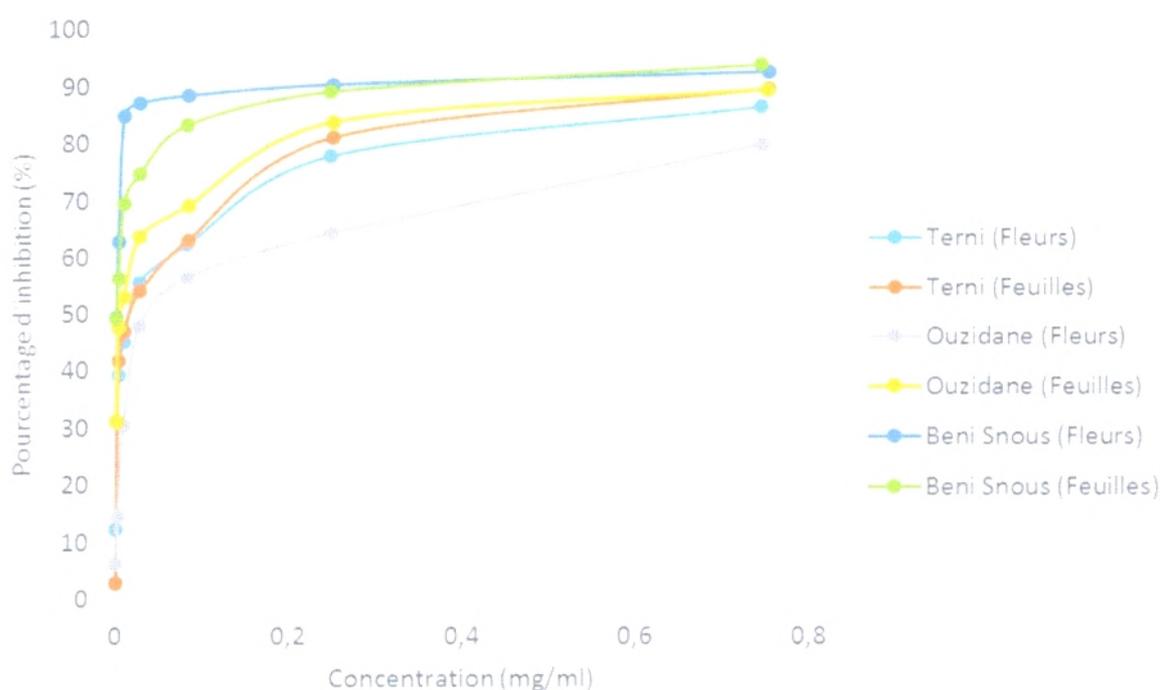


Figure 13 : l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides certicillata* par la méthode de piègeage du radical hydroxyle.

L'habilité des huiles essentielles de *Thymus marschallianus* et *Thymus proximus* à piéger le radical hydroxyle a été évalué par **Jia et al. (2010)** en utilisant la méthode de safranine. Ces auteurs ont reporté que la première huile essentielle a été plus efficace que la deuxième dans le piégeage du radicale hydroxyle et que ces huiles essentielles étaient composés principalement par thymol, *p*-cymene and γ -terpinene.

Dans une autre étude faite par **Dandlen, et al. (2010)** sur différentes espèces de *Thymus* collectée dans différentes régions du Portugal, les huiles essentielles de *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link, *Thymus caespititius* Brot., and *Thymus capitellatus* Hoffmanns. & Link des différentes régions possèdent une grande habilité à piéger le radical hydroxyle par rapport aux autres espèces collectées. Ces auteurs ont constaté que le Borneol, camphor, α -terpineol, 1,8-cineole, camphene, α -pinene and *p*-cymene étaient les composés majoritaires de ces plantes. Par contre les plantes dont les composés majoritaires étaient le thymol et la carvacrol ne possédait pas une forte activité et que ces composés phénoliques ne possèdent pas une habilité déterminante à piéger le radical hydroxyle.

Dans une autre étude faite par **Singh et al. (2010)** ont constaté que les huiles essentielles des feuilles d'*Ageratum scoparia* Waldst. & Kit. Ont exercé une forte activité de piégeage du radical hydroxyle. Comparé aux huiles essentielles, les composés majoritaires, β -myrcene et *p*-cymene, ont exercés une faible activité. Dans un autre contexte, les feuilles matures ont exercé une forte activité comparé aux jeunes feuilles.

L'activité des huiles essentielles à piéger le radicale hydroxyle est dose dépendante (**Jia et al., 2010**).

Conclusion

Cette étude se voulait une contribution à la connaissance de quelques activités antioxydantes des huiles essentielles de la plante *Ammoides verticillata* qui appartient à la famille des Apiacées.

