



République Algérienne Démocratique Et
Populaire

MINISTRE DE
L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR



ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR

BATNA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme
MAGISTER
Spécialité : Chimie Organique

Présenté par :

Khebri Souad

THEME :

ETUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE TROIS *ARTEMISIA*

JURY :

Ammar DIBI	Prof.- Université de Batna	Président
Seloua DRIDI	M.C.- Université de Batna	Rapporteur
Ratiba MEKKIOU	Prof.- Université de Constantine	Examineur
Ahmed KASSAH-LAOUAR	Prof.- Université de Batna	Examineur

Année Universitaire : 2010 -2011



Je remercie avant tout ALLAH- le tout puissant- de m'avoir guidé durant toute ma formation.

A la mémoire de mon oncle que dieu repose son âme en paix.

A mes parents que dieu les protège

En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissante. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.



Docteur DRIDI Seloua, je vous remercie pour votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire de recherche, merci pour votre disponibilité tout au long de mon mémoire et pour tout ce que vous m'avez appris en chimie. Merci de m'avoir consacré du temps pour corriger ce mémoire. Vous m'avez guidé pendant ces années et éclairé sur les voies les plus intéressantes à prendre. Ce travail n'aurait pas été le même sans votre encadrement.

Je tiens à remercier le Professeur KASSAH LAOUAR Ahmed, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire au niveau du CHU-Batna pour effectuer une bonne partie de ce travail. Je le remercie vivement pour sa collaboration et sa présence parmi les jurys.

Je remercie Monsieur le Professeur DIBI Ammar, qui a bien voulu examiner ce manuscrit et pour sa présence parmi les jurys.

Je remercie Madame MEKKIOU Ratiba Professeur à l'Université de Constantine, d'avoir accepté notre invitation pour participer au jury de ce Mémoire.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Bactériologie, pour leur convivialité pour leurs disponibilités.

Je tiens à remercier Docteur CHELGHAM Ikbal ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de Parasitologie et mycologie, pour leur convivialité, et disponibilité.

Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude au Docteur HARKAT Hassina, DJARRI Lakhdar, et BOUDIAF Habiba, et les remercier pour m'avoir aider énormément.

On remerciant toute personne qui m'a offert de l'aide et du soutien je ne peux m'en passer de mes responsables au niveau du laboratoire LNHC Mr Rachid Abed Ennebi et Mr Khaled Ababsa, ainsi que tous mes collègues sans exception.

Mes remerciements iront également à toute personne qui grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, m'ont soutenu en rendant agréable les moments passés ensemble : Souad, Samira, Samia, Sabah, Nadjiba et Ihcèn.



Merci à mes proches notamment mes parents, ma grand-mère, mes sœurs Mouna, Asma, et Hayat, mes deux frères Mohamed et Nour el mouslimine ainsi que mes chers petits cousins Sara, Belgacem, Ikram, Yahia et Dhirar. Sans vous, rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien moral et votre amour...



GLOSSAIRE

Antiproliférative : elle améliore la régénération du derme et induit la différenciation cellulaire, et elle inhibe la croissance des cellules clonales et tumorales.

Antihelminthique : Médicament utilisé pour détruire les vers parasites de l'intestin chez l'homme, dont les plus fréquents sont les Ascaris, les Oxyures, les Ténias. Pour chacune de ces parasitoses, il existe un traitement spécifique.

Antispasmodique : cesse les spasmes, contractions involontaires des muscles et des organes, D'origine nerveuse.

Carminatif : qui provoque l'expulsion des gaz intestinaux.

Cholagogue : facilite l'évacuation des voies biliaires, action bénéfique pour le foie et le tube digestif.

Diterpène : composé formé de vingt atomes de carbone.

Diurétique : qui augmente le volume urinaire et l'élimination des chlorures, du sodium, du Potassium, de l'urée et de l'acide urique dans les urines.

Emménagogue : qui provoque, facilite ou augmente les règles.

Ethnopharmacologiques : l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale

Fébrifuge : prévient les accès de fièvre et permet de combattre celle-ci.

Sédatif : qui calme une activité exagérée (cardiosédatif, neurosédatif).

Sesquiterpène : constituant à quinze atomes de carbones.

Sous-arbrisseau : plante ligneuse ne dépassant pas 1 mètre.

Stomachique : facilite le travail de l'estomac et le fortifie.

Vermifuge : expulse les vers de l'intestin.

Vasodilatatrice : augmente le calibre des vaisseaux sanguin.



LISTE DES ABREVIATIONS

AMP : L'ampicilline

AMOX : Amoxicillin

ACDCLAV : Acide clavulanique

ATCC : American Type Culture Collection

AHA : *Artemisia herba alba*

ABS : *Artemisia absinthium*

AC : *Artemisia campestris*

BHT : hydroxytoluène butylé

BHA : L'hydroxyanisole butylé

BLSE : Béta lactamase a spectre élargi

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : concentration Minimale Bactéricide

CLSI: Clinical Laboratory and Standards Institute

CTX : Céfotaxime

CHN : Céfalosporine haut niveau

CPG : la Chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM : Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse

CCM : Chromatographie sur couche mince

COSY: Correlation spectroscopy

CPG/O: Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à l'olfactométrie.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : concentration Minimale Bactéricide



CLSI : Clinical Laboratory and Standards Institute

CTX : Céfotaxime

CHLO : Le chloramphénicol

CIFALO : Céphalosporines

DL50 : Dose Létale 50

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

DIF: Détecteur à Ionisation de Flamme

HE : Huile essentielle

HPLC : La chromatographie en phase liquide à haute performance

HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation

HSMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

IMIP : [Imipenème](#)

IK : indice de Kovats

IR: Infra Rouge

RMN (H 1, C13): LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DE PROTON ET CARBON 13

SM-IE: mode Impact Electronique

TR : Temps de rétention

TV : *Thymus vulgaris*

VAN : Vancomycine



LISTE DES FIGURES

Figure.1: Quelques structures de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles.

Figure.2 : Schéma du dispositif de l'entraînement à la vapeur d'eau

Figure.3 : Schéma du dispositif de l'hydrodistillation.

Figure .4 : Chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme

Figure.5 : Sesquiterpènes isolés de la tribu Anthemideae.

Figure.6 : L'artémisinine.

Figure.7 : L'espèce *A. herba alba*

Figure.8 : L'espèce *A. absinthium*

Figure.9 : L'espèce *A. campestris*.

Figure. 10 : Paroi des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.

Figure.11 : Hydrolyse d'une pénicilline par une β -Lactamase

Figure.12 : Structure chimique des bétalactamines

Figure.13 ; Mécanisme de résistance aux antifongiques

Figure.14 : Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de pétri.

Figure.15 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie

Figure.16 : Schéma de la réaction de peroxydation lipidique.

Figure.17 : Forme libre et réduite du DPPH

Figure.18 : Dispositif d'hydro-distillation.

Figure .19 : Rendement d'extraction des huiles essentielles en %.

Figure .20 : Profil chromatographique de l'HE d'*Artemisia herba alba* analysée par GC/SM.

Figure.21 : Composés identifiés dans l'HE d'*Artemisia herba alba*.

Figure .22 : Les principaux composants de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*.

Figure.23 : Voie de transformation de pinène en caryophyllène



Figure.24 : Voie de la transformation du cation terpényl-8

Figure .25 : Profil chromatographique de l'HE d'*Artemisia campestris* analysée par GC/SM

Figure.26 : Composés identifiés dans l'HE d'*Artemisia campestris*.

Figure.27 : Les produits majoritaires de l'huile essentielle d'*A.campestris*.

Figure.28 : Profil chromatographique de l'HE d'*Artemisia absinthium* analysée par GC/SM

Figure.29 : Les produits majoritaires de l'huile essentielle d'*A.absinthium*.

Figure.30 : Composés identifiés dans l'HE d'*Artemisia absinthium*.

Figure.31 : Photos montrant l'effet de l'HE d'*A. herba alba* sur : *Heamophilus*, *Enterobacter.sp*, *Serratia.sp* (D = halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose

Figure. 32 : Photos montrant les CMI de l'HE d'*A. herba alba* des bactéries : *E.coli*, *Serratia.sp* (CMI= 1,78mg /ml).

Figure.33 : Diminution des diamètres des colonies de *Microsporium canis* en fonction des concentrations des huiles dans le milieu.

Figure.34 : Photos montrant l'effet des l'HE d'*A. herba alba* , et d'*A. absinthium* sur : *Candida. albicans* et *Candida. kefye* (D = halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose)

Figure.35 : Photos montrant l'effet des HE d'*A. herba alba*, d'*Artemisia. Absinthium*, et d'*Artemisia campestris* sur : *Microsporium.cannis*(méthode de diffusion en milieu solide)

Figure.36 : Test de blanchissement du bêta-carotène.

Figure.37 : Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490nm en présence des huiles essentielles, les antioxydants standard et le contrôle négatif (chaque valeur présente la moyenne de trois essais).

Figure.38 : Activité antioxydante relative des huiles essentielles et du BHT et le contrôle négatif

Figure.39 : Décoloration du DPPH



Figure.40 : Activité antioxydante des huiles essentielles.

Figure.41 : Réactions proposées par Brand-Williams et al, de l'eugénol avec le DPPH`

Figure.42 : Comparaison de l'activité anti-oxydante évaluée par les deux techniques : DPPH, et le test de blanchissement de β -carotène.



LISTE DES TABLEAUX

Tableau.1. Principales caractéristiques physiques de quelques terpènes.

Tableau .2. Quelques huiles essentielles utilisées comme remède dentaire

Tableau.3. Les constituants majoritaires de quelques espèces d'*Artemisia*..

Tableau .4. Quelques structures des sesquiterpènes isolés de l'espèce *Art.herba-alba*.

Tableau.5. Quelques structures des flavonoïdes isolés du genre *Artemisia*

Tableau.6. Les caractéristiques des bactéries testées

Tableau.7. Rendement d'extraction des huiles essentielles en %

Tableau.8. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

Tableau.9. les principaux composants des huiles essentielles d'*A. herba alba* de différentes sites

Tableau.10.Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*

Tableau.11. la composition des huiles de différentes régions.

Tableau.12. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium*

Tableau.13. Les principaux constituants de l'huile essentielle d'absinthe de différentes régions.

Tableau.14. La composition chimique de trois huiles essentielles d'*Artemisia*.

Tableau.15. Résultats des antibiogrammes.

Tableau.16. Résultats des aromatogrammes (Diamètres d'inhibition en mm).

Tableau.17. Les CMI en mg/ml.

Tableau.18. Variation des diamètres d'inhibition des levures en fonction d'huiles essentielles.

Tableau.19. Variation des diamètres des colonies en fonction de la concentration en huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

Tableau.20. Variation des diamètres des colonies en fonction de la concentration en huile essentielle d'*Artemisia Absinthium*

Tableau.21. Variation des diamètres des colonies en fonction de la concentration en huile essentielle d'*Artemisia campestris*



SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I-1 CHAPITRE 1: GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES	
I-1.1 Généralités sur les huiles essentielles.....	2
I-1.1.1 Définition.....	2
I-1.1.2 Propriétés physiques.....	2
I-1.1.3 Composition chimique.....	3
I-1.1.4 Répartition et localisation	5
I-1.1.5 Fonction des huiles essentielles.....	5
I-1.2 Procédés d'extraction des huiles essentielles	6
I-1.2.1 Entraînement à la vapeur d'eau.....	6
I-1.2.2 Hydrodistillation.....	7
I-1.2.3 L'enfleurage.....	7
I-1.2.4 Hydrodistillation par micro-ondes sous vide.....	7
I-1.2.5 Extraction par gaz supercritique.....	8
I-1.3 Méthodes d'identification chimiques.....	8
I-1.3.1 La chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse CPG/SM.....	9
I-1.3.2 La chromatographie gazeuse couplée à l'olfactométrie CPG/O.....	10
I-1.4 Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	10
I-1.4.1 Parfumerie et cosmétologie.....	10
I-1.4.2 Industrie alimentaire.....	10
I-1.4.3 Désinfection des locaux.....	11
I-1.4.4 Médecine dentaire	11
I-1.4.5 Aromathérapie.....	12
I-1.4.6 Toxicité des huiles essentielles.....	12
I-2 CHAPITRE 2: APERÇU BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE GENRE ARTEMISIA	
I-2.1 Le genre <i>Artemisia</i>.....	14
I-2.1.1 Aspect chimique.....	14
I-2.1.1.1 Les terpènes	14
I-2.1.1.2 Les flavonoïdes.....	18



I-2.1.1.2	Les coumarines.....	20
I-2.1.1.3	Les alcanes.....	20
I-2.2	Intérêt biologique et pharmacologique.....	20
I-2.3	Etude des trois plantes aromatiques sélectionnées.....	23
I-2.3.1	L'espèce <i>Artemisia herba alba</i>	24
I-2.3.1.1	Les huiles essentielles d' <i>Artemisia herba alba</i>	26
I-2.3.2	L'espèce <i>Artemisia absinthium</i>	27
I-2.3.2.1	Les huiles essentielles d' <i>Artemisia absinthium</i>	29
I-2.3.3	L'espèce <i>Artemisia campestris</i>	31
I-2.3.3.1	Les huiles essentielles d' <i>Artemisia campestris</i>	33
I-3	CHAPITRE 3 : ACTIVITES BIOLOGIQUES ET TECHNIQUES D'EVALUATION	
I-3.1	Activités biologiques	36
I-3.1.1	Activité antimicrobienne.....	36
I-3.1.2	Mode d'action des huiles essentielles.....	38
I-3.1.3	Rappels sur les bactéries.....	39
I-3.1.4	Les bêtalactamases à spectre élargie.....	40
I-3.1.5	Généralités sur quelques souches bactériennes.....	41
I-3.1.6	L'antibiothérapie.....	42
I-3.1.7	Les bêtalactamines.....	42
I-3.1.8	Généralités sur quelques souches fongiques.....	43
I-3.2	Techniques d'évaluation des activités biologiques.....	46
I-3.2.1	Techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne.....	46
I-3.2.1.1	L'aromatogramme.....	46
I-3.2.1.2	Technique de diffusion en milieu solide.....	47
I-3.2.1.3	Technique de dilution en milieu solide	47
I-3.2.1.4	Technique de dilution en milieu liquide.....	48
I-3.2.2	Les concentrations critiques.....	48
I-3.2.2.1	La concentration minimale inhibitrice CMI.....	48
I-3.2.2.2	La concentration minimale bactéricide.....	48
I-3.1.2	Activité antioxydante.....	50
I-3.1.2.1	Stress oxydant.....	50
I-3.1.2.2	Radicaux libres.....	51
I-3.1.2.3	Les antioxydants.....	53
I-3.1.2	Techniques d'évaluation de l'activité antioxydante.....	54
I-3.1.2.1	Test du DPPH.....	54
I-3.1.2.2	Test de blanchissement du bêta-carotène.....	55



II DEUXIEME PARTIE: ETUDE EXPERIMENTALE

II-1	CHAPITRE 1: MATERIELS ET METHODES	
II-1.1	Matériels végétal.....	56
II-1.1.1	Extraction des huiles essentielles.....	56
II-1.1.1.2	Analyses chromatographiques par GC et GC/MS.....	57
II-1.2	Les essais biologiques.....	58
II-1.2.1	Activité antibactérienne.....	58
II-1.2.1.1	Souches bactériennes utilisées.....	58
II-1.2.1.2	Milieux de culture.....	59
II-1.2.1.3	Méthode de diffusion en milieu solide.....	60
II-1.2.2	Activité antifongique.....	61
II-1.2.2.1	Souches fongiques utilisées.....	61
II-1.2.2.2	Milieux de culture.....	61
II-1.2.2.3	Méthodes de diffusion en milieu solide.....	61
II-1.2.2.4	Méthodes de dilution en milieu solide.....	62
II-1.2.3	Activité antioxydante.....	63
II-1.2.3.1	Test de blanchissement du bêta-carotène.....	63
II-1.2.3.2	Test du DPPH.....	64

III TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION

III-1	Rendement d'extraction.....	65
III-2.1	Composition chimique de l'huile d' <i>Artemisia herba alba</i>	66
III-2.2	Composition chimique de l'huile d' <i>Artemisia campestris</i>	74
III-2.3	Composition chimique de l'huile d' <i>Artemisia absinthium</i>	79
III-2	Activités biologiques.....	87
III-2.1	Activité antibactérienne.....	87
III-2.2	Activité antifongique.....	94
III-3	Activité antioxydante.....	100
III-3.1	Test de blanchissement du bêta-carotène.....	100
III-3.2	Test au DPPH.....	103

CONCLUSION ET PERSPECTIVES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES



Première Partie :

Etude Bibliographique



Chapitre : 1

Généralités sur les huiles essentielles



INTRODUCTION

Les médicaments traditionnelles et l'utilisation des plantes en médecine empirique ont souvent été à l'origine de recherches scientifiques de haut niveau. Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs huiles essentielles dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique.

L'utilisation des huiles essentielles devrait être basée sur les connaissances fiables et suffisantes apportées par la recherche scientifique bien menée. Il est donc indispensable de connaître les principes actifs des plantes afin d'en étudier l'efficacité, le mode d'action et les effets secondaires.

Ce travail est consacré essentiellement à l'étude chimique et biologique des huiles essentielles de trois *Artemisia* (*Artemisia herba alba*, *Artemisia absinthium* et *Artemisia campestris*) ; plantes à usage fréquent par la population de la région des Aurès.

Les huiles essentielles des plantes sélectionnées pour cette étude ont été sujettes à plusieurs travaux antérieurs. Ces différents travaux ont montré une grande variabilité de leur profil chimique qui dépend de plusieurs facteurs tel que: la période de récolte, la partie de la plante ainsi que du site de récolte. Ce fait a suscité l'intérêt pour l'étude des espèces poussant dans notre région; celle des Aurès. Dans ce contexte, nous nous sommes fixés comme objectif principal la détermination des profils chimiques des huiles essentielles des *Artemisia*, ainsi que l'évaluation des activités biologiques de ces essences, afin d'établir une relation profil chimique - activité biologique.

Notre travail sera donc réparti en trois parties :

- la première partie passe en revue les généralités sur les huiles essentielles, un aperçu bibliographique sur les huiles essentielles du genre *Artemisia*, les activités biologiques et les techniques d'évaluation.
- la deuxième partie concerne la description du matériel et des méthodes utilisées.
- la troisième partie est consacrée à l'interprétation et la discussion des résultats.



I-1.1.GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES

I-1.1.1.Définition

Les huiles essentielles sont définies comme étant des produits de composition chimique assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Ces huiles sont à la fois des parfums et des remèdes naturels. Elles doivent être utilisées à très faibles doses, car leurs principes actifs sont hyper concentrés [1,2].

Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales : celui par distillation dans la vapeur d'eau, et celui par expression.

I-1.1.2.Propriétés physiques

Les huiles essentielles, sont des substances volatiles, liquides à température ambiante, de nature hydrophobe, rarement colorées, et fortement odorantes. Elles ont un indice de réfraction élevé [1], peu miscibles à l'eau, et solubles dans les solvants organiques (Tableau 1).

Tableau.1. Principales caractéristiques physiques de quelques terpènes.

Terpène	Poids moléculaire	Odeur	Solubilité dans l'eau	Solubilité dans les solvants
limonène	136.23	Citronnée agréable	Très peu soluble	Miscible à l'alcool
menthol	156.26	Agréable fraîche	Légèrement soluble	Miscible à : Alcool, chloroforme, éther
thujone	152.23	Forte aigue	Quasi insoluble	Miscible aux solvants organiques



I-1.1.3. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges de composition chimique très variable et complexe, en effet, elles peuvent renfermer jusqu'à plusieurs centaines de molécules différentes, chacune ayant des propriétés particuliers. Ces molécules appartiennent généralement à deux grandes familles chimiques.

- ✓ Les terpènes : sont construits à partir de plusieurs entités isopréniques, constituant une famille très diversifiée tant au niveau structural que fonctionnel. On rencontre dans les huiles essentielles principalement des mono et des sesquiterpènes (possèdent respectivement 10 et 15 atomes de carbone) plus rarement des di-terpènes (20 atomes de carbone) ainsi que leurs dérivés oxygénés.
- ✓ Les composés aromatiques dérivés du Phényl-propane tel que l'eugénol (huile essentielle de girofle), l'anéthol et l'aldéhyde anisique (huile essentielle de Badiane et d'anis), le carvacrol (huile essentielle d'origan), l'acide et l'aldéhyde cinnamiques. Ceux-ci constituent les principaux membres de cette famille.

Les huiles essentielles peuvent contenir des composés aliphatiques plus ou moins fonctionnalisés.

A noter que pour une même espèce botanique, en fonction de différentes conditions (sol, ensoleillement, saison, partie de plante) peut fournir des huiles essentielles de compositions différentes, ces variations génèrent la notion de chémotype [3], donc il est indispensable d'établir des contrôles systématiques des huiles essentielles avec des techniques modernes avant l'emploi de ces produits.

La figure-1- présente quelques structures les plus rencontrées dans les huiles essentielles.

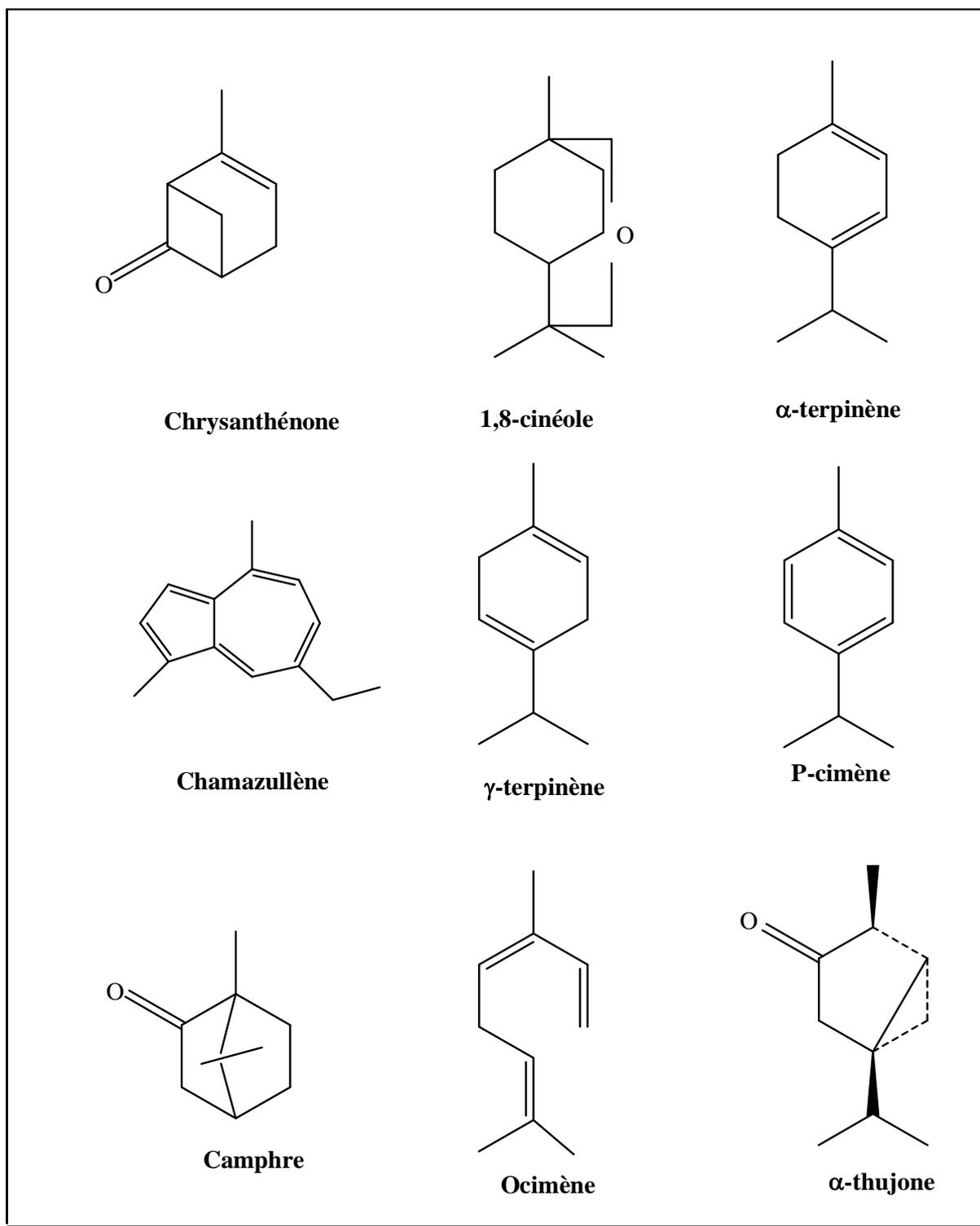


Figure.1: quelques structures de quelques composés rencontrés dans les huiles essentielles.

➤ **Chémotype**

C'est une classification chimique, biologique et botanique qui désigne la molécule majoritairement présente dans une huile essentielle [1].



Cette classification des huiles essentielles selon le produit majoritaire ou chémotype dépend d'un certain nombre de facteurs, entre autres :

- Le mode de culture de la plante
- Le stade de développement botanique : pendant ou après la floraison [3-5]
- L'organe distillé.
- Le mode d'extraction utilisé tel que la distillation ou l'hydro-distillation.
- L'origine géographique de la plante.

I-1.1.4. Répartition et localisation des huiles essentielles

Dans une plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : Racine (Vétiver), feuille (citronnelle, Eucalyptus..), dans des écorces (Cannelle), des rhizomes (Gingembre), des fleurs (Rose, lavande), des graines (Muscade, Anis) [1].

Les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante sont récoltées à la période de rendement optimum : avant la floraison (*Menthes*), pendant (*Romarin, lavande*) et après celle-ci (plantes à graines et fruits) [1, 3].

Les huiles essentielles sont stables à température ambiante si elles sont conservées de manière adéquate : à l'abri de l'oxydation et de la polymérisation provoquée par l'air, par la lumière et par les variations de la température. Les rendements d'extraction des huiles essentielles dépendent des techniques et procédés d'extraction et de la période de récolte [5-8].

La synthèse et l'accumulation d'une huile essentielle dans les végétaux sont généralement liées à l'existence de structures histologiques spécialisées, localisées dans certains points des tissus, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface de la plante [1]. Ces structures peuvent être :

- Des cellules sécrétrices isolées (*Lauraceae, Zingibeaceae*) pouvant être épidermiques ou internes.
- Des poils sécréteurs externes (*Labiaceae, Graniaceas*) ou internes (*Eucalyptus*)
- Des canaux sécréteurs (*Ombellifères, Conifères*).

I-1.1.5. Fonctions des huiles essentielles

Le rôle des huiles essentielles dans la plante est mal connu jusqu'à présent. Il est toute fois admis qu'ils ont un rôle écologique ; pour certaines d'entre elles, le rôle a été établi expérimentalement aussi bien que dans le domaine d'interaction végétale comme agent allélopathique et notamment comme des inhibiteurs de germinations, que dans le domaine

d'interaction végétal-animal : comme protecteurs contre les prédateurs (insectes ou champignons).

I-1.2.PROCEDES D'EXTRACTION

Ils existent plusieurs procédés d'extraction des huiles essentielles.

I-1.2.1.Entrainement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter [1]. Durant le passage de la vapeur d'eau à travers la plante, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action des vapeurs pour former un mélange eau et huile essentielle en deux phase, une phase organique et une phase aqueuse.

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

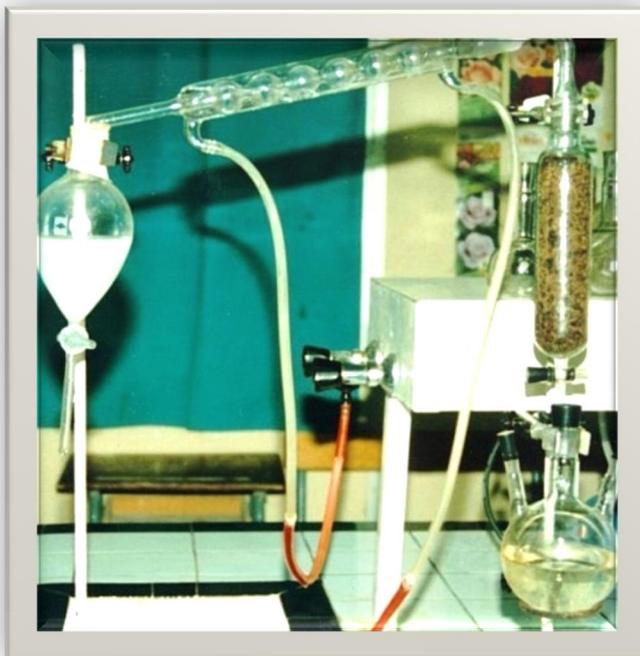


Figure.2 .Schéma du dispositif de l'entraînement à la vapeur d'eau

I-1.2.2. Hydro-distillation

Le principe de cette technique consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement des cellules et la libération des molécules odorantes, ensuite le mélange est refroidi. Une fois condensées, eau et huile essentielle sont séparés du fait de leurs différences de densité [1].

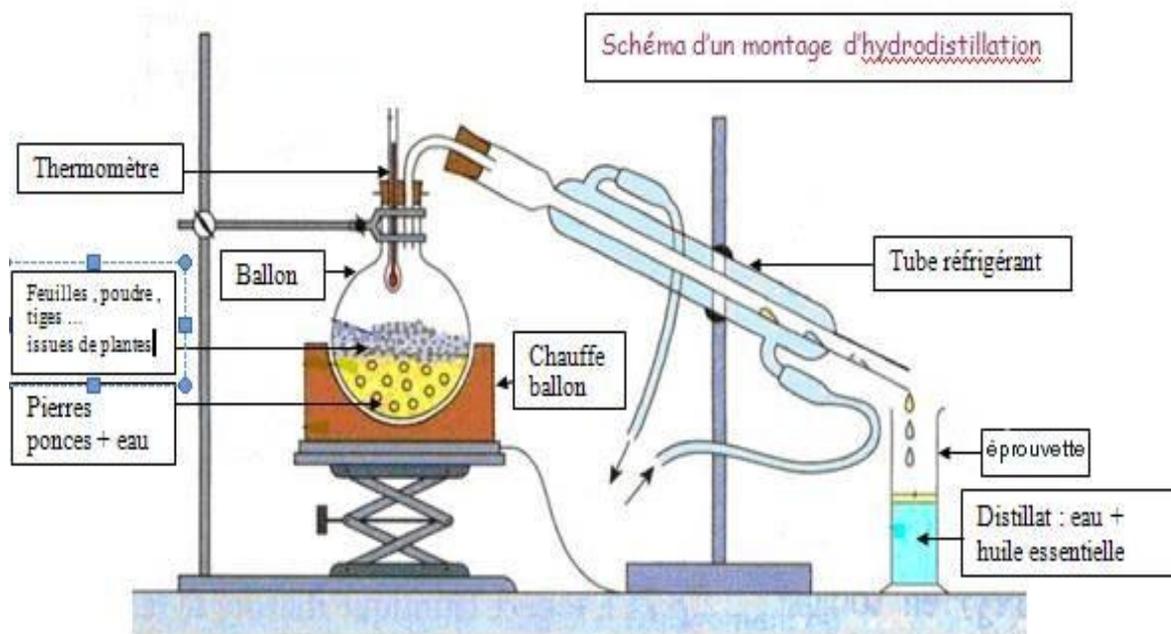


Figure.3. Schéma du dispositif de l'hydrodistillation.

I-1.2.3. L'enflourage

Procédé réservé aux huiles essentielles délicates qui ne supportent pas la chaleur. Les pétales fraîchement cueillis, sont étalés sur de la graisse sur des châssis en verre et remplacés toutes les 24 heures. Les huiles essentielles saturer progressivement la graisse. Le composé obtenu appelé pommade, est lavé avec de l'alcool qui, après évaporation produit l'huile parfumée [1].

I-1.2.4. Hydro-distillation par micro-ondes sous vide

Dans ce procédé, la plante est chauffée sélectivement par rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle, l'huile essentielle est entraînée dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante



traitée. Cette technique est très rapide avec consommation d'énergie minimale, le produit livré par ce procédé est de qualité supérieure à celle de l'hydro distillation traditionnelle [1].

Des travaux réalisés sur l'influence du procédé d'extraction sur la composition chimique des huiles essentielles montrent que l'extraction par les micro-ondes à une grande efficacité du point de vue rendement, temps d'extraction, et pourcentage du produit actif (chénotype) [6,7].

I-1.2.5.Extraction par gaz supercritique

Cette technique d'extraction permet d'extraire les principes actifs de la plante sans chauffage, le principe de ce procédé repose sur l'état supercritique du gaz carbonique, qui dans certaines conditions de pression et de température, se comporte comme un fluide qui a une densité d'un liquide et une viscosité d'un gaz. Il diffuse à travers les cellules de la plante, et extrait les principes actifs [7,8]

Les avantages de cette extraction sont :

- -L'obtention des extraits aromatiques 100% naturels, sans trace de solvants.
- -Dans ce procédé le risque de dégradation des produits fragiles est éliminé, à cause de la température adéquate (32 C°).

Les avantages de CO2 supercritique sont:

- Facilité de manipulation,
- Non toxique, ininflammable et sans odeur,
- Bon marché et disponible avec une grande pureté.

L'extraction par le fluide supercritique est une méthode très rapide. Elle permet, par simple changement des conditions de pression et de température, d'optimiser l'extraction et l'obtention d'extraits de grande qualité.

I-1.3.METHODES D'IDENTIFICATION CHIMIQUES

Les méthodes d'analyse ont pour but l'identification quantitative et qualitative des différents constituants du mélange complexe des huiles essentielles.

Parmi ces techniques les plus utilisées sont : La chromatographie en phase gazeuse **CPG** et la chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse **CPG/SM**. Diverses techniques chromatographiques, telles que la CCM, la CLHP, la CPG, ainsi que l'RMN du C-13 sont souvent utilisées. On s'intéresse dans ce travail à la technique la plus fréquemment utilisée, celle du CPG/MS.

I-1.3.1. La chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse CPG/SM

La conception d'un appareil CPG correspond schématiquement à l'association de différents modules spécialisés : l'injecteur, la colonne, et le détecteur, intégrés dans un même bâti. La phase mobile nécessaire pour entrainer l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé gaz vecteur ou gaz porteur [9].

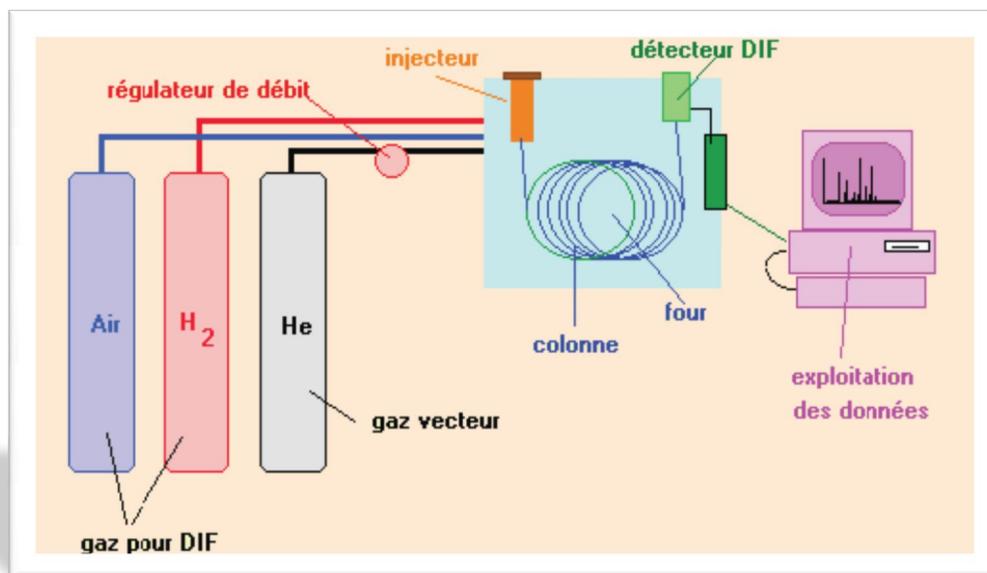


Figure .4. Chromatographe en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme

Actuellement cette technique est la plus fréquemment utilisée, elle repose sur le principe de la séparation des composés volatils d'un mélange complexe. Cette méthode consiste à injecter l'huile essentielle diluée dans un solvant (non retenu par la phase stationnaire) dans une colonne, cette dernière est liée à un spectromètre de masse lui-même lié à un détecteur. Chaque constituant possède un indice de rétention, ce dernier est un paramètre caractéristique de chaque constituant de l'huile essentielle.

Le couplage CPG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Il permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation [10].

Dans certains cas où se trouvent des molécules non connues dans la littérature (nouvelles molécules), on fait appel à d'autres techniques spectroscopiques telle que : RMN unidimensionnelle (^1H , ^{13}C) bidimensionnelle (COSY, HSQC, HMBC...) IR après purification de la molécule cible par les divers méthodes chromatographiques [10,11].



I-1.3.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (CPG/O)

Les huiles essentielles obtenues renferment très souvent des centaines de composés volatils. Le couplage CPG/O combine la séparation des composés volatils par CPG avec l'évaluation olfactive. En sortie de colonne, une partie des composés élués est envoyée vers un cône de détection nasale qui permet l'évaluation olfactive en même temps que l'enregistrement du chromatogramme.

Tous les types de détecteurs peuvent être utilisés en parallèle au port d'olfaction, mais ce sont les détecteurs DIF ou de masse qui sont les plus fréquemment utilisés.

Afin d'éviter l'inconfort dû aux effluents chauds et la déshydratation de la muqueuse nasale qui conduit à une perte de sensibilité, de l'air humide est ajouté en sortie de cône. L'opérateur enregistre ses données olfactives grâce à divers dispositifs de saisie (Bouton presseur, curseur, enregistrement vocal) reliés à un ordinateur [12]. La CPG/O trouve de nombreuses applications tant en recherche et développement qu'en contrôle qualité. En effet, un certain nombre de composés à odeurs négatives (off flavour) ne sont pas détectés par les instruments classiques. Dans ce cas, la CPG/O est un moyen très efficace pour les mettre en évidence grâce au faible seuil de perception du nez humain. Deux types de données peuvent être obtenus lors d'une analyse CPG/O. Tout d'abord la sensation perçue par l'évaluateur qui est décrite à l'aide d'un descripteur et l'intensité de la perception [12].

I-1.4. DOMAINE D'UTILISATION DES HUILES ESSENTIELLES

La diversité de la composition chimique des huiles essentielles explique leur usage très vaste, en effet elles trouvent des emplois dans de nombreux secteurs :

I-1.4.1. Parfumerie et cosmétologie

Un nombre important d'huiles essentielles est utilisé dans l'industrie cosmétique (parfums, crèmes) grâce à leur pouvoir antiseptique et antioxydant, tout en leur assurant leur odeur agréable [13]. Certains composés chimiques isolés à partir d'une huile essentielle constituent des matières premières pour la synthèse d'autres substances odorantes, à titre d'exemple : à partir de l'eugénol extrait de l'huile essentielle de girofle on aboutira à l'iso eugénol qui a une odeur d'œillet [13], et l'utilisation du safrôle pour la synthèse de l'héliotropine utilisée en parfumerie [1].

I-1.4.2. Industrie alimentaire

Dans les huiles essentielles la présence de molécules puissantes de propriétés anti oxydantes et antiseptiques, favorise leur utilisation comme agents de conservation dans les produits alimentaires, elles servent à la protection de ces produits



contre la dégradation radicalaire, et sont également employées comme agents antimicrobiens.

Les travaux de *Montes Balmont* montrent que les huiles essentielles du thym, de la cannelle, et d'origan ont un effet inhibiteur sur la croissance de plusieurs bactéries et champignons responsables d'infections alimentaires [13].

I-1.4.3. Désinfection des locaux

Grace à leur pouvoir antiseptique, les huiles essentielles entrent dans la fabrication des « para germes » ; solution volatile à base d'une huile essentielle naturelle (citron, lilas), pour la désinfection des atmosphères. On peut envisager l'utilisation des huiles essentielles comme agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène d'air, notamment dans les hôpitaux [14].

Un mélange des huiles essentielles diffusé en aérosol, ou par une simple évaporation, peut assurer la destruction des germes contenus dans l'air, tout en dégageant une odeur agréable.

I-1.4.4. Médecine dentaire

En médecine dentaire, par leur diversité moléculaire et leur propriété antiseptique, les huiles essentielles ont trouvé une grande application et ont donné des résultats cliniques très satisfaisants notamment les huiles essentielles de : *chanaemelum nobil* (*camomille vomcune*), et d'*Eugenia caryophyllus* (clou de girofle) [15].

Le tableau suivant indique l'utilisation et l'indication thérapeutique de quelques huiles essentielles dans le domaine dentaire.



Tableau .2. Quelques huiles essentielles utilisées comme remède dentaire [15]

Huile essentielle	Produits Majoritaires	Indication thérapeutique	Contre Indication
<i>Tea tree</i>	Terpin-1-en-4-ol, Cinéole, γ-terpinène	Abcès dentaire Aphoses Traitement local	Néant
<i>La lavande</i>	Linalol, Acétate de linalyle	Traitement des aphtes	Néant
<i>Menthe</i>	(-)-menthol, (-)-menthone	Erosions buccales Douleurs gingivales	Contre indiqué chez la femme enceinte et l'enfant De moins de 6ans
<i>Le girofle</i>	L'eugénéol β-caryophyllène	Antisepsie et analgésie dentaire	L'eugénol peut donner des eczémas de contact

I-1.4.5.Aromathérapie

L'aromathérapie est une branche particulière de la phytothérapie. Ce terme est composé de deux parties : aroma signifiant parfum, et thérapie méthode visant à soigner les maladies [2,16]. En médecine traditionnelle, on utilise les huiles essentielles pour aider à la désinfection, à la cicatrisation ou au traitement des traumatismes, et également en complément d'un traitement médical chronique.

I-1.4.6.Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles, possèdent en générale une toxicité aigue par voie orale faible. La majorité des huiles qui sont couramment utilisées ont une DL50 comprise entre 2 et 5 g/Kg (anis, eucalyptus, girofle), et le plus fréquemment, supérieure à 5 g /Kg (camomille, citronnelle, lavande) [1].

Comme il est bien connu que les huiles essentielles entrent dans les préparations de la parfumerie, et sachant que certaines molécules peuvent provoquer des réactions d'allergie, il est indispensable d'établir un diagnostic d'allergie aux parfums. Ce risque a été attribué à certains terpènes contenus dans les huiles



essentielles faisant partie de la composition chimique des parfums, mais pour une utilisation thérapeutique et à des concentrations dépassant celles que l'on peut rencontrer dans les parfums. A titre d'exemple le camphre, menthol, la thujone et l'eucalyptol qui peuvent provoquer des manifestations neurologiques (convulsion) [17-20] ainsi que des réactions d'allergies chez certains patients.

Toutefois un certain potentiel irritatif est attribué à beaucoup d'aldéhydes, de cétones (la méthylionone), de lactones (coumarines). Certains alcools sont à éviter : l'alcool cinnamique, l'alcool anisique. Les acétates de bornyle, de linalyle, et de menthyle sont suspects. Les essences de lavande, de cannelle, l'huile essentielle de santal sont irritantes [20].



Chapitre :2

Aperçu bibliographique sur le genre Artemisia



I-2.1.LE GENRE ARTEMISIA

Artemisia est l'un des plus importants genres de la famille des *Astéracées*, il comporte plusieurs centaines d'espèces (de 200 à 400 espèces selon les auteurs). Il est composé d'un grand nombre d'herbacées de petite taille dont quelques 280 espèces se rencontrent dans l'hémisphère nord. Elles sont très répandues dans les zones arides, y compris notamment l'ouest des Etats-Unis et les steppes asiatiques. On en trouve également en Afrique du sud et en Amérique du sud [21].

I-2.1.1.Aspect chimique

Plusieurs métabolites secondaires caractérisent la composition chimique du genre *Artemisia*. Un aperçu sur les données de la littérature a indiqué que presque toutes les classes de composés sont présentes dans le genre, avec une prédominance particulière des terpénoïdes et des flavonoïdes. Ce pendant, les constituants des cires, les poly-acétylènes, et dans une moindre mesure, des molécules contenant de l'azote ont également été trouvés dans plusieurs espèces [22].

I-2.1.1.1.Les terpènes

C'est la classe des métabolites la plus étudiée, les terpénoïdes présents dans certaines espèces d'*Artemisia* sont représentatifs de toutes les classes de ces composés, des mono-terpènes aux tri-terpènes.

➤ Monoterpènes

La plupart des espèces sont caractérisées par l'odeur typique des terpénoïdes de faible poids moléculaire tels que les mono-terpènes et les sesquiterpènes. Ces molécules volatiles sont présentes dans les huiles essentielles, et confèrent aux plantes une forte odeur aromatique. Parmi ces composés, le camphre, la thujone, le bornéol et le 1,8-cinéole sont les plus représentatifs.

Comme pour de nombreuses plantes aromatiques, la teneur en huile d'*Artemisia* est affectée par des facteurs environnementaux, par exemple le contenu des monoterpénoïdes dans certaines espèces *A. tridentata ssp* varie selon la saison, avec la plus forte teneur atteinte en Juillet (4,18%) et la plus basse en Mai (0,97%) [23]



La variabilité dans les monoterpénoides dans ce genre, va des dérivés artemisyls (alcools, cétones acétates.....) jusqu'aux dérivés à squelette santolinyl et lavandulyl. En outre, la présence de nombreux mono-terpènes irréguliers semble être une caractéristique particulière de la tribu des Anthemideae.

Le tableau suivant rassemble les constituants majoritaires de quelque Artemisia et donne une idée sur la variabilité et la diversité structurale des terpénoides présents dans ce genre [24].

Tableau.3. Les constituants majoritaires de quelques espèces d'*Artemisia*.

Espèce	Constituants majoritaires	Localité
<i>A.capilaris</i>	α -thujone (0-40%), bornéol (0-15%), ϵ -cadinène (0-46%)	Japon
<i>A.rehan</i>	Davanone (44%), trans-éthyl cinnamate (3%), acétate de bornyl (2%)	Ethiopie
<i>A.petrosa</i>	1,8-cénéole, β -pinène, bornéol	Grèce
<i>A.annua</i>	Camphre (7-44%), artemisia cétone (6-26%), germacrène-D (14-24%), β -caryophyllène (5-15%)	Finlande
<i>A.arbuscula</i>	Artemiséol (29%), santolinatate de méthyl (15%), 1,8-cinéole (15%), camphre (7%)	USA

La variabilité est présente dans l'espèce même. En effet, les huiles essentielles extraites des fleurs d'*A.annua* d'origine chinoise et allemande sont particulièrement riches en mono-terpènes cétoniques (63%)[25], tandis que dans les chémotypes mongoles, les phénols tels que le thymol et le carvacrol sont les principaux composants[26].

Ces mono-terpènes sont responsables en grande partie des activités biologiques des huiles essentielles de ces plantes.

L'importance économique des constituants des huiles essentielles de certaines espèces d'*Artemisia* a suscité diverses recherches biotechnologiques visant à la production in vitro des composés les plus utiles.

➤ Les sesquiterpènes

Le groupe le plus important de sesquiterpènes rencontré dans la tribu des Anthemideae est représenté par les lactones sesquiterpéniques. Leur présence dans le genre *Artemisia* a été largement rapportée [27]. Bien que les germacranolides et les guaianolides sont les composés dominants de la tribu, les santanolides ont été rapportés en particulier dans le genre *Artemisia* (par exemple *A. cina*)[27].