L'obtention de l'huile essentielle par hydrodistillation reste une méthode simple et efficace, et donne un rendement intéressant. Le calcul de rendement moyen en huile essentielle de notre plante nous a révélé une valeur importante comprises entre 1 et 2,6% pour les feuilles et de 2 à 3,6% pour les fleurs.

L'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* a été également étudiée par cinq tests le premier du radical libre DPPH, l'ABTS, le TBARS le pouvoir réducteur et enfin l'activité chélatante. D'après les résultats du test effectué par le DPPH, nous avons constaté qu'à la plus grande concentration utilisée qui est de 1,405 mg/ml nous avons obtenu un pourcentage d'inhibition de 96,45% et la plus grande concentration 0,035mg/ml pour l'ABTS donne un pourcentage d'inhibition égale à 92,058% et encore la plus grande concentration de l'ordre de 0,3167mg/ml pour le TBARS donne un pourcentage d'inhibition égale à 93,65% la plus grande efficacité de ces huiles a été remarqué sur la réduction du Fer avec des absorbances remarquables.

L'étude de l'activité chélatante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* a révélé une non efficacité chélatante.

Et enfin on conclut que cette espèce végétale n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études, pour cette raison, il sera intéressant de se focaliser sur l'étude de la variabilité de la composition chimique en tenant compte de l'âge de la plante, de la période et du lieu de récolte, etc... Ceci va permettre d'observer les différents changements sur les plans qualitatifs et quantitatifs des huiles essentielles afin d'estimer à quelles conditions ou à quelle période ces huiles essentielles pourrait avoir une activité intéressante.

Reference bibliographique

AFNOR , 1992 : Recueil des normes françaises ; huiles essentielles.

Ahmadi, F.; Sadeghi, S.; Modarresi, M.; Abiri, R.; Mikaeli, A. (2010): Chemical composition, *in vitro* antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1137-1144.

Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., Chaouch A., (2010) : Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss.&Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*14 (1), 141-148.

Bakchiche B., Gherib A., Aazza S., Gago C., Miguel M. G. (2013): Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products* 46 : 85– 96.

Battandier et trabut (1902 : La flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie. 1^{ère} Flore.

Baudoux D. (2008) : L'aromathérapie, Se soigner par les huiles essentielles. Ed Broché, pp1.

Baytopet T., Sitlupinar n. 1986 : Characteristics of « Nanahan » cultivated in Anatolia an dits volatile oil. *J. Fac. Pharm. Istanbul*, 22 : 73 – 76.

Bemard, T., Perineau, F., Bravo, P., Delmas, M. Et Gaset, A. Oct, 1988, « *Informations chimie* », n° 298, , 179.

Benayad N. (2008) : Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Université Mohammed V – Agdal. Laboratoire des Substances Naturelles et Thermolyse Eclair. Département de Chimie. Faculté des Sciences de Rabat. P 61.

Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A. (2008): Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 209–228.

Bendahou M. (2007) : Composition chimiques et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de l'Ouest Algérien. *Thèse de Doctorat d'Etat, option Biochimie*, université Abou Bakr Belkaïd.

Bezanger- Beauquesne.et al. 1975 : Les plantes dans la thérapeutique moderne. Maloine S.A. éditeur.

Blayn J.F. (1980) : Parfums Cosmétique Arômes, N°117.

Boubrit S. et Boussad N. (2007) : Determination "in vitro " du pouvoir antibacterien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Ingéniorat d'état en biologie, option contrôle de la qualité et analyses .Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou.

Boudjemaa N. E. et Ben Guegua H. (2010) :L'effet antibactérien de *Nigella sativa*. Mémoire de fin d'études. Université kasdi merbah - ouargla. Département des Sciences de la Nature et de la Vie. Faculte des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers.

Boulos L. 1983 : Medicinal plantes of North Africa. *Reference Publication : Algonac*, MI, pp 109 – 175.

Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Faleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G. and Pedro L.G. (2007): Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry* 105:146–155.

Brian M.L. (1995): The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA), p.57-148

Bruneton J. 1993 : Pharmacognosie – phytochimie : Plantes médicinales. Tec. Et Doc. Lavoisier.

Burits M. et Bucar F. (2000) : Antioxidant activity of *Nigella sativa*, essential oil phytotherapy Research, 14, p.323-328.

Buronzo A-M. (2008) : Grand guide des huiles essentielles.Ed.Hachette pratique.254p.

Burt S. 2004 : Essentiellal oils : their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology* 94 223 – 253.

Caillet S., Larcroix M. (2007) : les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs application potentielles en alimentaire. Laboratoire de Recherche en Science Appliquées à l'Alimentation (RESALA), INRS-Institut Armand-Frappier.8p.

Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A. (2007) : Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 90 : 2580–2595.