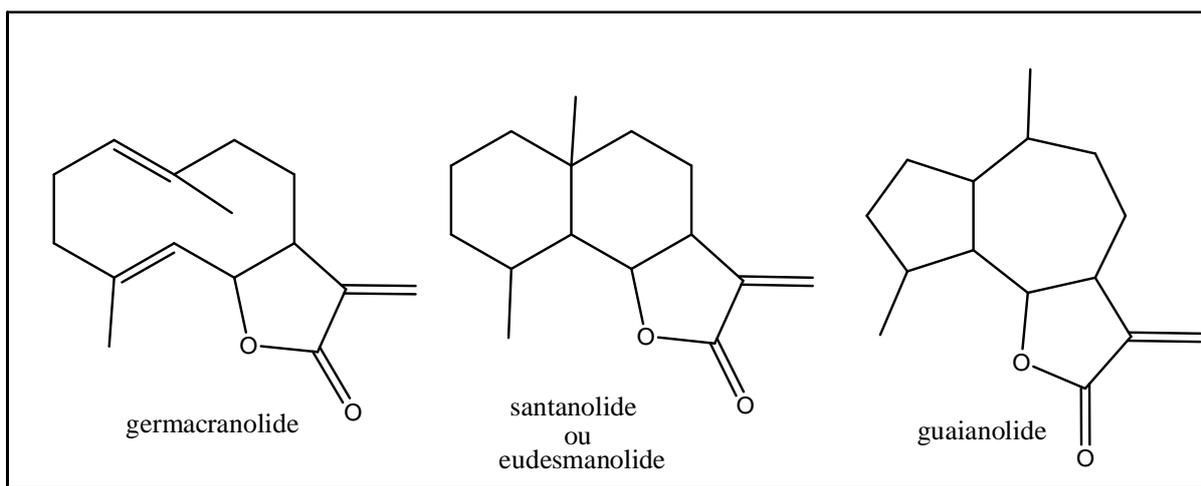


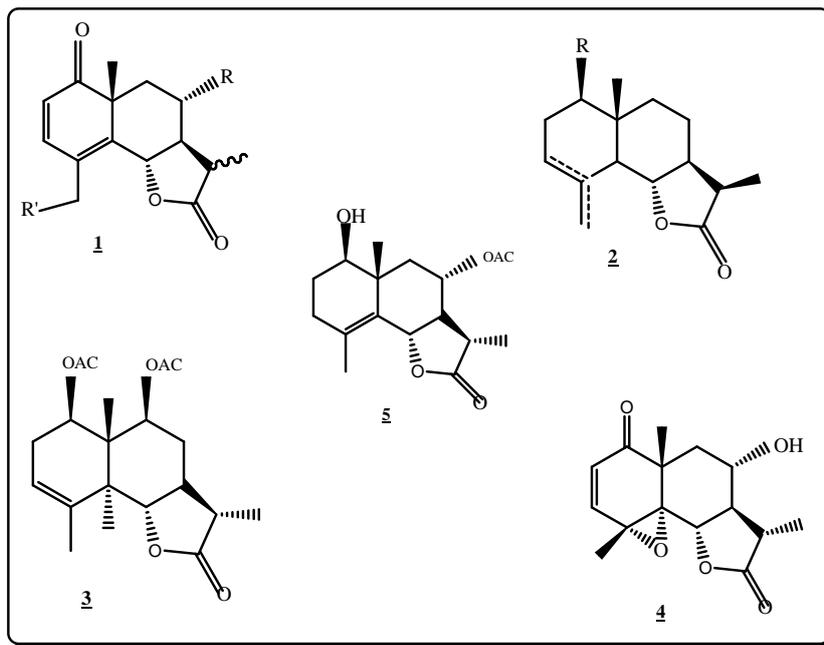
Figure.5. : sesquiterpènes isolés de la tribu Anthemideae.

Ce sont des substances d'une diversité structurale importante. Leur présence dans le genre est considérée comme étant un indice chimio taxonomique.

Nous allons nous limiter à citer quelques exemples de sesquiterpènes isolés à partir d'*Artemisia herba-alba* et qui sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau .4. Quelques structures des sesquiterpènes isolés de l'espèce *Art.herba-alba* [28].

N° de Structure		Nom du composé
<u>1</u>	<u>1a</u>	1-Oxoeudesma-2,4-dièn-11 α H-12,6 α -olide
	<u>1b</u>	1-Oxoeudesma-2,4-dièn-11 β H-12,6 α -olide
	<u>1c</u>	1-Oxo-8 α -hydroxy-eudesma-2,4-dièn-11 α H-12,6 α -olide
<u>2</u>	<u>2a</u>	Delta ³ 5 α H, 11 α , 13-Dihydrosantamarin
	<u>2b</u>	Delta ^{4,5} ,5 α H, 11 α , 13-Dihydro- β -cyclocostunolide
<u>3</u>		1 β ,9 β -Diacetoxyeudesm-3-en-6 β ,11 β H-12,6-olide
<u>4</u>		1-Oxo-8 α -hydroxy-4 α ,5 α -epoxyeudesm-2-en-11 β H-12,6 α -olide
<u>5</u>		Torrentin



	<u>R</u>	<u>R'</u>
<u>1a</u>	H	H
<u>1b</u>	H	H
<u>1c</u>	OH	H

	<u>R</u>
<u>2a</u>	OH
<u>2b</u>	H

Les guaianolides dimériques, comme l'absinthine et l'anabsinthine, sont responsables du goût amer des extraits d'*A. absinthium*. Ces composés sont des proazulènes. Les Azulènes jouissent d'une grande importance pharmaceutique en raison de leurs propriétés antiseptiques et antibactériennes [29].

L'artémisinine (**Figure.6.**) une lactone sesquiterpénique qui est un santanolide typique d'*A. annua*, isolée en 1972 pour la première fois, est actuellement l'une des molécules antipaludiques les plus efficaces.

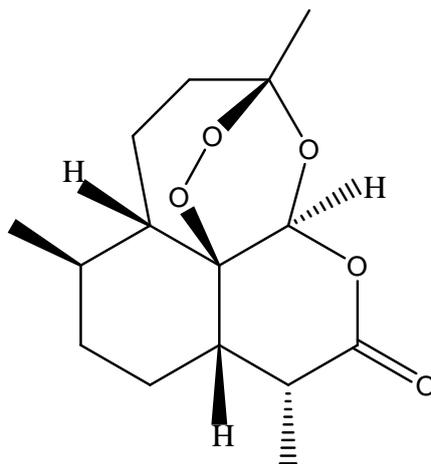


Figure.6. L'artémisinine.

I-2.1.1.2. Les flavonoïdes

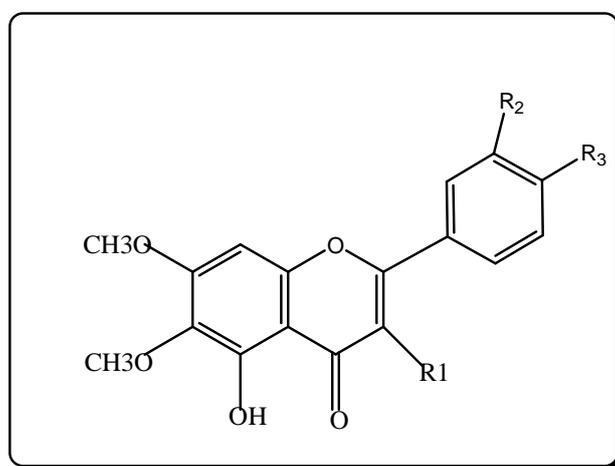
Les flavonoïdes sont répandus dans les Anthemideae et leur évaluation s'est révélée être un outil précieux pour les études chimio-taxonomiques. Dans cette tribu, la lutéoline, l'apigénine et la quercétine sont les composés les plus communs.

Plus de 160 composés flavonoïdiques différents ont été isolés dans le genre *Artemisia* et environ un tiers d'entre eux sont des dérivés des ; flavones lutéoline et apigénine [30].

Les flavonoïdes dans ce genre peuvent exister à la fois en tant que O-glycosides et sous forme de flavones et de flavonols méthylés.

Tableau.5. Quelques structures des flavonoïdes isolés du genre *Artemisia* [28].

N° de structure		Nom du composé
<u>6</u>	<u>6a</u>	Casticine
	<u>6b</u>	Chrysoplenetine
	<u>6c</u>	Cirsinéole



6

	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>
<u>6a</u>	OCH ₃	OH	OCH ₃
<u>6b</u>	OCH ₃	OCH ₃	OH
<u>6c</u>	H	OCH ₃	OH



I-2.1.1.2.Coumarines

Les hydroxy coumarines sont des composés typiques du genre *Artemisia* représentant un caractère chimio taxonomique précieux.

Les coumarines structurellement plus complexes, tels que la scopolétine 7-diméthylallyléther et les éthers de méthylène de la daphnétine et de la fraxétine ont été isolées à partir d'*A. dracunculoides* [31]. Alors que les racines d'*A. afra* contiennent l'isofraxidine, les fleurs ont fourni la scopolétine.

La scoparone(6-7 diméthoxycoumarine), une coumarine isolée de l'espèce chinoise *A. sccoparia*, bien connue par son pouvoir hypo-lipémiant, montre une importante activité vasodilatatrice, antiproliférative et anti radicalaire [32].

I-2.1.1.3.Alcanes

Le profil des alcanes des cires des feuilles de certaines espèces d'*Artemisia* a révélé la présence d'alcanes de nombre de carbone pair et impair ainsi que des molécules ramifiées [33].

La plus haute teneur en alcanes totaux a été trouvé pour *A. siversiana* et *A. absinthium*, tandis que les plus faibles teneurs étaient présentes dans *A.abrotanum* et *A. pontica*. La longueur de la chaîne carbonée de l'alcane va de C23 à C33. Les plus abondants sont les alcanes en C29 et C31, avec *A. pontica* contenant le pourcentage le plus élevé en C29 et *A.vulgaris* en C31.

A. alba est caractérisée par la présence d'alcanes ramifiés C12 et C 28 avec des pourcentages élevés.

La présence des alcanes en C29 et C31 dans les Angiospermes a été documenté par un grand nombre de rapports et la présence d'iso-alcanes a été démontrée dans plusieurs cires végétales [34].

I-2.2.INTERET BIOLOGIQUE ET PHARMACOLOGIQUE

Les applications biologiques et thérapeutiques des *Artemisia* sont le résultat de leur importance dans les traditions médicinales populaires et également le fruit de plusieurs études chimiques et pharmacologiques. Dans les travaux de **Wagner**, *Artemisia capillus* est désignée comme étant une source de poly-acétylène et de la capéline qui possèdent d'importantes activités antimicrobienne contre les mycoses cutanées. La présence de la santonine ; une sesquiterpène lactone avec une importante activité



anthelminthique dans *A.cina* , est rapportée par **Wagner** en 1977. L'extrait hydrosoluble d'*A.cina* manifeste une forte propriété larvicide contre *Culex pipiens* L [35].

Des essais sur les propriétés insecticides phagorépulsives des extraits d'*A.absinthium*, ont été menées dans le cadre de la lutte biologique contre *Crociodolomia binotali* (pyrale du chou), un grand ravageur des cultures agricoles [36]. Ces extraits ont manifesté une bonne activité.

Les constituants volatils des parties vertes d '*A.princeps orientalis*, présentent des activités phytotoxiques et antimicrobiennes remarquables, ils inhibent également l'élongation radicalaire des plantes. Son inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis*, *Aspergillus nidulans*, *fusarium solani*, *pleurotus ostreatus* a été mise en évidence par **yun et al.**, [37].

Les huiles essentielles de plusieurs espèces *Artemisia*, exercent une multitude d'activités biologiques. Des études entreprises au centre agricole Scotlandais mettant l'accent sur la nature antimicrobienne des huiles volatiles ont révélé que l'huile d'*A.afra* (absinthe africaine), constituée d'un mélange de mono-terpènes, est active contre plusieurs souches bactériennes entre autre: *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella pneumoniae* , *Brevibacterium linens* et *Yersinia enterocolitica* [38].

En 1993 **Tantaoui et al**, [39] rapportent que l'huile essentielle d'*A.alba* inhibe la reproduction asexuée du *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, et *Zygorhynchus*.

Dans certains cas, une relation directe a été trouvée entre la présence d'un constituant particulier dans l'huile et l'activité biologique de celle-ci. Tel est le cas de l'eugénol, le cisocimène et l' α -phéllandrène ; constituants de l'huile essentielle d'*A.dracunculus* qui inhibe d'une manière significative la croissance de la plupart des microorganismes cités ci-dessus y compris le *Staphylococcus aureus* et *Proteus vulgaris* [40].

Bien que les substances amères soient largement présentes dans la famille des Asteraceae, seulement *A.absinthium* (armoise) et *Cnicus benedictus* sont importantes en pharmacie et dans l'industrie alimentaire. Le gout amer de la première espèce est dû à l'absinthine et a l'anabsinthine.



Leur effet digestif est dû à la stimulation par reflexe nerveux, des secretions gastriques entraînant une augmentation de l'acidité gastrique [35].

La scoparone (6,7-diméthoxycoumarine) une coumarine isolée de l'espèce chinoise; *A. scoparia*, bien connue par son pouvoir hypolipémiant, montre une importante activité vasodilatatrice, antiproliférative et anti-radicalaire.

Les extraits de la même espèce se sont révélés contenir des composants bloqueurs des canaux calciques Ca^{2+} , doués donc d'effets hypotenseurs et confirmant ainsi la propriété spasmolytique attribuée à la plante dans la médecine traditionnelle chinoise[41].

D'autres effets spasmolytiques, consistant en une forte relaxation des muscles lisses ont été attribués à quatre flavonols isolés à partir d'*A. Abrotanum* [42].

Des effets hypoglycémiant, semblables à ceux d'*A.scoparia*, avec une réduction consistante du niveau du glucose sanguin et présentant un minimum d'effets secondaires indésirables ont été démontrés après administration orales des extraits aqueux d'*Artemisia herba alba* [43].

Un polysaccharide sulfate, purifié a partir de la fraction brute des feuilles d'*A.princeps* a prouvé son efficacité dans l'accélération (6000 fois) de la formation du complexe thrombine- HC-1 dans le plasma humain et représente donc une nouvelle molécule pharmacologique hémostatique, avec un mode d'action tout à fait distinct de celui de l'héparine [44].

Des agents cyto-protectifs tels que la déhydroleucodine d'*A.douglasiana* se sont révélés être de bon protecteurs contre la formation des lésions gastriques [45].



I-2.3.ETUDE DES TROIS PLANTES AROMATIQUES SELECTIONNEES

Afin d'isoler des nouvelles substance à partir des plantes aromatiques et de trouver de ce fait de nouvelles voies d'applications de ces essences tant dans les domaines de la pharmacie que de la cosmétique et afin de rendre la stratégie d'isolement le plus efficace, il convient de sélectionner avec soin les plantes à étudier. Dans cette optique, deux critères ont été pris en compte pour sélectionner les plantes de cette étude.

- L'origine géographique
- L'utilisation fréquente des trois plantes en médecine traditionnelle dans notre région.

✓ *Artemisia herba alba*

✓ *Artemisia absinthium*

✓ *Artemisia campestris*



I-2.3.1. ARTEMISIA HERBA ALBA

➤ **Classification botanique**

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	ARTEMISIA
Nom binominal	Armoise blanche

➤ **Description botanique**

Cette espèce est très répandue dans les zones arides, et semi-arides sur les hauts plateaux, c'est une plante herbacée à tiges ligneuses et ramifiées, de 30 à 50 cm, très feuillées. Les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et à aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites (3/1,5mm) et ovoïdes [21,46].



Figure.7. L'espèce *A. herba alba*

➤ **Usages traditionnels**

L'espèce *A. alba* appelée localement « chih » ou armoise blanche est largement utilisée en médecine traditionnelle. Elle a été utilisée, tout d'abord, comme aromatisant dans le thé et le café, puis elle est devenue une panacée dans la médecine traditionnelle arabo-musulmane. Traditionnellement utilisée pour traiter les désordres gastriques ainsi que pour son activité antihelminthique, elle présente aussi un caractère vermifuge très prisé pour le bétail. Des études ethnopharmacologiques ont montré l'intérêt de l'armoise blanche contre le diabète grâce à son activité hypoglycémiante, ainsi que contre l'hypertension, et également la présence d'activité emménagogue. Les extraits aqueux d'armoise blanche montrent des activités antileishmaniose, antigénotoxiques, antidiabétiques, antibactériennes et antispasmodiques. L'huile essentielle présente quelques activités : antimicrobiennes, antifongiques, spasmolytiques et hypoglycémiques [47,48, 49].



I-2.3.1.1. Les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba*

Diverses études relatives à la composition chimique des huiles essentielles de l'espèce *Artemisia herba alba*, ont été décrites [50-54]. Ces travaux mettent en évidence une grande variabilité chimique. A titre d'exemple une étude concernant la composition chimique pour les échantillons des huiles essentielles originaire de l'Espagne (plusieurs sites de récolte) [50] : a révélé l'existence de plusieurs chemotypes :

- Une huile essentielle riche en p-cymène (19.9 %), elle renferme aussi l' α pinène (17.2%), myrcène (10.9%), 1,8-cinéole (8.6%) et le camphre (8.5%).
- Un deuxième chémotype caractérisé par la prédominance du cis-chrysanthénol (28.8%), elle renferme également le 1,8-cinéole, p-cymène, et le camphre.
- Un autre échantillon est dominé par le 1,8-cinéole (18.8%), camphre (10.2%), et p-cymène (6.7%).
- Une huile essentielle renfermant la davanone (29.1%), le p-cymène (9.2-18.4%), le γ -terpinène, et le myrcène.

Le 1,8-cinéole (50%) est le produit majoritaire de l'échantillon provenant du désert Palestinien. Cet échantillon renferme aussi les thujones α et β (27%) et d'autres monoterpènes oxygénés; terpinène-4-ol (3.3%), le camphre (3%), et le bornéol (3%) [51].

Une étude montre la richesse de l'huile essentielle d'*A. herba alba* originaire de la Jordanie en α , β -thujone (16.2 %) et (8.5%) respectivement, cette essence renferme aussi l'alcool santolina (13%), et la cétone d'artemisia (12.4%). Elle renferme également des traces du 1,8-cinéole, du camphre, et l'acétate du chrysanthényl [52].

Une autre étude a montré que le cis β -terpinéol est le composant majoritaire (11.3%) de l'échantillon provenant d'Iran. Le camphre, sabinène, et camphène, étant présents avec des teneurs appréciables (16.11, 5.18, 4.8%) [53].

L'huile essentielle d'*A. herba alba* Tunisienne est riche en α -thujone (43-85%), trans-acétate de sabinyle (17-46%), et la β -thujone (10.10%), elle renferme également: le 1,8-cinéole (3.3%) et la chrysanthénone (2.32%) en faible quantité. Ce profil chimique est différent par rapport au profil chimique d'échantillons Algériens (provenant de différentes régions : Boussaâda, Batna, Djelfa et Khenchela) qui renferment une forte quantité de camphre (19.4%) [54,55].



I-2.3.2.L'ESPECE *ARTEMISIA ABSINTHIUM*

➤ **Classification botanique**

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>ARTEMISIA</i>
Nom binominal	Absinthe

➤ **Description botanique**

L'espèce *A.absinthium* communément appelée absinthe appartient au genre *Artemisia* et à la famille des Composés ou Astéracée. C'est une plante vivace ou bisannuelle. Elle est d'une hauteur de 40 à 70 cm, elle peut atteindre 1m en certain endroit. Elle est très aromatique, sa saveur est fortement amère, les tiges sont rameuses, herbacées, cylindriques, et de couleur blanchâtre. Les feuilles sont ponctuées et plus ou moins pubescentes, elles sont de couleur grise verdâtre à la face supérieure et blanchâtre à la face inférieure. Les fleurs sont homogènes, tubuleuses, jaunes ou blanches et possèdent une corolle glabre ou velue. Les fruits sont des akènes très petits, non glanduleux [21, 46, 56].



Figure.8. L'espèce *A. absinthium*



➤ Usages traditionnels

La plante appelée communément « chiba » est employée en Algérie, en usage interne, comme remède digestif, la tige feuillée est utilisée au Maroc en usage interne sous forme d'infusion, comme remède antispasmodique et comme remède cholagogue. Cette plante possède d'autres propriétés thérapeutiques, parmi ces dernières on peut citer : Des propriétés antitussives, antigrippales, anti-diarrhéiques, antihelminthique, et emménagogue [57-59]. Les racines de cette plante sont utilisées en décoction pour traiter l'ulcère gastrique [46, 56].

Des études menées au Pakistan ont conclu, que l'absinthe possède une activité hépato protectrice élevée grâce à son action inhibitrice sur les enzymes responsables des métabolites dans le foie [57]. Ces propriétés thérapeutiques s'expliquent par la présence des composés terpéniques (sesquiterpènes lactone et mono-terpènes).

I-2.3.2.1. Les huiles essentielles d'*Artemisia absinthium*

La plante fraîche contient de 0.2 à 0.6 % d'HE. La teneur et la composition chimique de cette huile comme pour toutes les plantes aromatiques, diffèrent selon l'origine de la plante et la saison de récolte (maximum au moment de la floraison), et selon le mode d'obtention [56].

De nombreuses publications ont décrit la composition chimique et l'activité biologique de l'huile essentielle d'absinthe [58-61]. Ces travaux mettent en évidence la grande variabilité chimique de l'huile essentielle en fonctions des paramètres cités ci précédemment.

Les analyses systématiques d'échantillons de provenances variées ont montré l'existence de nombreux chémotypes à cis-époxy-ocimène, β -thujone dans l'échantillon Italien, et l'acétate de sabinyle ou acétate de chrysanthényle dans l'échantillon Français [59, 62].

Chiasson et al., ont montré l'influence de la technique d'extraction de l'huile essentielle sur la composition chimique d'*A. absinthium*, l'auteur a remarqué que le pourcentage de sabinène dans l'huile d'absinthe extraite par le procédé de microonde a diminué presque de moitié. L' α thujone a diminué de 2.9% dans l'huile obtenue par hydro-distillation à 1.4% dans l'huile obtenue par le procédé de microonde. Ce qui influe sur l'activité acaricide de cette huile [61]. L'huile d'absinthe originaire de la Grèce, est caractérisée par l'absence de la thujone dans son profil chimique, elle est dominée par l'oxyde de caryophyllène (25.3%), le P-cymène (16.8%), et le 1,8 cinéole (8.9%), (z)-lancéol acétate (7.3%). Les sesquiterpènes oxygénés constituent la fraction majoritaire



(40.6%) de cette huile essentielle. L'absence de la thujone (le composant toxique) dans le profil chimique de cette huile, favorise son usage en industrie alimentaire.

Juteau *et al.*, ont marqué l'existence de :

(Z)-époxyocimène, β -thujone, et acétate chrysanthényl dans les échantillons originaires de la Croatie, et de la France respectivement [63].

L'huile essentielle d'*A.absinthuim* originaire du Brésil est dominée par le trans-sabinyl acétate (26.4%), le myrcène (10.8%), et la trans thujone (10.1%). Dans son profil chimique, la fraction majoritaire est celle des monoterpènes oxygénés qui sont responsables de l'activité antimicrobienne contre: *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton rubrum* et *Microsporium .canis*. Cette huile a également manifesté un pouvoir antioxydant [60].



I-2.3.3. ARTEMISIA CAMPESTRIS

➤ **Classification botanique**

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Genre	<i>Artemisia</i>
Nom binominal	T'gouft

➤ **Description botanique**

Artemisia campestris. L, est une plante pérenne appartenant à la famille des Composées ou Astéracées. Cette espèce se développe dans les montagnes du Sahara central, sur les hauts plateaux. Elle est présente du Maroc à la Lybie (zone littorale de tripolitaine) [21,46]. C'est une plante sous-frutescente à tiges ascendantes de 30 à 150 cm, les rameaux constituent une panicule. Les feuilles sont glabres vertes foncées, ses rameaux sont rougeâtres à capitules coniques ou ovales. Cette espèce est caractérisée par son odeur agréable [21].

➤ **Usages traditionnels**

L'espèce *A. campestris*, appelée localement « T'goufet » est très utilisée en médecine traditionnelle pour ses diverses propriétés thérapeutiques. En Tunisie l'espèce est utilisée sous plusieurs formes (infusion, décoction, poudre) pour traiter les maladies gastriques, l'hyperglycémie, la fièvre, et aussi contre les vers intestinaux. En Algérie la plante est utilisée en décoction comme remède anti-diarrhéique, antispasmodique, et contre l'ulcère gastrique [46,63-64,65].



Figure.9. L'espèce *A.campestris*.



I-2.3.3.1.les huiles essentielles d'*Artemisia campestris*

Diverses études sur la composition chimique des huiles essentielles de cette espèce et ses différentes variétés, ont été décrites [65-69]. Mais les études sur les activités biologiques des huiles essentielles de cette plante sont restreintes.

Le travail rapporté par **Akrout *et al.***, sur la composition chimique de l'huile essentielle de cette espèce, ainsi que les activités biologiques (antibactérienne, antifongique, et antioxydante), a montré que l'activité antifongique est la plus importante [65].

Mucciarelli *et al.*, ont analysé plusieurs échantillons des huiles essentielles de diverses espèces d'*Artemisia*, parmi ces échantillons deux huiles d'*Artemisia campestris* provenant de deux sites de récolte différents originaire d'Italie. L'extraction des huiles essentielles à partir des parties aériennes de la plante a été réalisée par la technique d'hydro-distillation, les produits majoritaires identifiés, pour le premier échantillon, sont : l'oxyde de caryophyllène (18.2%), α -pinène (15.31%), et le spathuléol (9.3%), le β -pinène est présent avec un pourcentage de (9.8%) [62]. Le deuxième échantillon, renferme le 1.8-cinéole (19.2%), l' α -pinène (16.5%), le

Spathuléol (18.1%), et l'épi-cubénole (14.1%). Cette variation chimique est due à la nature du sol et le climat qui diffère d'un site à l'autre [62].

Khalilov *et al.*, ont déterminé la composition chimique de l'HE d'*A.campestris* originaire de la Russie, celle-ci est dominée par l' α -pinène (41%), le β -pinène (29.7%), le limonène (6.4%), et le sabinène (4.5%) [66].

La composition chimique de l'huile essentielle originaire de la France, a été étudiée en fonction de la saison de récolte. Quatre échantillons ont été analysés : Le premier échantillon a été récolté au cours du mois de Mai, son huile essentielle est dominée par la présence du γ -terpinène (46.5%), et le 1-Phényl-2,4-pentadiyne (26.9%). Par contre le deuxième échantillon, récolté au mois d'Aout, est caractérisé par la présence du capillène (27.2%), γ -terpinène (26.5%), le 1-Phényl-2,4-pentadiyne (19.1%). Tandis que le troisième échantillon récolté au cours du mois de Septembre (stade de la floraison) est dominé par le 1-Phényl-2,4-pentadiyne (29.7%), le γ -terpinène (20.8%), et le capillène (22.3%). Et enfin le quatrième échantillon récolté au mois de Novembre, est caractérisé par la présence du : 1-Phényl-2,4-pentadiyne (16.2%), le capillène (33.1%), et l'oxyde de caryophyllène (11.3%) [67].

Akrout *et al.*, ont déterminé la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*, originaire de la Tunisie (différentes régions de récolte).



L'échantillon provenant de Bengardane est constitué essentiellement de : β -pinène (24.2%), P-cymène (17.4%), le camphre (10.3%), spathuléol (10%), et α -pinène (6.2%).

Le deuxième échantillon provenant de Benikhadache est dominé par la présence de : β -pinène (27.9%), P-cymène (22.3%), et le γ -terpinène (5%).

Le profil chimique de l'huile essentielle de l'échantillon provenant de Djerba est caractérisé par : le β -pinène (25.2%), le P-cymène (20.7%), l' α -pinène (11%), l'arcurcumène (6.9%), et le spathuléol (7.1%). Le dernier échantillon originaire de Tataouine est prédominé par le β -pinène (24.3%), P-cymène (20.1%), spathuléol (8.5%), et α -pinène (8.7%) [68].

L'huile essentielle originaire de la Serbie est caractérisé par la présence de sesquiterpène alcools, spathuléol (9.2%), le 4-hydroxy-9-epi- β -caryophyllène (3%), β -pinène (9.1%), α -pinène (3.4%), limonène (2.5%), et germacrène (3.3%) [69].

Récemment, une étude *in vitro* a montré l'effet anti tumorale significative contre les cellules suspect de l'HE d'*Artemisia campestris* [70].



Chapitre : 3

Activités biologique et techniques d'évaluation



I-3.ACTIVITES BIOLOGIQUES ET TECHNIQUES D'EVALUATION

Les huiles essentielles sont dotées de plusieurs activités biologiques. Nous nous limitons dans notre travail à l'étude des activités antimicrobiennes et antioxydantes.

I-3.1.Activités biologiques

I-3.1.1.Activité antimicrobienne

Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants présentent un potentiel important en tant qu'agents antibactériens [71-73].

La nature des composés majoritaires joue un rôle principal dans leur efficacité [71]

L'activité des huiles essentielles est liée à leurs compositions chimiques, à la configuration des éléments constitutifs et les groupes fonctionnels portés par les constituants ainsi qu'à leurs interactions synergiques possibles [72].

A l'issue de plusieurs études portant sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de quelques plantes culinaires (clou de girofle, origan, thym...), ainsi que celles des constituants majoritaires, sur 25 souches bactériennes pathogènes et non pathogènes Gram + et Gram -, *Dorman et Deans* [71] ont noté les observations suivantes :

- Les composés avec la plus grande activité antibactérienne et le plus large spectre sont des phénols tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol.
- L'importance du groupe hydroxyl des phénoliques a été confirmée par la comparaison de l'activité du carvacrol à celle de son éther méthylique qui n'exhibe aucune activité vis-à-vis de la totalité des souches testées [71].
- En outre, le pouvoir antibactérien semble être lié à la position de ce groupe hydroxyl ce qui a été démontré par la composition des effets du carvacrol et du thymol, ce dernier quoique très efficace contre les bactéries à Gram – montre une certaine inefficacité contre quelques bactéries à Gram +. Par ailleurs, l'importance du noyau phénolique a été mise en évidence par l'absence totale d'activité du p-cymène, un hydrocarbure terpénique cyclique.

L'activité des composés phénoliques est accrue par la présence des groupes méthyles, ce qui a été déjà observé précédemment par *Pelczar* [72]. Il a été suggéré que



l'alkylation induit une altération du rapport de distribution entre les phases, en réduisant la tension superficielle ou en modifiant la sélectivité des espèces.

La présence d'un groupement acétate dans la structure semble augmenter l'activité de la molécule mère.

Les alcools avec 10 atomes de carbones (ou mono-terpénols) viennent immédiatement après les phénols en terme d'activité, avec le géraniol, le linalol, le thymol, le menthol pour les plus connus, molécules à large spectre, ils sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes. Selon *Peleczar*, Ils agissent par dénaturation des protéines par déshydratation. Les aldéhydes, notamment le formaldéhyde et le glutaraldéhyde sont connus pour posséder une forte activité antibactérienne. Les aldéhydes α , β insaturés se voient encore plus puissants. Ceci est du probablement à leur forte électronégativité [72]. En effet *Kurita et al* ont noté une augmentation de leur l'électronégativité. De tels composés électronégatifs peuvent interférer dans les processus biologiques, en mettant en jeu un transfert d'électrons et réagissent avec l'azote vital des protéines et d'acides nucléiques, ils inhibent ainsi la croissance des microorganismes [73].

Un bon nombre de cétones a été testé, la présence d'une fonction oxygénée augmente les propriétés antibactériennes des terpénoïdes [74].

L'activité dépend également de la nature du substituant alkyl du noyau non phénolique. L'effet des substituants alkényles a été déjà signalé par *Peleczar* [72]; leurs données suggèrent qu'une chaîne allylique latérale semble accroître les effets inhibiteurs des phénols notamment contre les organismes à Gram-

L'effet antibactérien ne semble pas être indifférent de la stéréochimie des constituants ; il a été noté que les isomères α sont plus actifs que les isomères β , (α pinène plus actif que le β pinène). De même, les isomères trans manifestent plus d'effet que les isomères cis (cas du géraniol et du nérol)

Il est donc admis que l'activité antibactérienne des HE se classe dans l'ordre décroissant suivant la nature de leurs composés majoritaires [75, 76]:

Phénols > Alcools > aldéhydes > Cétones > oxyde > esters > hydrocarbure.

Toutefois l'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable [14].



Pour estimer l'effet antifongique des constituants des huiles essentielles, **Kurita et al** [73] ont étudié l'effet de 40 constituants sur 7 souches de champignons et le même ordre d'activité que celui de **Dorman** a été établi.

Chaumont et Léger [77] ont également testé 12 composés aromatiques vis-à-vis de 8 souches pathogènes pour l'homme. Ils concluent que les phénols, sont très actifs et que leur activité augmente avec l'encombrement stérique (p-n-propylphénol > thymol > isoeugénol > eugénol).

L'addition de groupement alkyl au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une action antifongique optimale.

I-3.1.2.Mode d'action des huiles essentielles

Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable, certaines recherches ont montré que la puissance de l'action des HE dépend de leurs constituants majoritaires, et que le mode d'action est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE, qui est largement diversifié [77-80].

Kurita et al., [73] attribuaient l'activité inhibitrice des huiles essentielles à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire.

Boochird et Flegel [81] ont suggéré que les HE auraient des cibles qui dépendent de la concentration en HE qui est la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme.

De son côté, **Franchomme** [82] pensait que les HE riches en constituants hydroxylés créent des perturbations enzymatiques et prennent pour cibles les enveloppes protectrices, le mésosome et le cytoplasme.

Une étude récente menée par **Rhayour et al.**, a examiné le mécanisme d'action des huiles essentielles du clou de girofle et d'origan simultanément avec ceux de deux de leurs constituants, le thymol et l'eugénol, Sur deux bactéries, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* pris comme modèles de bactérie Gram+ et Gram – respectivement.

Les deux huiles, tout comme leur composant ont été capables d'induire une lyse cellulaire. Cette lyse a été mise en évidence par la libération de substance absorbant à 260 nm. Cette libération de substance associée à la rapide mortalité bactérienne pourrait être la conséquence de lésions sur les enveloppes induites par les agents antibactériens. Des analyses au microscope électronique ont montré que les HE attaquaient les membranes et les parois cellulaires [14].

I-3.1.3. Rappels sur les bactéries

➤ Les bactéries

Les bactéries sont les cellules les plus simples connues. Elles possèdent une structure comportant une paroi périphérique extrêmement solide et un cytoplasme. L'ensemble est souvent d'une taille inférieure à 1µm. La plupart des espèces ont une multiplication extrêmement rapide.

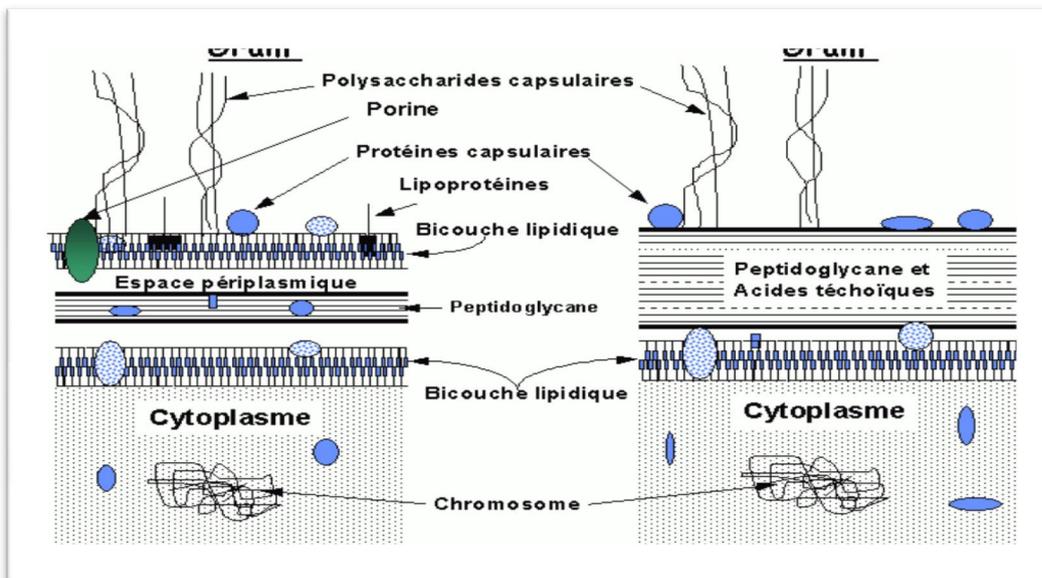


Figure. 10. Paroi des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif.

La classification en bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif reflète des différences fondamentales basées sur leurs propriétés de perméabilité aux colorants, liée à la nature de leurs composants de surface. Les différences les plus importantes sont dues à la présence d'une membrane externe chez les bactéries à Gram négatif et d'une épaisse membrane de

Muréine chez les bactéries à Gram positif. Ces dernières retiennent le violet de gentiane, par contre les bactéries à Gram négatif se décolorent. Ces micro-organismes peuvent encore être divisés en bacilles et cocci [83]. Certaines d'entre eux sont multi résistantes aux antibiotiques produisent des enzymes qui inhibent l'activité antibactérienne a titre d'exemple les bêtalactamases à spectre élargi (BLSE).

I-3.1.4. Les bêtalactamases a spectre elargi

Les bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) sont des enzymes qui confèrent une résistance à une vaste gamme de bêtalactamines (pénicilline, 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} génération de céphalosporines, à l'aztréonam) mais non aux céphamycines et carbapénèmes par l'hydrolyse de ces antibiotiques [84]. L'intérêt essentiel des huiles essentielles dans le traitement des infections est dû à leur composition complexe (poly moléculaire), l'inconvénient majeur des antibiotiques (mono produit) dans le cadre des actions antibactériennes, est l'apparition des souches bactériennes multi résistantes aux antibiotiques.

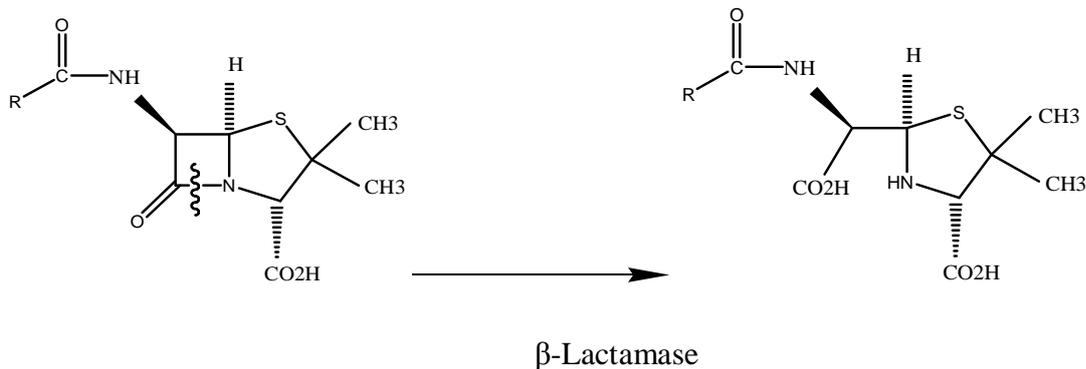


Figure.11. hydrolyse d'une pénicilline par une β-Lactamase



I-3.1.5. Généralités sur quelques souches bactériennes

➤ *Staphylococcus aureus*

Staphylocoques est un genre appartenant au groupe des cocci à Gram-positif, et il pousse en amas [85]. C'est un germe aérobic-anaérobic facultatif [86]. Les *staphylocoques* peuvent provoquer des abcès locaux. Ils font partie des bactéries pathogènes les plus résistantes et sont difficiles à éliminer de l'environnement humain. Ils sont à l'origine de nombreuses infections nosocomiales [83, 85, 86].

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un germe appartenant au groupe des bacilles à Gram négatif (mobiles, aérobies), il pousse facilement sur les milieux usuels, cette espèce se caractérise par la pigmentation bleu-vert de ces colonies [85, 86]. Ce germe est considéré comme germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales [86].

➤ *Enterobactéries*

Ce sont des bacilles à Gram-négatif, dont la plupart sont mobiles. Ils se cultivent facilement sur les milieux usuels et sont aérobic-anaérobies facultatifs.

Les espèces les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine, *E.coli*, *shigella*, *yersinia*, et *salmonella*. Les autres bactéries de cette famille se comportent comme des bactéries opportunistes souvent impliquées dans les infections nosocomiales. Parmi celles-ci on peut citer :

Proteus, *Entérobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, dont la plupart sont résistantes à un certain nombre d'antibiotiques [86].

➤ *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie aérobic, elle est essentiellement non pathogène cette espèce bactérienne comprend divers types de souches pathogènes qui ont évolué par acquisition de séquences d'ADN codant pour des facteurs et propriétés de virulence sur des îlots de pathogénicité [87].

➤ *Streptococcus*



Ces bactéries poussent en chainettes de cocci analogues à des colliers de perles, elles sont anaérobies, leur culture nécessite des milieux riches (gélose au sang). Les principaux streptocoques pathogènes sont β -hémolytiques, le plus important chez l'homme, est le groupe A. Les *streptocoques* de ce groupe sont responsables d'angines, et d'autre infections sévères. Ces infections peuvent être à l'origine de complications importantes, telles que le rhumatisme articulaire aigu [83].

➤ ***Klebsiella pneumoniae***

Klebsiella pneumoniae est un bacille à Gram-négatif, fréquemment rencontré en pathologie humaine. Il cause des infections nosocomiales, il peut aussi être à l'origine des infections communautaires, surtout chez les patients présentant des facteurs de comorbidité telle la bronchite chronique, la cirrhose hépatique, et le diabète sucré [88].

➤ ***Haemophilus influenzae***

Haemophilus influenzae appartient à la flore commensale de l'oropharynx de l'enfant et de l'adulte. Il est responsable de la quasi-totalité des infections invasives.

I-3.1.6.L'antibiothérapie

Le traitement médical des infections bactériennes repose essentiellement sur l'usage des antibiotiques. Le terme antibiotique signifie toute substance d'origine naturelle ou synthétique ayant une toxicité sélective sur les micro-organismes visés et au contraire une toxicité suffisamment faible vis-à-vis de l'hôte humaine, animal ou végétal pour que son administration puisse être réalisée par voie générale [89]. Les antibiotiques regroupent plusieurs familles, parmi elles on peut mentionner les bêtalactamines

I-3.1.7.les betalactamines

Les bêtalactamines constituent une vaste famille des antibiotiques. Elles partagent une structure commune qui comprend de façon constante un cycle bêtalactame et ou pour la plupart d'entre elles, un second cycle [90, 91]. Ainsi, en fonction des cycles et des chaînes latérales associées, on distingue :

- **Les pénicillines**, également appelées pénames : les molécules de ce groupe comportent un noyau thiazolidine à côté du cycle bêtalactame. Selon la nature des chaînes latérales, on trouve : les céphalosporines, les carbapénèmes, monobactames.

- **Les céphalosporines** : les molécules de ce groupe possèdent un noyau thiazine associé au cycle bêtalactame.
- **Les carbapénèmes** : leur noyau de base associe un cycle bêtalactame à un noyau péname. On distingue : l'imipénème, le méropénème et l'ertapénème
- **Les monobactames** : le noyau est limité au cycle bêtalactame. Seul l'aztréonam est à l'heure actuelle utilisé en clinique humaine.
- **Les clavames** : leur représentant est l'acide clavulanique.

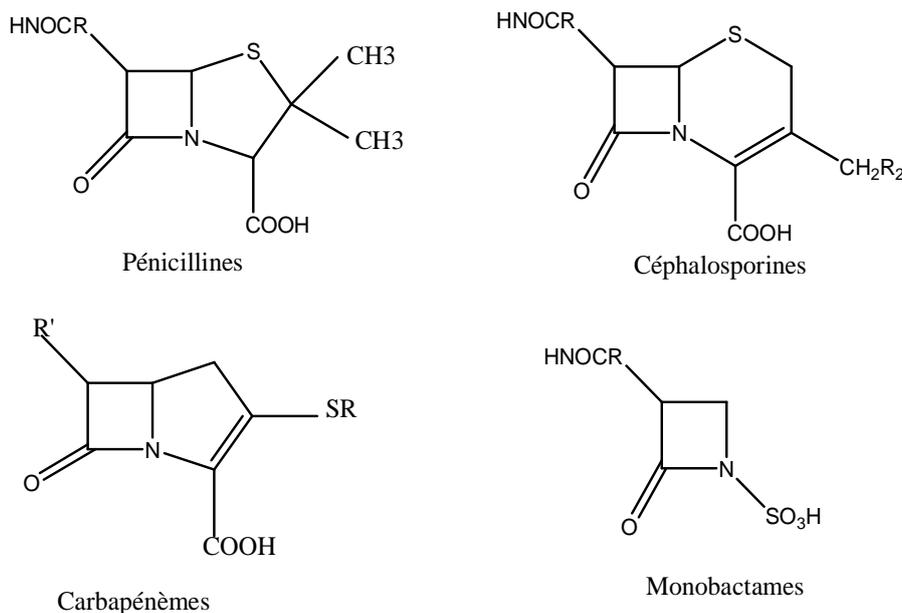


Figure.12. Structure chimique des bêtalactamines

I-3.1.8. Généralités sur les souches fongiques

Les mycoses sont des maladies provoquées par les champignons microscopiques appelés micromycètes. Pour la dénomination de ces mycoses, le nom de l'infection fongique dérive habituellement du genre du champignon, en lui ajoutant le suffixe ose. Ainsi la pathologie à candida s'appelle candidose, à aspergillus aspergillose.

➤ Les champignons

Appelés aussi mycètes. Un champignon est un micro-organisme eucaryote, uni ou pluricellulaire. Sa structure est constituée d'un thalle ou mycélium. Il se nourrit par absorption (et non par phagocytose comme les composants du règne animal). Sa paroi est riche en chitine, ce qui lui assure une certaine résistance aux contraintes du milieu externe [92].

Les mycètes se subdivisent principalement en deux formes [94]:

- La forme moisissure : filaments longs, fins et ramifiés à structure cellulaire appelée hyphes formant un mycélium, souvent visibles à l'œil nu.

-La forme levure : champignons microscopiques unicellulaires possédant un seul noyau et se reproduisant soit de façon asexuée par bourgeonnement ou scissiparité, soit par reproduction sexuée par formation de spores.

➤ **Candidose**

Les plus fréquentes des levures, provoquent des affections cosmopolites atteignant la peau, les ongles, les cavités naturelles [94].

➤ **Candida albicans**

Candida albicans est un champignon ovale, bourgeonnant ressemblant aux levures, qui produit un pseudo mycélium dans les cultures. Elle fait partie de flore normale des membranes muqueuses des faisceaux respiratoire, gastro-intestinale et génitale de la femme [79,95].