Campion, P., I. Parra, J., (2006) : FILE://IE:/fiches2d/fiches2d.php.

Carré P. (1953) : précis de technologie et de chimie industrielle. Tome 3., Ed. Ballière J.B. et fils.France.Paris. *In* : **Bekhchi C. (2002)** : analyse d'huile essentielle d'*Ammoides verticillata*

(nunkha) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien.Thèse de magister, Université de Tlemcen.

Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V. (2002): Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46: 1914–1920.

Castro, L., Freeman, B.A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 170: 161-165

Chakou M. et Bassou K. (2007) : Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata* L. de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes: *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Mémoire de DES microbiologie. Université Kasdi Merbah Ouargla, P. 14-27.

Chiej R. 1982 : Les plantes médicinales. Ed. Solar.

Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Choi B.K., Ahn H.J., Lee M.Z., Park S.H. & Kim S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plant and flavonoids by assay- guided comparison. *Plant Sci*, 163: 1161- 1168.

Combrinck S., Du Plooy G.W., Mccrindle R.I., Botha B.M. (2007): Morphology and Histochemistry of the Glandular Trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). *Annals of botany*. 99 (6): 1111–1119.

Cox S.D., Mann C.M., Markam J.L. (2001): Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 492–497.

Dandlen, S.A.; Lima, A.S.; Mendes, M.D.; Miguel, M.G.; Faleiro, M.L; Sousa, M.J.; Pedro, L.G.; Barroso, J.G.; Figueiredo, A.C. (2010): Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. *Flavour Fragr. J.*, 25, 150-155.

Debuigue G., 1984 : Larousse des plantes qui guérissent. Librairie.

Domar R. ; Bourneuf J., (1990) : Nouveau Larousse médical.

Englebin M. (2011) : Essences et huiles essentielles : précaution d'emplois et conseils d'utilisation. Centre de formation en aromathérapie.

Faye O., Lo M., Gaye O. (1997): Connaissances et circuits thérapeutiques relatifs au paludisme en zone rurale Sénégalaise. *Médecine tropicale* ; 57: 161 -164.

Ferhat M., Kadi I. et Lahouaou A. (2009) : Recherche de substances bioactives de l'espèce *Centaurea microcarpa* Coss et Dur. Le Diplôme des Etudes Supérieures en Biologie (DES). Université Mohamed Boudiaf - M'sila. Faculté des sciences et des sciences de l'ingénieur. Département de biologie.

Garnéro J. (1991) : Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. techn. Encyclo. Me. Nat., (Paris-France), Phytothérapie-Aromathérapie.

Garnon P. (1991) : 3ième rencontres techniques et économiques : plantes aromatiques et médicinales Nyons 2-3-4 Décembre, pp. 216-231.

Gholivand, M:B.; Rahimi-Nasrabadi, M.; Batooli, H.; Ebrahimabadi, A.H. (2010): Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 24-28.

Grysole J. (2005) : Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique.140-162.

Guinochet M., vilmorin R. (1975) : Flore de France. Ed. C.N.R.S., Fascicule 2.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Arnoma, O.L. (1987). The deoxyribose method: A simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Anal Biochem*, 165: 215-219

Hazzit M.,Baalioumer A., Verissimo A. R., Faleiro M. L., Miguel M., G. (2009): Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. *Food chemistry*.116,741-721.

Huang D, Ou B and Prior R L (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856

JAYAPRAKASHA, G. K., R. P. SINGH, et al. (2001). "Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro." *Food Chemistry*, 73 (3): 285-290

Jia, H.L.; Ji, Q.L.; Xing, S.L.; Zhang, P.H.; Zhu, G.L., Wang, X.H. (2010): Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. And *Thymus proximus* Serg. *J. Food Sci.*, 75, E59-E65.

Joshi, S.C.; Verma, A.R.; Mathela, C.S. (2010): and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *J. Chem. Toxicol.*, 48, 37-40.

Kambouche N., El-Abed D. (2003) : composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). *J. of Essential Oil Research*, 15 :10-11.

Lawrence B. M. (1980) : The existance of intraspecific differences in specific genera in the Labiatae family. *Paper presented at VIIIe international congress of essential oils, Cannes*, pp118-123.

Le K, Chiu F and Ng K (2007). Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii. *Food Chemistry*, 105, 353-363

Leclercq R. (2002) : Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* 21(5), 375-383.

Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M, (1999): Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472: 142-152.

Luque de Castro, M.D., Jimenez-Carmona, M. M. Et Fernandez-Perez, V. (1999), *Trends in analytical chemistry*, vol. 18, n°11, , 708 et references citees,

M. Burits, & F. Bucar.,(2000): Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14 323–328

Masuda T, Yonemori S, Oyama Y, Takeda Y, Tanaka T, Andoh T, (1999) : Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: Activity of the leaf extracts from seashore plants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(4): 1749-1754.