Le mécanisme de résistance aux agents antifongiques est illustré dans la figure-13-

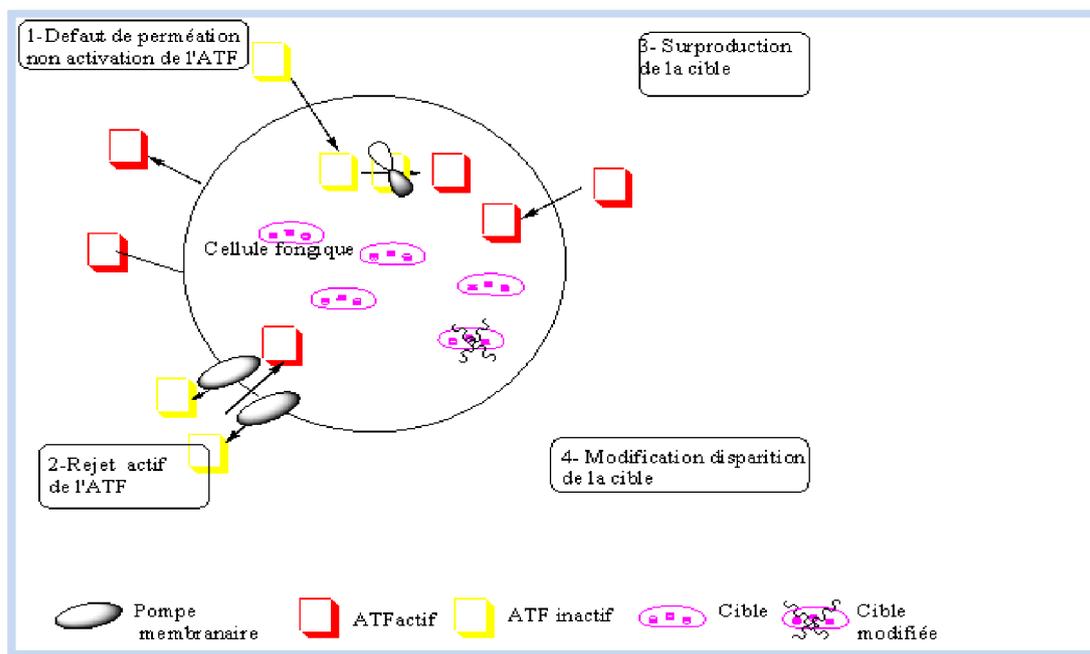


Figure.13. mécanisme de résistance aux antifongiques [13].

➤ **Aspergillus sp**



Ce sont des champignons ubiquitaires qui prolifèrent dans le sol et sur la matière organique en décomposition. L'aspergillose est une affection cosmopolite, la contamination se fait par inhalation des spores (2,5 à 3 μ m) présent dans l'atmosphère.

Les espèces pathogènes pour l'homme sont : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, et *Aspergillus terreus* [96].

I-3.2.TECHNIQUE D'ÉVALUATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

I-3.2.1.techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Ils existent plusieurs techniques d'évaluation de l'activité antibactérienne des composés purs ou des extraits bruts.

I-3.2.1.1.L'aromatogramme

L'aromatogramme est basé sur une technique très utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode des disques. Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de pétri, le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée de l'huile essentielle [97].

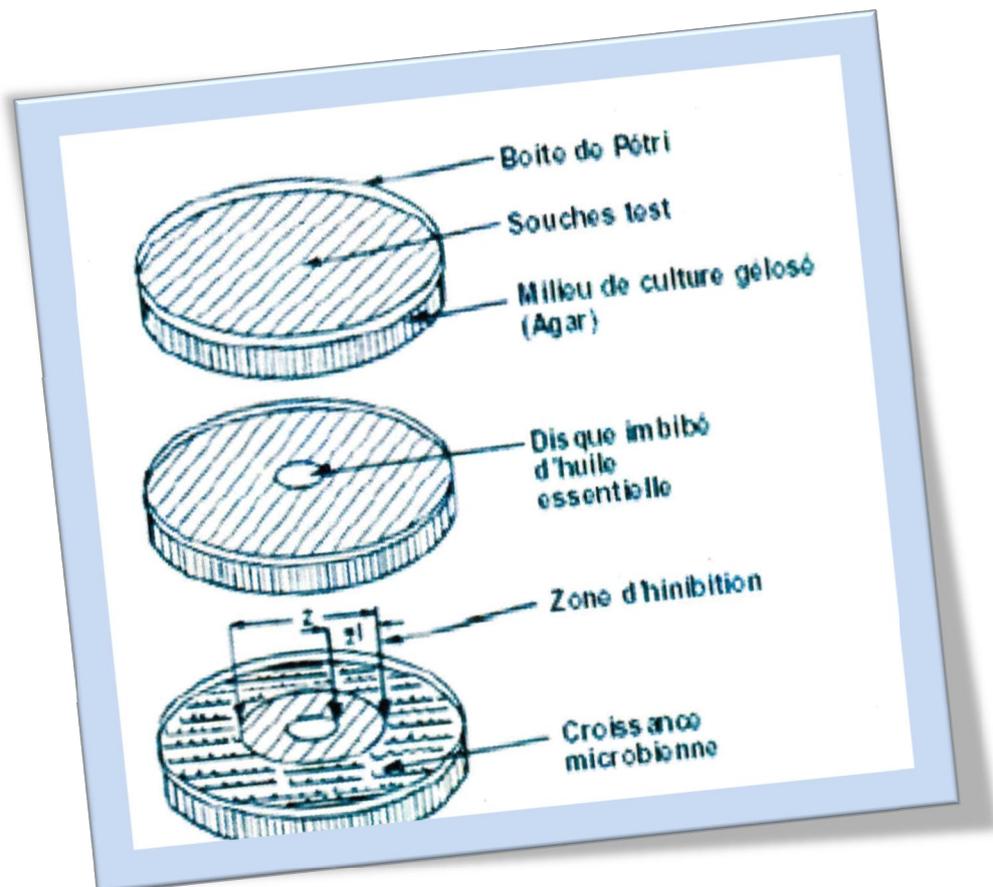


Figure.14. Illustration de la méthode d'aromatogramme sur boîte de pétri.

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer l'activité antimicrobiennes des agents antimicrobiens (dans notre cas les huiles essentielles). Parmi ces méthodes on peut citer :

I-3.2.1.2Technique de diffusion en milieu solide



Cette technique est comparable à l'antibiogramme. Le principe de cette méthode repose sur la diffusion du produit à tester (avec une concentration connue) en milieu solide, dans une boîte pétri) préalablement ensemencée. L'agent antimicrobien diffuse dans le milieu, créant une zone claire d'inhibition de croissance du germe, autour du disque chargé d'agent antimicrobien.

L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure de la zone d'inhibition. Il est indispensable d'établir un antibiogramme (antifongigramme) pour comparer l'effet du produit testé aux antibiotiques (antifongiques) [98, 99].

En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles, intermédiaires ou résistantes. Pour obtenir des résultats fiables, il faut travailler dans des conditions standardisées car plusieurs facteurs peuvent influencer sur les résultats :

- La densité de l'inoculum
- La température d'incubation
- Le temps d'incubation
- La concentration du produit à tester
- La composition du milieu de culture, ainsi l'épaisseur de la gélose.

Certains auteurs mentionnent que les résultats des testes des huiles essentielles ne sont pas toujours comparables d'un groupe à l'autre, car certains diffusent mal dans la gélose [100].

I-3.2.1.3. Technique de dilution en milieu solide

Cette méthode consiste à diluer le produit à tester, on réalise une gamme de concentration, puis on incorpore ces dilutions dans le milieu (la gélose en cours de refroidissement), après la solidification du milieu, l'ensemencement et l'incubation sont réalisés. L'avantage principal de cette méthode est de définir à la fois l'activité antimicrobienne du produit et sa concentration minimale inhibitrice (CMI) [92,99, 100].

La lecture des résultats se fait visuellement par observation de croissance ou d'inhibition de croissance du microorganisme, il est toute fois indispensable d'établir un test témoin ou contrôle négatif, sans produit antimicrobien.



I-3.2.1.4. Technique de dilution en milieu liquide

Cette technique consiste à réaliser des dilutions dans le milieu de culture (liquide), à partir d'une solution mère du produit à tester, chaque dilution est ajoutée à une suspension de microorganismes, l'ensemble est incubé pendant un temps donné, la température et le temps d'incubation dépendent du microorganisme testé. La lecture des résultats se fait soit visuellement ou par mesure de la turbidité par un spectrophotomètre.

I-3.2.2. Les concentrations critiques

I-3.2.2.1. La concentration minimale inhibitrice CMI

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en mg/l d'un antibiotique capable d'inhiber la croissance du microorganisme, après 18 heures de contact. Dans le cas des bactéries, la CMI est une donnée quantitative d'un antibiotique pour une souche bactérienne. C'est une information précise, nécessaire devant une bactérie multi résistante à la recherche du niveau d'activité d'un antibiotique et permettant un choix thérapeutique adapté [101].

Concernant les huiles essentielles, les techniques de détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI sont décrites par plusieurs études [6, 82, 102-104].

La CMI d'une huile essentielle est toujours inférieure à celle de son constituant principal, c.-à-d son activité globale est toujours supérieure à celle de son produit majoritaire [102].

I-3.2.2.2. La concentration minimale bactéricide CMB

La CMB est définie comme étant la concentration de l'antibiotique qui laisse moins de 0,01% de survivants de microorganismes après 18 heures. Les antibiotiques classés comme bactéricides sont ceux pour lesquels il ya peu d'écart entre la CMI et la CMB [85].

➤ Notion du bactéricide et bacteriostase



Quand l'antibiotique inhibe seulement la croissance des bactéries on parle ici de l'effet bactériostase, mais lorsque l'antibiotique provoque la mort des bactéries on parle de l'effet bactéricide.

Les huiles essentielles sont généralement très peu solubles dans l'eau, ce qui rend leur étude biologique et pharmacologique difficile, pour résoudre ce problème plusieurs auteurs suggèrent l'utilisation des solvants organiques comme l'acétone, le DMSO, DMF, ou l'utilisation de produits émulsifiants (tension actif comme le tween 20 ou tween 80) pour aider l'huile essentielle de se solubiliser dans le milieu de culture [6, 102,105-107].

I-3.1.2.ACTIVITE ANTIOXYDANTE



L'oxydation constitue probablement l'un des paramètres majeurs à l'altération des produits alimentaires. Les dégradations oxydatives qui en résultent affectent les qualités nutritionnelles des produits alimentaires et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. Dans ce contexte, les huiles essentielles constituent des sources potentielles des molécules types anti oxydantes.

I-3.1.2.1 Stress oxydant

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités de dérivés réactifs de l'oxygène (O_2 , $OH\cdot$, H_2O_2) [108]. Le rôle physiologique de cette production basale de dérivés réactifs de l'oxygène n'est pas totalement connu, mais certaines de ces molécules pourraient avoir une fonction dans les processus de signalisation cellulaire [109].

Les systèmes de défense chargés d'éliminer ces radicaux libres sont constitués d'enzymes anti oxydantes (super-oxyde dismutase SOD, catalase, peroxydase) ce sont des antioxydants primaires. Ces enzymes anti-oxydantes présentes dans la cellule, sont capables d'éliminer les radicaux libres primaires de façon permanente et efficace[109].

Dans certaines situation (Tabac, stress, pollution, radiation...), la production des radicaux oxygénés augmente fortement, entraînant un stress oxydatif qui consiste en un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules.

Les radicaux libres primaires, non éliminés vont alors oxyder les constituantes cellulaires ce qui engendre la formation de radicaux libres secondaires ($ROO\cdot$) qui sont capables de réaction d'oxydation en chaines qui conduisent à la destruction des cellules. Ces réactions sont impliquées dans un très grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques [110]. Le schéma suivant résume les différentes voies de production et d'élimination des radicaux libres [108].

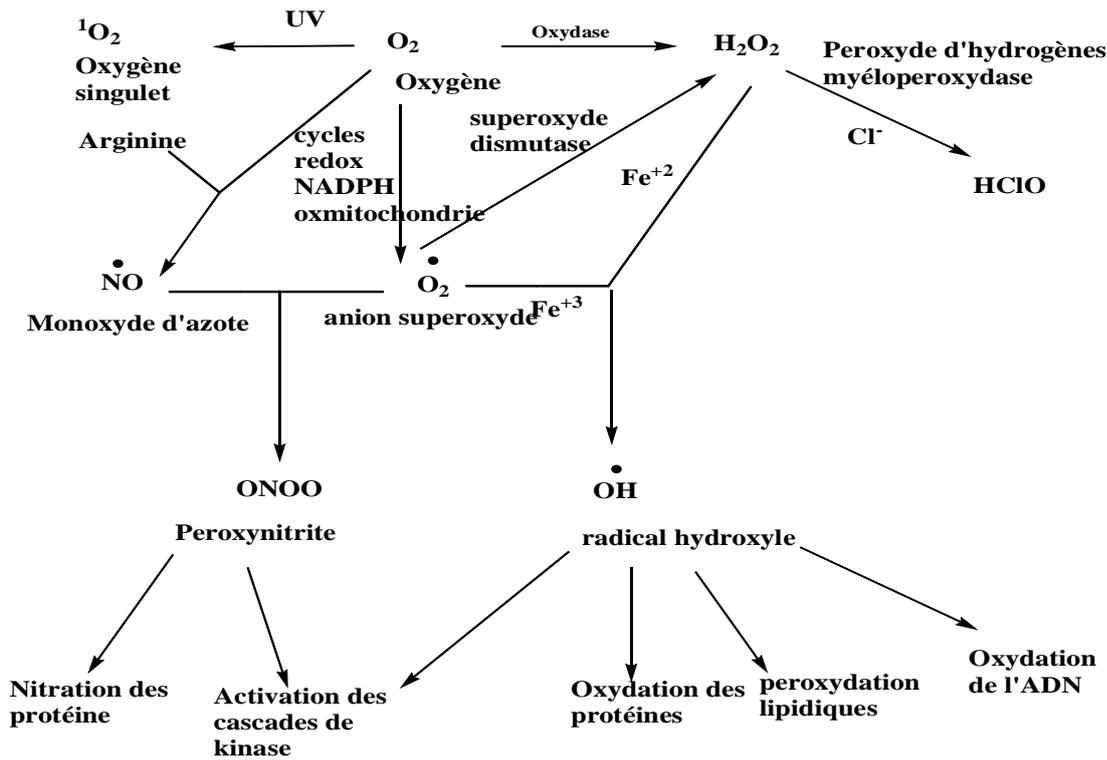


Figure.15. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie [91].

I-3.1.2.2. Radicaux libres

Se sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire. Le champ magnétique crée par sa rotation (spin) n'est donc pas compensé par la rotation inverse d'un électron apparié. Cette structure électronique déséquilibrée leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires. Un exemple bien connu de ce type de réaction est la peroxydation des lipides [111] Figure-16-.

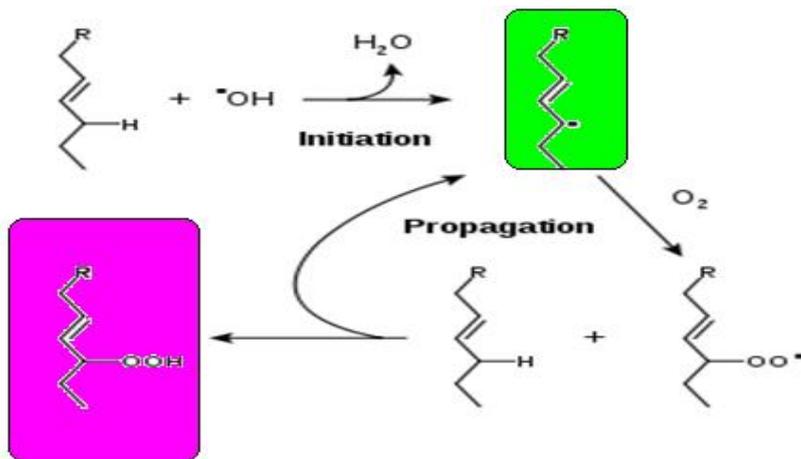


Figure.16. Schéma de la réaction de peroxydation lipidique.

On distingue deux types de radicaux libres :

- **Radicaux libres primaires**

Ce sont les radicaux oxygénés cités précédemment, formés à partir de l’oxygène

- Radical super oxyde $O_2^{\cdot-}$
- Radical hydroxyle OH^{\cdot}
- L’oxygène singulet 1O_2

Le peroxyde d’hydrogène H_2O_2 , qui n’est pas un radical mais c’est une molécule active qui conduit au radical OH^{\cdot}

- **Radicaux libres secondaires**

Ils sont formés par l’action d’un radical libre primaire sur un composant cellulaires (acides nucléique, protéines). Ces radicaux sont très dangereux puisqu’une fois formés, ils sont capables de créer une réaction en chaîne où un radical peroxyde attaque une molécule d’acide gras et la transforme en radical peroxyde, c’est la peroxydation lipidique qui conduit, si elle n’est pas contrôlée, à une destruction de la membrane cellulaire[112].



I-3.1.2.3. Les antioxydants

Un antioxydant est une substance ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air et capable de ralentir le phénomène d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel intervient une altération décelable du produit [113, 114]

Comme pour les radicaux libres, deux types d'antioxydants sont distingués :

✓ Les antioxydants primaires

Réagissant en défense de l'organisme contre les produits toxiques du métabolisme cellulaire. Cette ligne de défense est constituée :

- Des enzymes ; le superoxyde dismutase, les catalases, les glutathion peroxydases, ainsi que les systèmes thiorédoxines, sont reconnus comme étant les plus performantes dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ERO).
- Certaines protéines de transport comme la ferritine et la ceruloplasmine.

✓ Les antioxydants secondaires

Cette deuxième ligne de défenses complémentaires consiste en un ensemble de composés susceptibles de ralentir considérablement les effets des radicaux libres qui n'ont pas été piégés par les systèmes de défenses primaires.

Ce sont des molécules exogènes ; apportées par l'alimentation, et dont les plus connues sont : les vitamines (A, C, E...), les poly phénols, le sélénium, et le zinc [115].

Dans des tests *in Vitro*, toutes ces molécules peuvent piéger un radical libre et jouer le rôle d'antioxydant, la vitamine C par exemple est utilisée dans l'industrie agro alimentaire comme piègeur de radicaux libres par contre, *in Vivo*, c'est-à-dire dans la cellule il a été prouvé qu'elle sert à régénérer la vitamine E et donc n'est pas un antioxydant au sens strict du mot.

Par conséquent, on distingue les molécules qui peuvent piéger directement les radicaux libres organiques (Vitamines A, E...), et celles qui agissent de façon indirecte sur les radicaux libres.

➤ Antioxydants et alimentation

L'une des préoccupations majeures de l'humanité a toujours été de conserver ses aliments de façon à pouvoir se nourrir en tout temps. Or les développements



microbiens et les oxydations représentent les principaux risques sanitaires et les principales sources de détériorations des aliments.

Depuis quelques années, divers facteurs, notamment la méfiance du consommateur vis-à-vis de tout ce qui est artificiel, ont favorisé la recherche de molécules naturelles bioactives [112].

Le désir d'augmenter la durée de stockage des aliments à suscité le problème d'oxydation. En effet l'auto-oxydation des acides gras produit des composés instables qui changent le caractère rhéologique sensoriel et les caractéristiques nutritionnelles des aliments.

Les antioxydants synthétiques comme le butyl hydroxy toluène (BHT) et le butyl hydroxy anisole (BHA) sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour améliorer la stabilité des produits. Ils sont efficaces mais peuvent avoir des effets indésirables. Par conséquent l'utilisation d'antioxydants naturels est largement demandée.

I-3.1.2. Techniques d'évaluation de l'activité antioxydante

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes ROO• par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxydant Parameter); les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxydant Parameter) [116]; ou les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle), et la méthode du blanchissement du bêta-carotène. Ce sont les deux dernières méthodes que nous avons utiliser pour l'évaluation de l'activité antioxydante de nos huiles essentielles [117-119].

I-3.1.2.1. TEST DE DPPH

➤ Principe de la méthode

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig.1). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères. Le DPPH• reste donc dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur

bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm [120].

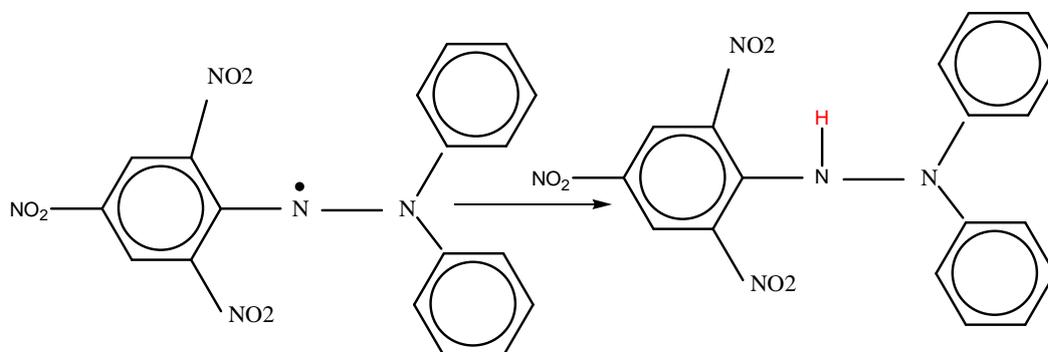


Figure.17. Forme libre et réduite du DPPH

I-3.1.2.2 Test de blanchissement du beta-carotène

➤ Principe de la méthode

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par **Marco**, puis légèrement modifiée par **Miller**. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène [121].

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester.



Deuxième Partie :

Etude expérimentale



Matériels et Méthodes

II-1.1.MATERIELS VEGETAL

➤ Récolte des plantes

La récolte du matériel végétal a été effectuée durant la période allant du mois de Mai 2008 jusqu'à Septembre 2008 dans la région de Batna (Timgad). L'identification des plantes a été réalisée par M^r. *Hamchi Abdelhafid* botaniste au Parc nationale de Belezma.

II-1.1.1.Extraction des huiles essentielles

Les plantes sont séchées à l'ombre pendant une semaine.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par le procédé d'hydrodistillation ; 200g de la plante sèche est introduit dans un ballon de deux litres rempli d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 3 heures, après condensation, l'huile est séparée par décantation, puis déshydratée par le sulfate de sodium anhydre et conservée dans le congélateur.

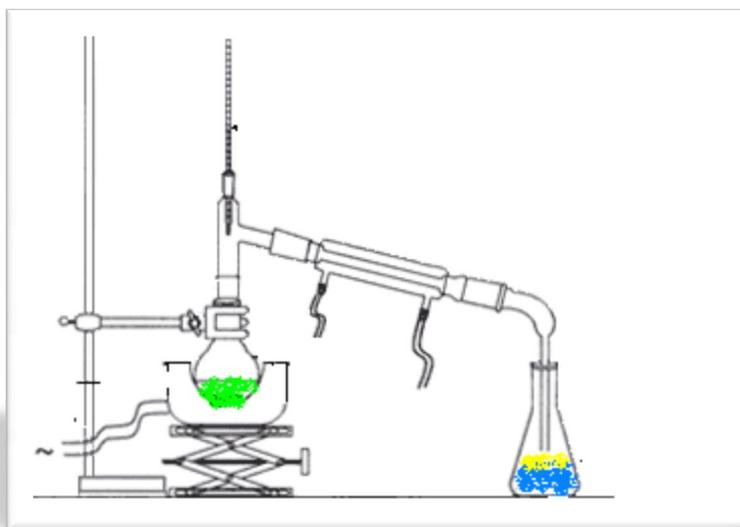


Figure.18. dispositif d'hydro-distillation.



➤ **Calcul du rendement**

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids de l'huile essentielle obtenu et le poids de la plante, il est calculé selon la formule suivante :

$$R = \frac{PHE}{PP} \times 100$$

II-1.1.2. Analyses chromatographiques par GC et GC/SM

Le profil chimique des trois huiles essentielles a été mis en évidence par la technique de chromatographie gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse. Le principe de cette technique, repose sur la différence de répartition des constituants d'un mélange complexe (dans notre cas l'HE) entre la phase mobile (gaze vecteur ou porteur) et la phase stationnaire de la colonne. Les différents composants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs spectre de masse avec ceux de la base de données .

➤ **Conditions opératoire**

Les HE ont été analysées sur un chromatographe de type Hewlett Parckard HP 6890 équipé d'une colonne capillaire HP-5 (longueur : 25m, et de 0.25mm de diamètre intérieur, l'épaisseur du film est de 0.25mm), l'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1.1ml/mn.

Pour toutes les analyses, on injecte 1µl d'échantillon d'huile essentielle diluée dans l'acétone à 10% (v/v). Programmation de la température : 50 à 300° C avec un palier de 5C°/mn, la température de l'injecteur : 280° C modes split.