Merad R. (1973) : Contribution à l'étude qualitative et quantitative de l'huile essentielle d'*Ammoides verticillata* (Nounkha) de la région de Tlemcen et de son pouvoir antimicrobien. Mémoire d'Ingénieur, Institut de Biologie, Université de Tlemcen.

Metha R.L. ; Zayas J.F. (1995) : Antioxidative effect of Ajowan in a model system. Department of foods and nutrition, Justin Hall, Manhattan.

Miguel M. G. (2010): Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*. 15, 9252-9287.

Narayana C., et al (1967) : Recovery of fatty oil from spent seeds of Ajowan (*trachyspermum ammi* Linn). Oil technological research Institute, Annapur.

Oyaizu M. (1986): Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44(6): 307-315.

Ozkan, G.; Baydar, H.; Erbas, S. (2010): The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). *J. Sci. Food Agr.*, 90, 205-209.

Ozturk M. (2012) : Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry* 134 :48–54.

P. Quezel and S. Santa (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II, CNRS (Ed.), Paris.

Pibiri M.C. (2006): Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse doctorat, Ecole polytechnique fédérale de lausanne. 161p.

Prior RL, Wu X, Schaich K, (2005): Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 4290-4302.

Quezel P., Santa (1961) : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. C.N.R.S. , Tome II.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS^{•+} radical cation decolorization assay. *Free Radical Biological Medicine*, 26 (9-10):1231-1237.

Robak J., Gryglewski R.J. (1988) : Flavonoïds are scavengers of superoxide anions. *Biochemical pharmacology*, vol 37. N°5, pp. 837-841.

Rolland Y. (2004) : Antioxydants naturels végétaux. *OCL*. 11(6) : P 419-424.

S. Aazza, B. Lyoussi and M. G. Miguel (2011). Antioxidant activity of some Moroccan hydrosols, *J. Med. Plants Res.* **5**, 6688-6696

Salle, I. L(1991)., «*Les huiles essentielles ; Synthèse d'aromathérapie et introduction it fa sympathicothérapie* », Edition Frison - Roche, Paris, ,21

Sarikurkcü C., Ozer M. S., Eskici M., Tepe B., Can S. and Mete E. (2010): Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food and Chemical Toxicology*, 48 : 1801–1805.

Siddhuraju, P., Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chem*, 101: 10-19

Sijelmassi A., (1991) : Les plantes médicinales du Maroc. 2^{ème} Ed. Le Fennec.

Singh, H.P.; Kaur, S.; Mittal, S.; Batish, D.R.; Kohli, R.K. (2010): *In vitro* screening of essential oil from young and mature leaves of *Artemisia scoparia* compared to its major constituents for free radical scavenging activity. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1040-1044.

Sokmen A., Gulluce M., Akpulat A. H., Deferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M., Sahin F., (2004): The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food control*, 15,627-634.

Tepe B., Sokmen M., Akpulat H. A., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. (2005) : Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*. 66 : 447–454.

- Topçu G, Ay M, Bilici A, Sarıkurkcu C, Ozturk M and Ulubelen A (2007).** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*, 103, 816-822.
- Truffault A., Mimoz A., Edouard P., Samii K., (2000) :** La colonisation par *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline est un facteur prédictif du phénotype de résistance d'une souche infectante à *S. aureus*. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* 19(3), 151-155.
- Valnet, I.(1984).**, «*Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes* », Ed. Maloine. S.A, n°10.
- Valnet, I.(1998)**, «*Aromathérapie* », Traitement des maladies par les essences de plantes. Ed. Vigot,
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C, (2007) :** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*.71. P 230–235.
- Viuda-Martos M., Navajas Y. R., Zapata E. S., Fernández-López J. and Pérez-Álvarez J. A. (2010) :** Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr. J.*, 25: 13–19.
- Wannes W. A., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M. E., Marzouk B. (2010) :** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology* 48 : 1362–1370.
- Wannes, W.A.; Mhamdi, B.; Sriti, J.; Jemia, M.B.; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Kchouk, M.E.; Marzouk, B. (2010):** Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica*) leaf, stem and flower. *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1362-1370.
- Wehmer C., (1931) :** Die Planzestoffe ; Zweiter Band.
- Wichtel M., Anton R., (1999) :** Plantes thérapeutiques : tradition pratique, officinale, science et thérapeutique. Ed. Tech. Et Doc.
- Willem J.P., (2002) :** Les huiles essentielles, Médecine d'Avenir. Editions du Dauphin, Paris.
- Zhao H, Dong J, Lu J, Chen J, Li Y, Shan L, (2006):** Effect of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19): 7277-7286.