II-1.2.LES ESSAIS BIOLOGIQUES

Nous avons évalué *in vitro* le pouvoir antimicrobien et antioxydant des trois huiles essentielles d'*Artemisia* : *Artemisia herba alba*, *Artemisia absinthium*, et *Artemisia campestris*, ainsi l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* qui est connue pour son pouvoir antimicrobien très puissant depuis longtemps. Elle est considérée comme modèle.

II-1.2.1.ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Le test de l'activité antibactérienne a été réalisé au niveau du laboratoire central de microbiologie « CHU Batna » sous la direction de Pr. Kassah Laour. Ahmed .

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu solide [122].

II-1.2.1.1.Souches bactériennes utilisées

L'activité antibactérienne a été évaluée sur des souches de référence et des souches pathogènes.

Trois souches de références :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Neuf souches pathogènes isolées à partir de prélèvements cliniques, parmi ces souches trois présentent une résistance aux antibiotiques. Ces différentes souches testées sont rassemblées dans le tableau.6., avec l'indication de leurs caractéristiques.



Le tableau.6. Les caractéristiques des bactéries testées [3]

Bactéries testés	Caractéristiques des bactéries		
	Exigences	Gram	La sensibilité vis-à-vis les antibiotiques
<i>Escherichia coli</i> ATCC		Gram -	Souche de référence sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC		Gram +	Souche de référence sensible
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC		Gram -	Souche de référence sensible
<i>Escherichia coli</i>	Bactéries non exigeantes	Gram -	Souche d'une résistance intermédiaire Vis-à-vis l' amoxicilline.
<i>Staphylococcus aureus</i>		Gram +	Souche d'une résistance intermédiaire Vis-à-vis la céfotaxime (CTX)
<i>Enterobacter sp</i> Nombre de souches : 2		Gram -	Souches BLSE + CHN
<i>Serratia sp</i>		Gram -	Souche d'une résistance intermédiaire Vis-à-vis la céfotaxime (CTX)
<i>Klebsiella pneumoneae</i> Nombre de souches : 2		Gram -	Souches BLSE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			Souches d'une résistance intermédiaire Vis-à-vis la gentamicine.
<i>Streptocoque sp</i>	Bactéries	Gram +	Souches d'une résistance intermédiaire Vis-à-vis la Vancomycine
<i>Heamophilus influenzae</i>	Exigeantes	Gram -	Souches d'une résistance intermédiaire Vis-à-vis la céfotaxime (CTX)

II-1.2.1.2.Milieux de culture

Selon l'exigence des souches, nous avons sélectionné comme milieux de culture les suivants :

Pour les bactéries non exigeantes les milieux sont : Gélose Nutritive et Mueller Hinton.

Pour les bactéries exigeantes le milieu adéquat : Gélose Mueller Hinton contenant 5% sang du cheval.



II-1.2.1.3.Méthode de diffusion en milieu solide

➤ **préparation de l'inoculum**

L'inoculum est obtenu à partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures sur gélose non inhibitrice, quelques colonies bien isolées de la souche à étudier ont été prélevées de manière à réaliser une suspension dans l'eau distillée stérile afin d'obtenir une suspension bactérienne équivalente à celle de l'étalon 0.5 Mac Ferland [122].

➤ **Ensemencement et incubation**

Couler aseptiquement le milieu de culture (gélose de Mueller-Hinton) en surfusion dans des boîtes de pétri (D = 9mm) à raison de 15ml par boîte. On laisse refroidir et solidifier, 1ml de chaque suspension de culture bactérienne de concentration 0,5 Mac Ferland est préparé, ensuite étalé à la surface du milieu de culture à l'aide d'un écouvillon.

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque de papier buvard de 6mm de diamètre, et l'imbiber avec 10 μ l de l'huile essentielle à tester, puis déposer sur la gélose. Les boîtes Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30 mn, et mises à l'étuve à une température de 37C° en atmosphère normale pour les bactéries non exigeantes et dans une atmosphère à 5% de CO₂ pour les bactéries exigeantes pendant 24h.

➤ **Détermination des CMI**

Les huiles essentielles ont été diluées dans une quantité minimale d'alcool éthylique à 95%, 1/10 V/V, à laquelle est ajoutée une solution aqueuse à 1% V/V de tween 80, pour obtenir une solution mère homogène. Celle-ci est incorporée dans la gélose en cours de solidification afin d'obtenir des dilutions. Les boîtes Pétri (D =9mm) sont ensuite séchées, et inoculé en stries de colonies bactériennes [123].

➤ **expression des résultats**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été mise en évidence par la mesure de diamètres de la zone d'inhibition autour des disques à l'aide d'un pied de coulisse.



II-1.2.2.ACTIVITE ANTIFONGIQUE

L'activité antifongique est réalisée au niveau de laboratoire de parasitologie et mycologie CHU Batna.

Deux protocoles expérimentaux ont été utilisés pour la mesure de l'activité antifongique.

La méthode de diffusion en milieu solide concerne les levures *Candida albicans*, *Candida kefyr*, ainsi que les champignons à spore [124]. La méthode de dilution en milieu solide concerne les filamenteux [125].

II-1.2.2.1.Souches fongiques testées

Deux levures et deux champignons ont été testés au cours de ce travail.

- Levures : *Candida albicans* et *Candida kefyr*.
- Champignons : *Aspergillus niger*, *Microsporium canis*.

II-1.2.2.2.Milieus de cultures

Nous avons utilisé deux milieux de culture :

- Gélose Sabouraud avec Chlorophénicol + Actidine,
- Gélose Sabouraud simple.

II-1.2.2.3.Méthode de diffusion en milieu solide

La méthode de diffusion en milieu solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antifongique (contre les souches : *Candida albicans*, et *Candida kefyr*, *Aspergillus niger*). Les spores des souches fongiques sont récupérées à l'aide d'un écouvillon à la surface d'une culture jeune de sept jours pour l'*Aspergillus niger*, et de deux jours pour les levures sur Gélose de Sabouraud et mises en suspension dans de l'eau distillée stérile (10^6 spores/ml), après l'agitation, l'ensemencement des boîtes de Pétri a été réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile. Des disques stériles de papier buvard (D = 6mm) imbibés avec 10 μ l de chaque huile essentielle, ont été déposés d'une manière stérile sur la Gélose préalablement ensemencée avec les spores fongiques.

Les levures ont été incubées 48 h à 37C°, tandis que les champignons ont été incubés sept jours à 27C° en atmosphère normale.



Des contrôles négatifs ont été réalisés.

II-1.2.2.4.Méthode de dilution en milieu solide

Les huiles essentielles sont dispersées en présence de tween 80 selon la méthode décrite par **Leite-De-Souza et al.**, [125]. Des solutions mères de chaque huile essentielle ont été préparées, à partir de celles-ci sont préparées des dilutions de 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, et 0.5% et sont alors incorporées dans la Gélose en cours de solidification. À l'aide d'une anse de platine stérile des disques de mycéliens de diamètre de 6mm ont été prélevés, ces derniers ont été déposés dans les milieux préparés préalablement avec des dilutions des huiles essentielles. Cette méthode est utilisée pour déterminer à la fois l'activité antifongique des huiles essentielles contre le champignon *Microsporium canis*, ainsi que pour déterminer la CMF (concentration minimale fongicide).

➤ Expression des résultats

L'activité antifongique a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition pour les levures, le diamètre de croissance pour les filamenteux.



II-1.2.3. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

II-1.2.3.1. Test de blanchissement du β -carotène

Ce test consiste à déterminer le pouvoir antioxydant des huiles essentielles par le suivi de la cinétique de blanchissement du β -carotène en présence de l'acide linoléique, l'eau oxygénée et les antioxydants de références (BHT, Acide ascorbique).

➤ Principe

La peroxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, ces derniers vont par la suite oxyder le β -carotène ainsi la disparition de sa couleur jaune [126, 127].

➤ Mode opératoire

Une solution de β -carotène (2mg/ml dans le chloroforme) a été préparée et introduite dans un ballon contenant 25 μ l d'acide linoléique et 200mg de Tween40. Après l'évaporation complète du chloroforme, 100ml d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés au mélange réactionnel avec agitation. 2.5ml de cette solution sont alors transférés dans des tubes qui contiennent 350 μ l de chaque huile essentielle (1mg/ml dans le méthanol). Des contrôles positifs sont établis avec les antioxydants standards (BHT, Acide ascorbique).

L'absorbance a été mesurée immédiatement pour le BHT à 490nm. Par contre les huiles essentielles ont été d'abord incubées à l'obscurité et leurs lectures d'absorbances ont été effectuées à des intervalles de temps réguliers pendant 48h.

➤ Expressions des résultats

L'activité antioxydante (relative AAR) des huiles essentielles est calculée après 48h selon l'équation suivante :

$$AAR = (AbsEchantillon / AbsBHT) \times 100$$

Ou'

- AAR : Activité antioxydante relative
- **Abs_{Echantillon}** : Absorbance de l'échantillon après 48h
- **Abs_{BHT}** : Absorbance du BHT après 48h



➤ Étude statistique

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique Graph Pad Prism.

Tous les essais ont été réalisés en triple, les résultats sont exprimés en moyen \pm SD.

Les résultats sont analysés par le test Anova univarié suivi du test Dunnet/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives.

II-1.2.3.2. Test du DPPH

Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles a été testé en employant la méthode du radical libre DPPH \cdot ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) qui est fréquemment utilisée pour mesurer le pouvoir antioxydant des produits naturels et synthétiques [128].

➤ Principe

Le principe est fondé sur le pouvoir des antioxydants qui jouent le rôle des piègeurs de radicaux libres. En présence de ces antioxydants : soit synthétique (BHT) ou naturels (dans notre cas les huiles essentielles), le radical libre DPPH (2,2 diphényl 1 picryl hydrazyl), qui est caractérisé par sa couleur violette, se réduit en 2,2diphényl 1 picryl hydrazine de couleur jaune [129].

➤ Mode opératoire

Dans des tubes à essais sont introduits 2,5 ml de chaque huile essentielle (de concentration 1mg/ml) et 1ml d'une solution méthanolique du DPPH (0,3mM) . Après agitation par un vortex, les tubes sont incubés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Les lectures sont effectuées contre un blanc par la mesure de l'absorbance à 517nm.

Un contrôle négatif a été préparé par 1ml de la solution DPPH et 2.5ml de méthanol. Le contrôle positif est composé d'une solution d'un antioxydant standard (BHT).



➤ **Expressions des résultats**

$$AA = [(Abs517 \text{ contrôle} - Abs517 \text{ échantillon}) / Abs517 \text{ contrôle}] \times 100$$

➤ **Étude statistique**

L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique Graph Pad Prism.

Tous les essais ont été réalisés en triple, les résultats sont exprimés en moyen \pm SD.

Les résultats sont analysés par le test Anova univarié suivi du test Dunnet/Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées significatives.



Troisième Partie :

Résultats et discussions

III -1-RENDEMENT

Les rendements moyens en huiles essentielles sont rassemblés dans le tableau -7- et présenté par l’histogramme-1-. La valeur, la plus élevée a été obtenue avec l’espèce *Artemisia herba alba* avec un rendement de 1,7%. Ces valeurs corroborent celles rapportées dans la littérature [68, 69, 130, 131].

Tableau.7. Rendement d’extraction des huiles essentielles en %

Plante	Rendement en huiles essentielles
<i>Artemisia herba alba</i>	1,7
<i>Artemisia absinthuim</i>	1,5
<i>Artemisia campestris</i>	0,2
<i>Thymus vulgaris</i>	3,01

Nous notons que l’espèce *Artemisia campestris* a un faible rendement (0.2%). Les études menées dans la littérature ont rapporté des rendement du même ordre pour cette espèce [68, 69]

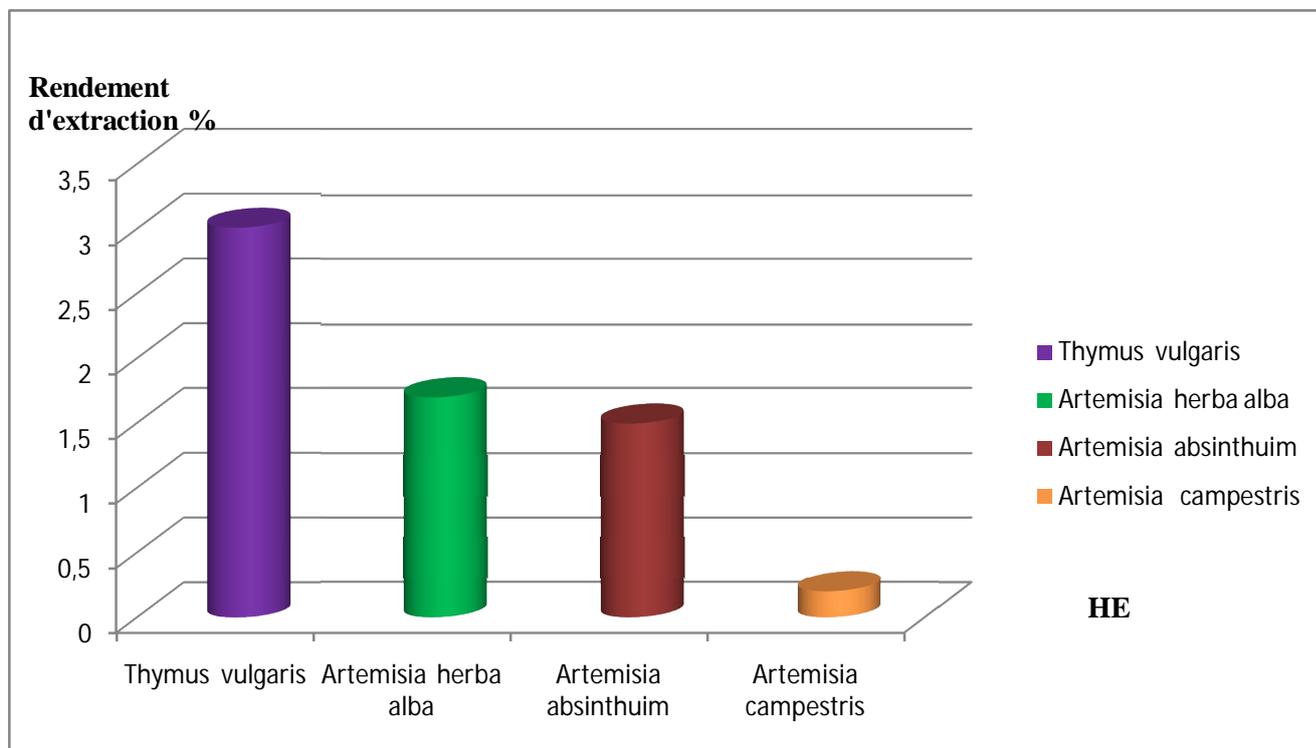


Figure .19. Rendement d’extraction des huiles essentielles en %.

III -2-PRIFILS CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

III -2.1.La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *herba alba*

L'huile essentielle de l'espèce *Artemisia herba alba* obtenue est de coloration jaune pale. 27 composés ont été identifiés, représentant 88,51 % de la totalité de l'huile essentielle, et sont représentés dans le tableau-8-

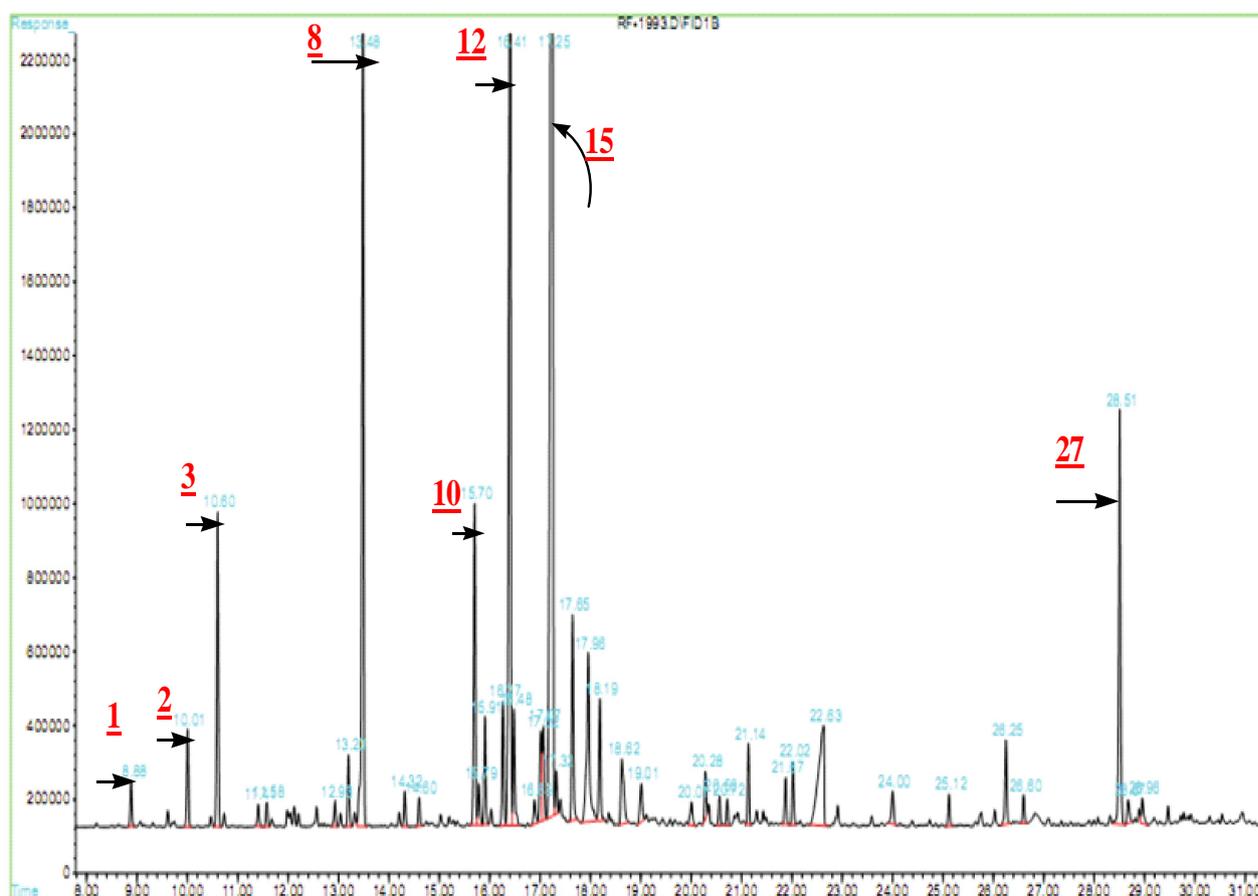


Figure .20. Profil chromatographique de l'HE d'*Artemisia herba alba* analysée par GC/SM.

**Tableau.8. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba***

Numéros de structures	TR	IK	Nom du composant	Pourcentage
1	8,88	908	Santolinatriène	0.516
2	10,00	939	alpha pinène	1.169
3	10,60	953	Camphène	3.759
4	11,40	976	Sabinène	0.289
5	11,57	980	béta pinène	0.294
6	12,92	1018	alpha terpinène	0.330
7	13,19	1026	para cymène	0.868
8	13,48	1033	1,8-cinéole	11.652
9	14,31	1062	gamma terpinène	0.422
10	15,7		Terpinène	4.045
11	15,90	1114	béta thujone	1.252
12	16,40	1123	Chrysanthène	13.560
13	16,48	1122	menth-2-ène-ol cis	1.470
14	17,017	1139	trans pinocarvéol	1.316
15	17,24	1146	Camphre	29.141
16	17,64	1162	Pinocarvone	2.523
17	17,95	1169	endo bornéol	3.395
18	18,18	1177	terpinène-4-ol	1.512
19	18,62	1196-8	alpha terpinéol +cis pipéritol+myrténal+myrténol	1.385
20	19,01	1208	trans pipéritol	0.621
21	20,00	1243	Carvone	0.376
22	20,28	1253	Pipéritone	0.565
23	21,13	1286	acétate d'isobornyle	0.877
24	23,99	1393	Z jasmone	0.516
25	26,24	1485	germacrène-D	1.072
26	26,60	1500	bicyclogermacrène	0.330
27	28,50	1577	Davanone	5.261

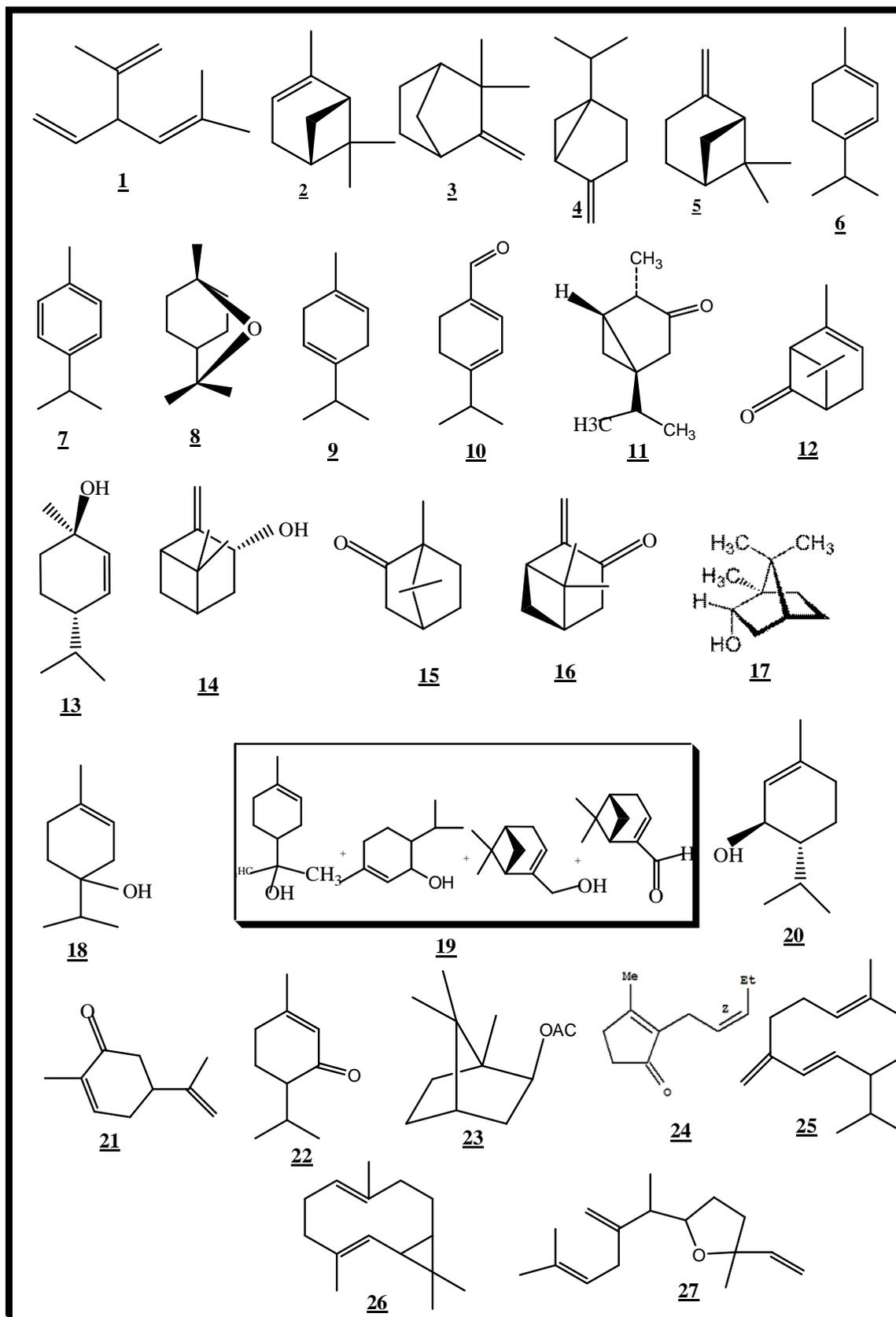


Figure.21. Composés identifiés dans l'HE d'*Artemisia herba alba*.

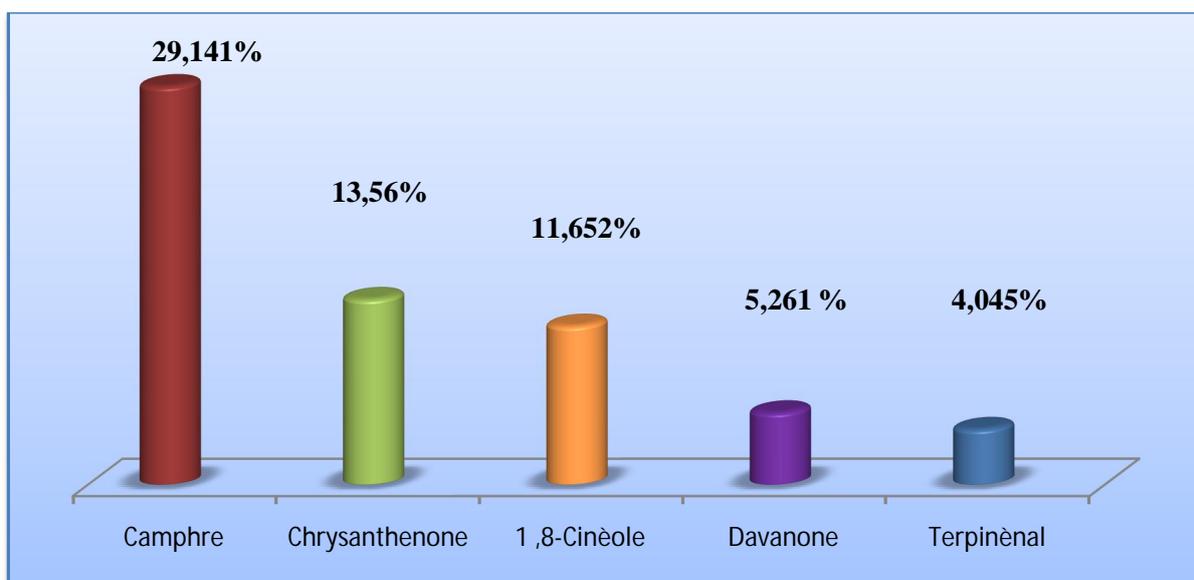


Figure .22. Les principaux composants de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*.

Les composants de notre huile peuvent être classés en cinq classes :

- Les hydrocarbures mono-terpéniques.
- Les mono terpènes oxygénés
- Les hydrocarbures sesquiterpéniques.
- Les sesquiterpènes oxygénés.
- Autres.

Les mono-terpènes représentent environ (07,64%) de l'ensemble des constituants de notre huile. Les mono-terpènes oxygénés constituent la classe principale de cette huile et sont représentés par les alcools (9,7%), les cétones (47,41%), les aldéhydes (4,045%) et esters (0,877%). Avec le camphre (29,14%), la chrysanthénone (13,56%), et le 1,8-cinéol (11,65%) comme composants majoritaires et sont accompagnés par : le terpinéal (4,05%) et l'endo bornéol (3,4%).

En outre, les hydrocarbures mono-terpéniques interviennent par un pourcentage de (7,64 %), parmi ces composés, le camphène (3,76%), α -pinène (1,16%), sabinène (0,28%), sont les plus importants.

Les sesquiterpènes ne représentent que (6,66%) de la totalité de l'huile essentielle, et dont la davanone est représentée par un taux appréciable (5,26%).



L'huile essentielle des parties aérienne d'*Artemisia herba alba* a été largement étudiée. Comme pour toutes les huiles, une grande variabilité chimique a été rapportée. Sur la base des résultats fournis par la littérature [50] deux types d'huiles peuvent être distingués :

Celles dont la composition est dominée par un seul composé majoritaire : camphre, β ou α thujone, chrysanthénone, acétate de chrysanthényle, davanone, ou l'eucalyptol (1,8-cinéol) et celles caractérisées par la codominance de deux ou plusieurs de ces composés.

Notre huile fait partie de ce dernier type avec la codominance du camphre, la chrysanthénone et le 1,8-cinéole.

Les huiles essentielles d'armoise dominées par la thujone ont été trouvées au Maroc, et en Algérie [50, 132].

La chrysanthénone a été signalée comme composant majoritaire dans l'huile essentielle hydro-distillée de l'Espagne [50], du Maroc, des espèces d'Algérie [55], et celle de la Tunisie rapportée par **Bokrich** [133].

L'acétate de chrysanthényle a été trouvé le constituant dominant dans certaines huiles en provenance du Maroc, Palestine [132], sa dominance a été également rapportée dans les huiles d'Algérie, et très récemment dans un chémotype détecté au sud ouest de la Tunisie [132], cet ester est absent dans notre huile, qui est par contre riche en chrysanthénone (13,56 %), qui pourrait être engendré par hydrolyse de l'acétate suivie par une oxydation.

On note également l'absence du trans acétate de sabinyle et l' α -eudesmol identifiés dans l'huile originaire de la Jordanie.

L'eucalyptol (1,8-cinéole) est identifié comme étant le constituant majoritaire dans l'huile essentielle originaire de l'Espagne (41%) [50]. Il est également l'un des composés principaux dans l'huile essentielle originaire d'Ichemoul en Algérie [134], et celle de Matmata en Tunisie.

L'huile essentielle de M'sila [134, 55] et celle de la Jordanie sont exemptes de ce composé.



La présence de l'eucalyptol confère à l'huile essentielle des propriétés antiseptiques [135].

Les huiles du type camphre ont été signalées en Espagne [50], au Maroc, en Egypte, en Tunisie, et en Algérie [134].

Le taux élevé en camphre est un trait commun à toutes les huiles essentielles algérienne de différentes localités (Bousaada, Batna, Sidi Aissa, Djelfa et Khenchela, mais notre huile, et celle de Biskra se distinguent par le faible taux en thujone et partagent cette particularité avec l'huile essentielle originaire du Maroc [134], et certains chemotypes d'Espagne [50].

Alors que le trans pinocarveol est représenté avec un taux élevé (16,9%) dans l'huile essentielle de M'sila, il n'a marqué sa présence dans notre huile que faiblement avec un pourcentage de (1,31%).

Tableau.9. les principaux composants des huiles essentielles d'*A. herba alba* de différentes sites de récolte.

Origine Constituants en %	Batna	M'sila	Biskra
Camphre	29.14	19.4	1,51
Trans-pinocaviolé	1.31	16.9	17,1
Chrysanthénone	13.56	15.8	4,98
β -thujone	1.25	15	1,53

Le camphre (29,14%), et la chrysanthénone (13,56%) qui sont les composés dominants dans le profil chimique de notre huile essentielle, Tableau-9- peuvent provenir des pinènes, et qui sont d'ailleurs que faiblement représentés dans cette huile.

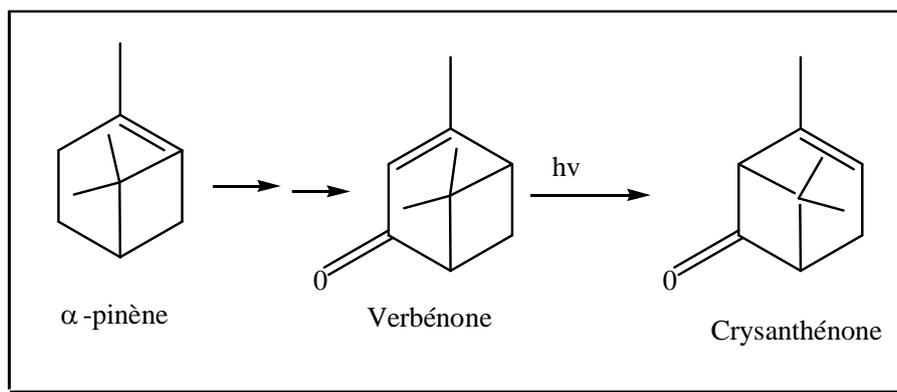


Figure.23. Voie de transformation de pinène en caryophyllène [136].

Si l'on observe également le schéma de la transformation du cation terpényle-8 figure.24.

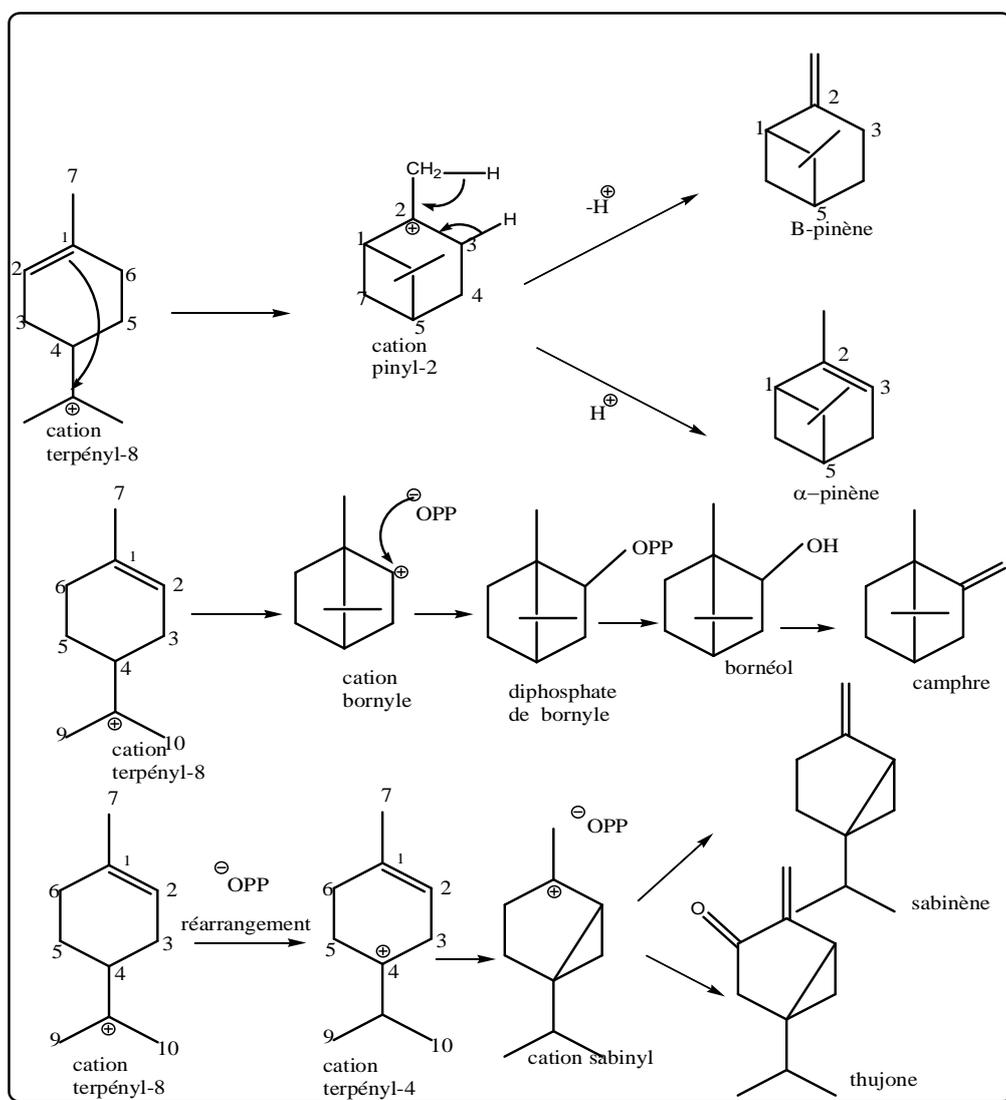


Figure.24. Voie de la transformation du cation terpényle-8 [136].



3 chemins biosynthétiques sont à considérer.

- La bi cyclisation en C₇-C₃ du carbocation α -terpényle avec capture d'un anion diphosphate de bornyle précurseur du camphre.
- La fermeture du cycle butanique sur les carbones allyliques 1 et 2 de l'anion terpényl-8 donnant naissance au cation piny-2, ce dernier évoluerait par perte d'un proton vers la formation des α et β pinène.
- Réarrangement du cation terpényl-8 en cation terpényl-4 suivi par la fermeture du cyclopropane.

La transformation est achevée par la sabinène synthétase vers la sabinène ou la thujone synthétase vers la formation de la thujone [136].

A l'examen des résultats obtenus pour notre huile on peut conclure que dans l'espèce étudiée le chemin 2 est le plus favorable.

Le cation terpenyl-8 est plutôt orienté vers la formation du camphre via le cation bornyle au déterminent de la formation du cation terpenyl-4 qui conduit à la thujone ou la fermeture du cycle butanique qui aboutit aux pinènes.

III -2.2.La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *A.campestris*

L'huile obtenue est visqueuse de couleur jaune avec une intense odeur boisée. Les analyses par CPG et CPG/SM ont permis d'identifier 24 composés, représentant 71,873 % , et sont rassemblés dans le tableau-10- et présenté par l'histogramme-27.

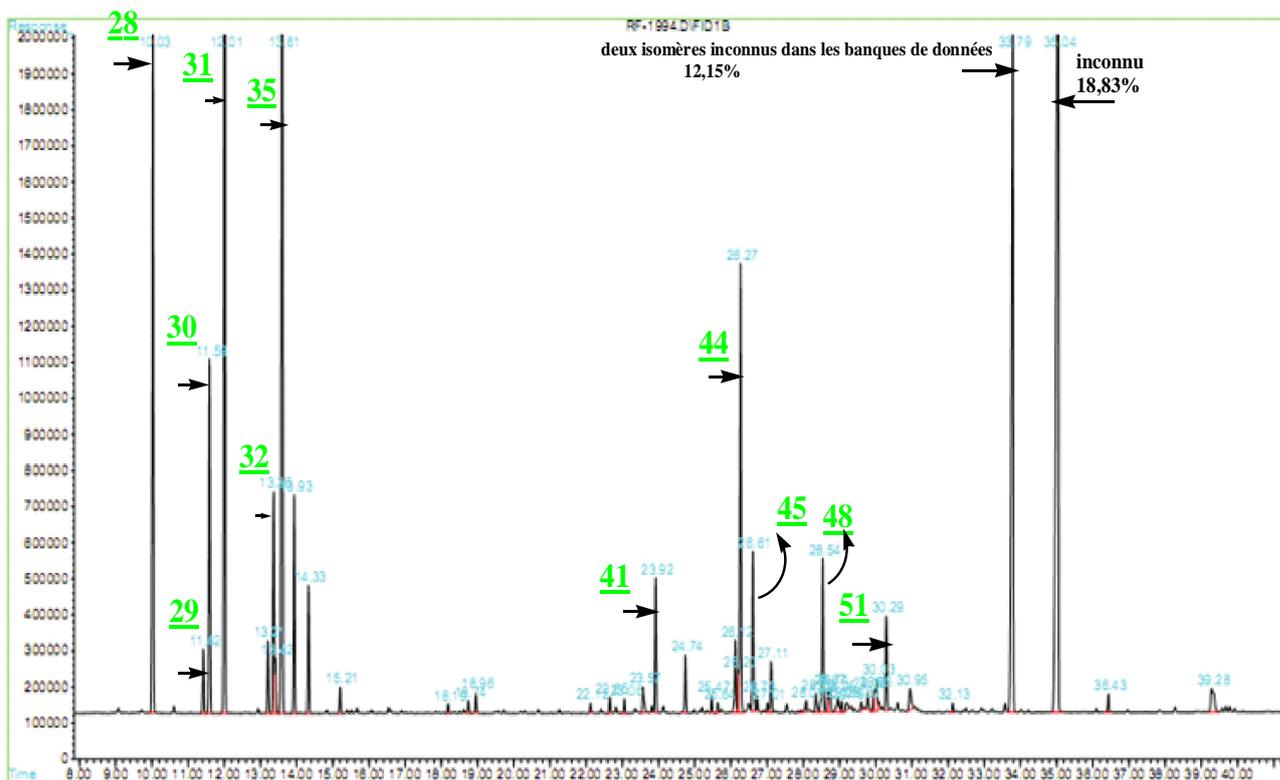


Figure .25. Profil chromatographique de l'HE d'*Artemisia campestris* analysée par GC/SM

Tableau.10.Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*

Numéros de structures	IR	IK	Nom du composant	Pourcentage
28	10.029	939	alpha pinène	8.473
29	11.421	976	Sabinène	0.746
30	11.594	980	béta pinène	4.162
31	12.014	991	Myrcène	12.441
32	13.207	1026	para cymène	0.834
33	13.365	1031	Limonène	2.641
34	13.418	1031	béta phellandrène	0.547
35	13.605	1140	(Z)-béta-ocimène	13.698
36	13.935	1050	(E)-béta-ocimène	2.382
37	14.329	1060	gamma terpinène	1.439
38	15.207	1088	terpinolène	0.293
39	23.056	1361	acétate de néryle	0.157
40	23.572	1381	acétate de géranyle	0.415
41	23.919		cyclododéca-1,5,9-triène	1.529
42	24.742	1419	béta caryophyllène	0.704
43	26.123	1483	gamma curcumène	0.885
44	26.265	1485	germacrène-D	5.462
45	26.608	1500	bicyclogermacrène	2.056
46	27.011		gamma cadinène	0.115
47	27.112	1523	delta cadinène	0.603
48	28.536	1578	spathuléol	2.034
49	28.672	1583	caryophyllène oxyde	0.310
50	30.031	1641	épi alpha muurolol	0.624
51	30.294	1653	alpha cadinol	1.253

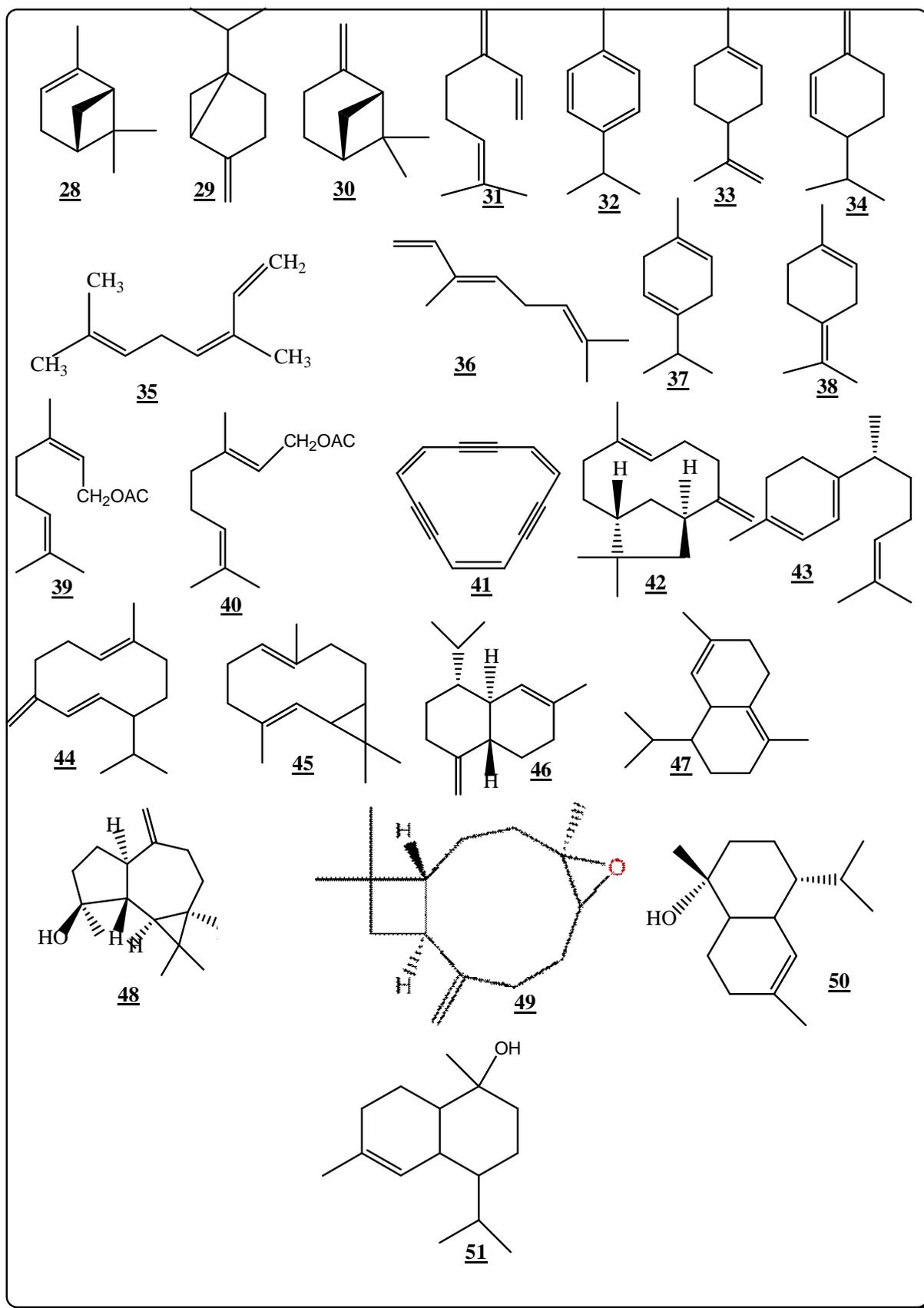


Figure.26. Composés identifiés dans l'HE d'*Artemisia campestris*.

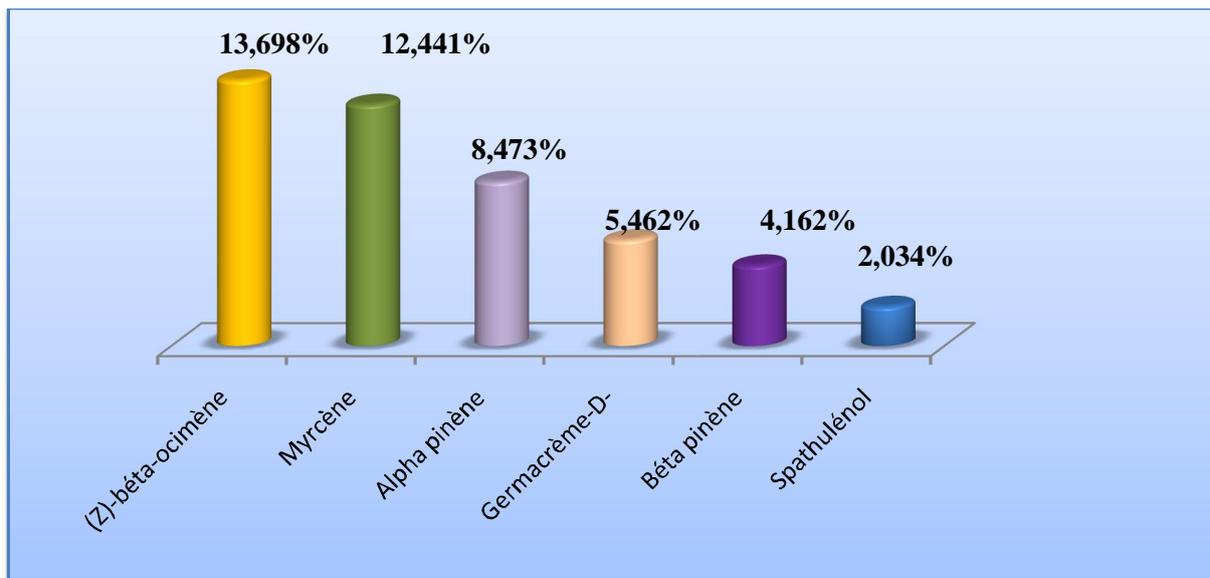


Figure.27. Les produits majoritaires de l'huile essentielle d'*A.campestris*.

Les hydrocarbures mono-terpéniques sont dominants avec un taux global de (47,6 %), et sont essentiellement représentés par le myrcène (12.44%), le (Z)- β -ocimène (13.69%), et l' α -pinène (8.47%).

Ces trois constituants codominent avec deux autres composés sesquiterpéniques non connus figurant avec des taux de 12% et 18.83% (Figure.25.) de l'huile totale.

Les autres composants présentent des pourcentages plus faibles allant jusqu' a des traces. Ces composés même en faible pourcentage, possèdent un intérêt chimique et biologique intéressant ; le limonène par exemple, présent dans notre huile avec un taux de 2.6% est doté de propriétés antibactériennes, le para-cymène (0.83%) possède un pouvoir fongicide [79].

Le profil chimique de notre huile est tout à fait différent de l'huile essentielle Algérienne originaire de Boussaada récemment étudiée par **Belhattab**[137] ; qui est essentiellement dominée par l' α -pinène (18,4%), limonène (5,2%), camphre(9,2%)

Le β et α pinène sont les constituants majoritaires des huiles originaires de la Tunisie , de la Turquie et de la Serbie [69]. Dans celle de l'Italie, leur présence est marquée par des taux appréciable (9.8%, et 15.3%) respectivement, mais dominés par l'oxyde de caryophyllène. Ce dernier domine avec d'autres composés à squelette caryophyllène.



L'huile Française est en total contraste avec les autres huiles ; elle présente la particularité d'être constituée essentiellement par les composés acétyléniques, représentés par le capillène, le 1-phényl-2.4-pentadiyne et le 1-phényl-2.4-pentadiynone précédemment identifiés dans *A. capillaris* et *A. dracunculus* [67], et *A. glauca*.

Dans notre échantillon, les acétyléniques considérés comme marqueurs chemotaxonomiques des *Artemisia* de la section *dracunculus*, ne sont représentés que par un seul constituant ; le cyclo deca-1.5.9- triyne et avec un faible taux de 1.53%.

Le tableau suivant rassemble les données concernant la composition des huiles de différentes régions et donne un aperçu sur la variabilité chimique de cette huile.

Tableau.11. La composition des huiles de différentes régions.

Composant Origine	α -pinène	β -pinène	(Z)-béta- ocimène	Germacrène-D
Algérie	8.47	4.16	13.96	5.46
Tunisie	6.2	27	4.5	-
France	0.1	3.7	-	-
Italie	15.3	9.8	-	-
Serbie	3.4	9.1	-	3.3



III -2.3.La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *A.absinthium*

L'huile essentielle obtenue à partir de l'absinthe est de coloration bleu verdâtre .cette couleur indique la présence des dérivés de l'azulène, représentés ici par le chamazulène , qui intervient par un taux de (7,72%).

Vingt sept composés ont été identifiés et représentent environ (92%) de la composition chimique totale, et sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau.12. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium*

Numéros de structures	IR	IK	Nom du composant	Pourcentage
52	9.760	930	alpha thujène	0.349
53	10.024	939	alpha pinène	2.347
54	10.615	954	Camphène	2.875
55	11.421	975	Sabinène	0.193
56	11.590	979	béta pinène	0.144
57	11.847	986	6-méthyl-hept-5-èn-2-one	0.252
58	12.001	991	Myrcène	3.409
59	12.947	1017	alpha terpinène	2.225
60	13.210	1025	para cymène	1.350
61	13.362	1029	Limonène	0.542
62	13.483	1033	1,8-cinéole	0.190
63	14.336	1060	gamma terpinène	4.161
64	14.751	1070	cis sabinènehydrate	1.092
65	15.211	1089	Terpinolène	0.967
66	15.691	1097	Linalol	3.702
67	15.748	1098	trans sabinène hydrate	0.294
68	16.490	1122	cis menth-2-èn-1-ol	0.488
69	17.271	1146	Camphre	44.935
70	17.961	1169	endo bornéol	1.307
71	18.218	1177	terpinène-4-ol	9.449
72	18.625	1195	alpha terpinéol	0.886
73	20.914	1271	aldehyde périllique	0.424
74	23.595	1377	alpha copaène	0.260
75	24.742	1418	béta caryophyllène	0.257
76	26.259	1485	germacrène-D	2.089
77	26.941		nor calacorène	1.151
78	31,93	1719	Chamazulène	7.727

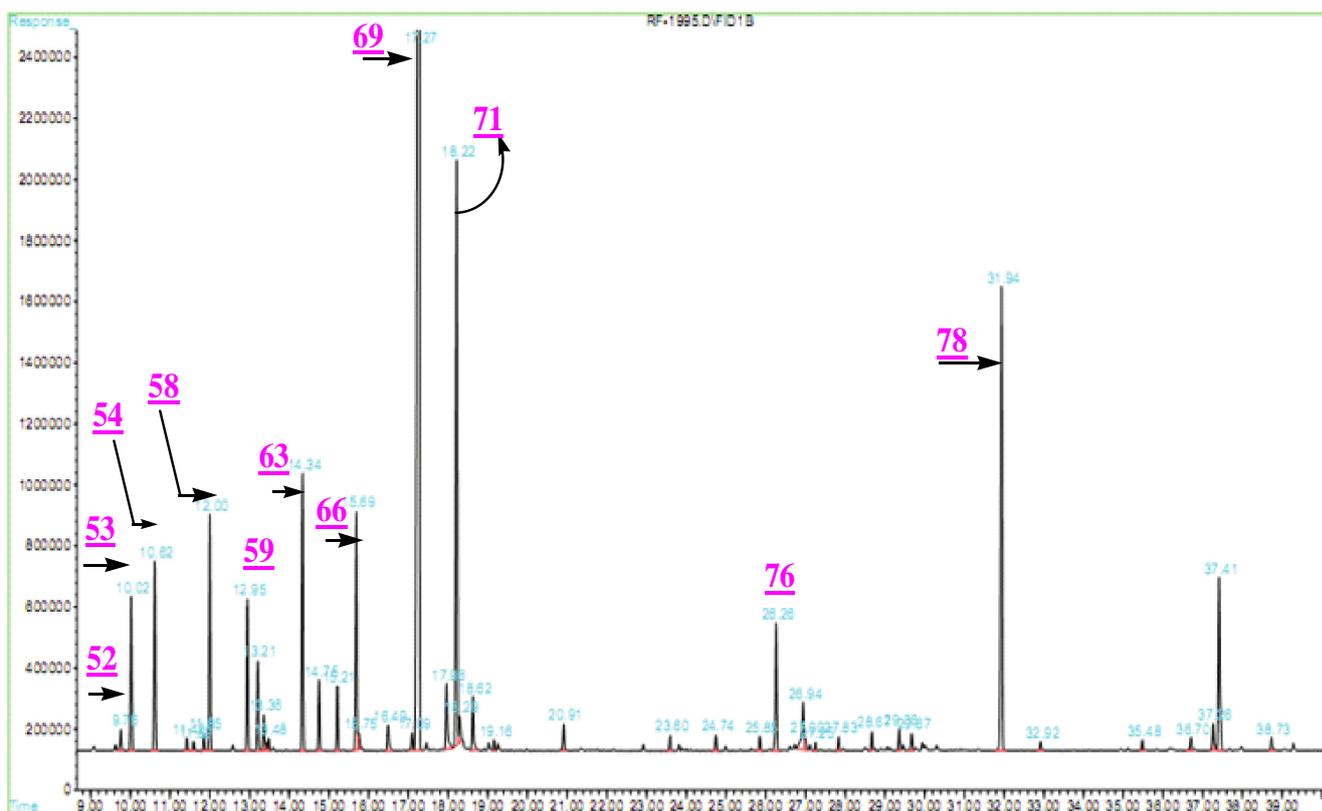


Figure .28. Profil chromatographique de l'HE d'*Artemisia absinthium* analysée par GC/SM

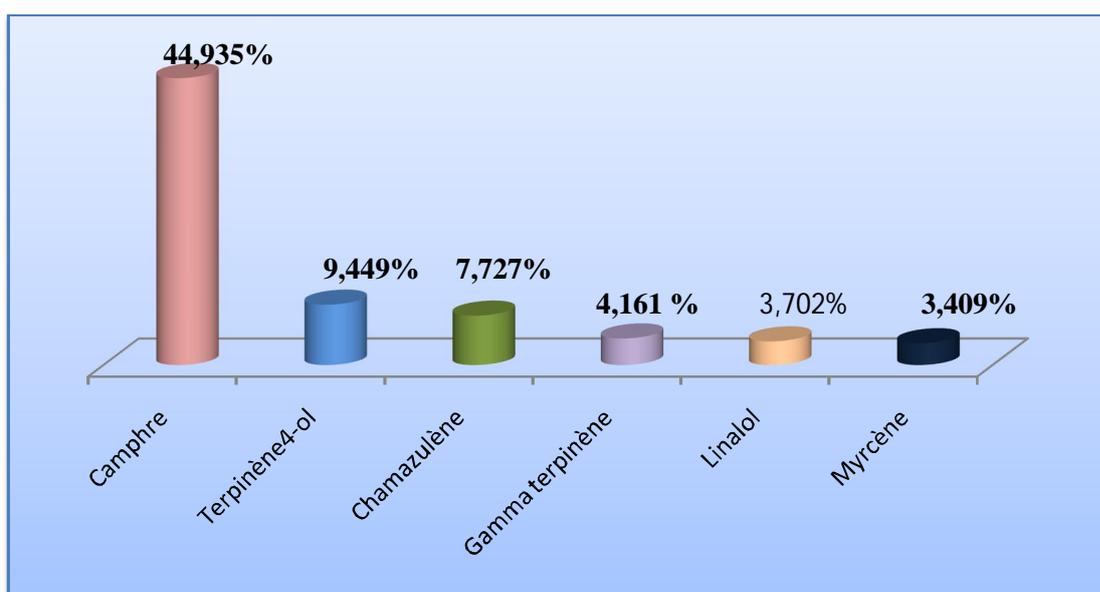


Figure.29. Les produits majoritaires de l'huile essentielle d'*A.absinthium*.

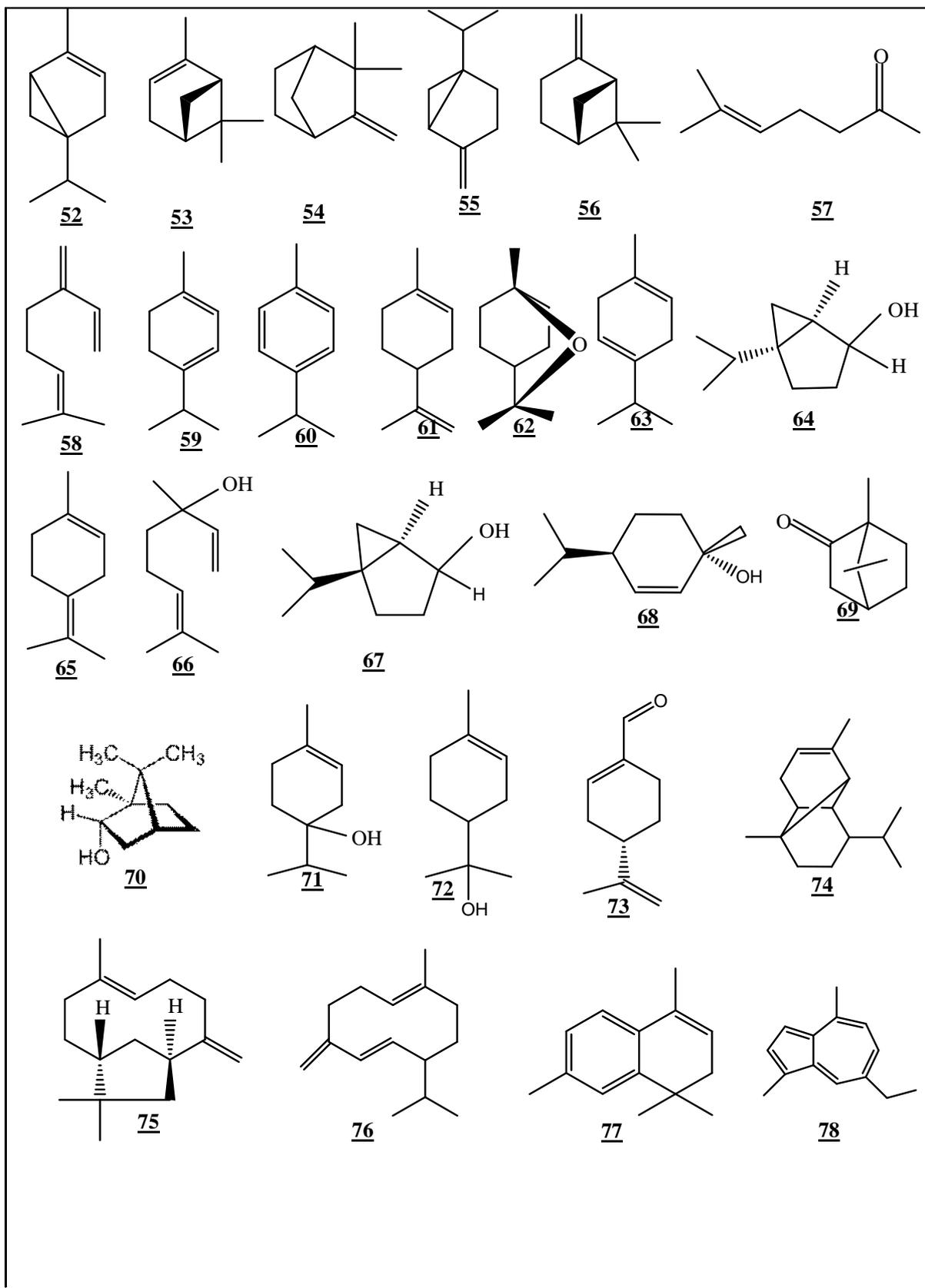


Figure.30. Composés identifiés dans l'HE d'*Artemisia absinthium*.



Les composés majoritaires obtenus dans l'huile étudiée sont : le camphre (44,93 %), terpinène-4-ol (9,44%), chamazullène (7,72%).

L'ensemble de ces composés constitue plus de trois quarts de la totalité de l'huile. Cependant, d'autres constituants présentant un pourcentage moins important ont été identifiés, à savoir l' α -pinène (2,34%), le camphène (2,87%), et le β -pinène(0,14%).

Globalement, les constituants de notre huile peuvent être repartis en quatre classes de composés terpéniques.

- ✓ Les hydrocarbures (30,04 %) mono et sesquiterpènes.
- ✓ Les cétones (45,18 %)
- ✓ Les alcools (17,21 %)
- ✓ Les aldéhydes (0,424%)

Cette huile est à majorité mono terpénique, avec une prépondérance de composés oxygénés (63,01%).

Les sesquiterpènes représentent (11,48%) de la composition totale de l'huile et sont essentiellement représenté par le chamazulène (7,72%). Ce dernier est rapporté dans toutes les huiles de l'absinthe et leur confère la coloration bleue verdâtre.

De nombreuses études concernant le profil chimique des absinthes des différentes régions du monde ont été menées [138].

Le tableau suivant rassemble les teneurs en principaux constituants dont la teneur dépasse 6% pour les différentes régions.

Tableau.13. Les principaux constituants de l'huile essentielle d'absinthe de différentes régions.

N° d'écha	Origine	Sabinène	Myrcène	1,8-cinéole	Linalol + α -thujone	β -thujone	Epoxy-ocimène	Acétate de sab curcumèn	Butanoate de Neryle	Neryl-3-méthyl butanoate	Huile essentielle	
1	Estonie	21,2	25,6	-	-	-	-	-	-	-	0,8	
2	Estonie	-	-	-	-	-	59,7	23,6	-	-	0,4	
3	Estonie	25,3	29,9	-	-	-	-	-	-	-	0,5	
4	Estonie	-	-	-	-	64,6	-	18,2	-	-	0,8	
5	Estonie	-	-	-	-	-	-	70,5	-	-	1,1	
6	France	-	-	-	10,3	-	-	-	11,3	13,9	7,3	0,7
	France	-	-	-	-	-	48,9	-	-	-	-	1,6
	France	-	-	-	-	-	-	84,5	-	-	-	-
7	Hongrie	18,1	17,7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
8	Belgique	9,3	-	-	-	-	-	18,6	-	-	-	0,7
9	Russie	9,3	-	-	-	-	22,1	-	-	-	-	0,3
	Serbie-I	-	-	-	-	-	-	31,5	-	7,9	9,1	0,3
	Serbie-II	-	-	-	12,7	7,6	-	7,9	-	7,0	6,6	1,2
10	Grèce	-	-	-	-	38,7	-	-	-	-	-	0,3
11	Ukraine	-	-	-	-	6,3	-	-	7,8	-	7,3	0,4
12	Scotland	30,1	18,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8
13	Armenia	-	-	-	6,1	-	-	34,2	-	-	-	0,1
14	Moldova	9,2	38,9	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
15	Latvia	-	-	-	-	6,2	-	23,6	9,0	-	-	0,4
16	Lituanie	-	-	-	-	-	-	13,7	6,3	-	-	0,2
17	Italie	-	-	-	-	12,3	-	11,4	7,1	-	-	0,2
	Italie	-	-	-	-	-	56,6	-	-	-	-	0,8
	Italie	6,3	-	-	-	40,6	23,1	-	-	-	-	0,5
	Italie	-	-	-	-	-	33,7	-	-	-	-	0,5
19	Espagne	-	-	18,0	10,9	-6,2	-	-	-	-	-	0,1
20	Allemagne	-	-	-	-	-	-	-	8,9	-	-	0,3

L'examen de ces données révèle une grande variabilité à l'intérieur de l'espèce, et l'existence de plusieurs chémotypes.

Un chémotype à thujone :

- Estonie (64,6%).
- Grèce (38,7%).
- Italie (40,6%).

Un chémotype à epoxyocimène :



- Estonie (59,7%).
- France (48,9%).
- Russie (22,1%).
- Italie (56,6%), (23,1%) ou (33,7%).

Un chémotype à acétate de sabinyle :

- Estonie (70,5%).
- France (84,5%).

Il existe d'autres chémotypes à codominance de deux à plusieurs constituants.

Ce qui est frappant dans ces résultats, c'est l'absence ou la faible teneur en camphre qui domine notre huile. Bien qu'elle soit exempte de thujone, la présence du camphre en grande quantité n'est pas non plus apprécié, en effet, il a été démontré qu'il partage une hépatotoxicité avec la thujone et l' α -pinène.

Enfin, nous récapitulons les résultats concernant la composition chimique des trois huiles dans le tableau suivant :

Tableau.14. Composition chimique de trois huiles essentielles d'*Artemisia*.



Composants	Espèces		
	<i>A.herba alba</i>	<i>A.campestris</i>	<i>A.absinthuim</i>
Alcools (%)			
Menth-2-èn-ol cis	1.470	-	0.488
Trans pinocarvéol	1.316	-	
Endo bornèol	3.395	-	1.307
Terpinène-4-ol	1.512	-	9.449
Alpha terpinèol + cis pipéritol	1.385	-	-
Trans pipéritol	0.621	-	-
Linalol	-	-	3.702
Cis sabinène hydrate	-	-	1.092
Trans sabinène hydrate	-	-	0.294
Alpha terpinèol	-	-	0.886
Spathuléol	-	2.034	-
épi alpha muurolol	-	0.624	-
alpha cadinol	-	1.253	-
Pourcentage globale	9.7	3,91	17.21
Aldéhydes (%)			
Aldéhyde pèrillique	-	-	0.424
Terpinal	4.045		
Pourcentage globale	4.045	-	0.424
Cétones (%)			
Béta thujone	1.252	-	-
Chrysanthenone	13.56	-	-
Camphre	29.14	-	44.935
Pinocarvone	2.523	-	-
Carvone	0.376	-	-
Pipèritone	0.565	-	-
Z-jasmone	0.516	-	-
6-méthyl-hept-5-en-2-one	-	-	0.252
Pourcentage globale	47.41	-	45.18
Esters (%)			
Acétate d'isobornyle	0.877	-	-
Acétate néryle	-	0.157	-
Acétate de géranyle	-	0.415	-
Pourcentage globale	0.877	0.57	-
Oxides (%)			
1,8-Cinéole	11.652	-	0.19
Oxyde de caryophyllène	-	0.31	-
Pourcentage globale	11.652	0.31	0.19

Composants	Espèces		
	<i>A.herba alba</i>	<i>A.campestris</i>	<i>A.absinthuim</i>



Monoterpènes (%)			
Santolinatriène	0.516	-	-
Alpha pinène	1.169	8.473	2.347
Camphène	3.759	-	2.875
Sabinène	0.289	0.746	0.193
Béta pinène	0.294	4.162	0.144
Alpha terpinène	0.33	-	2.225
Gama terpinène	0.422	1.439	4.161
Para cymène	0.868	0.834	1.350
Limonène	-	2.641	0.542
Myrcène	-	12.441	3.409
Béta phellandrène	-	0.547	-
(Z)-béta-ocimène	-	13.698	-
(E)-béta-ocimène	-	2.382	-
Alpha thujène	-	-	0.349
Terpinolène	-	0.239	0.967
Pourcentage globale	07.64	47.65	18.56
Sesquiterpènes (%)			
Germacrène-D	1.072	5.462	2.089
Bicyclogermacrène	0.330	2.056	-
Davanone	5.261	-	-
Béta caryophyllène	-	0.704	0.257
Spathulénol	-	2.034	-
Gamma curcumène	-	0.885	-
Delta cadinène	-	0.603	-
Epi alpha muurolol	-	0.624	-
Chamazulène	-	-	7.727
Alpha copaène	-	-	0.26
Nor calacorène	-	-	1,151
Pourcentage globale	6.66	12.37	11.48

III -2.ACTIVITES BIOLOGIQUES



III .2.1.Activité antibactérienne

L'apparition des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques a suscité la recherche de nouveaux agents antimicrobiens. Les huiles essentielles sont des candidats potentiels pour accomplir le rôle d'antimicrobiens.

En effet, grâce à leur grande variabilité chimique, elles empêchent le décodage de la plus part des germes pathogènes, et diminuent ainsi le risque de développement de résistance [139]. Dans cet objectif, nous nous sommes proposés de tester nos échantillons contre une série de souches variées, incluent des souches résistantes.

Nous avons procédé en premier lieu, à mettre en évidence la résistance des souches à étudier aux différents antibiotiques, les résultats sont rassemblés dans le tableau 15.

Tableau.15. Résultats des antibiogrammes.

ATB	D en mm					
	AMP/AMOX	AMX+ACDCLA	VAN	CHLO	IMIP	CEFALO
<i>E.coli</i>	<6	22	-	-	22	-
<i>S. aureus</i>	30	-	27	-		24
<i>Serratia.sp</i>	<6	<6	<6	-	26	28
<i>Klebsiella* Pneumoneae</i>	<6	18	-	27	28	<6
<i>Enterobacter.sp**</i>	<6	12	-	10	25	<6
<i>Sterptocoque. sp</i>	24	27	17	24	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	<6	24	-	21	-	-
<i>Klebsiella* pneumoneae</i>	<6	16	-	28	24	<6
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<6	16	-	28	24	<6

La plupart des souches sont donc bien résistantes aux antibiotiques connus notamment à l'AMP/AMOX et à la cefatoxine.



Les résultats des tests d'inhibition des même souches bactériennes par les différentes huiles essentielles sont regroupés dans le tableau 16.

Tableau.16. Résultats des aromatogrammes (Diamètres d'inhibition en mm).

Souches	HE AHA	HE ABS	HE AC	HE TV
<i>E.coli</i>	17.66±0.577	15.66±1.547	<6	27±1.000
<i>S. aureus</i>	36±0.000	16.33±0.577	<6	40.33±0.577
<i>Serratia.sp</i>	13±0.000	15±0.000	<6	29.33±1.154
<i>Klebsiella* Pneumoneae</i>	15.33±0.577	16±1.000	<6	21±1.000
<i>Enterobacter.sp**</i>	22.66±1.547	15.66±0.577	<6	26.33±1.154
<i>Sterptocoque sp</i>	20.66±1.547	20.66±0.577	7.66±0.577	34±1.000
<i>Heamophilus influenzae</i>	28±0.000	24±0.000	<6	39.33±0.577
<i>Klebsiella* pneumoneae</i>	17.33±0.000	19.66±0.577	<6	26±1.000
<i>Pseudomenas Aeriginosa</i>	<6	<6	<6	<6

HE: huile essentielle, **AHA:** *Artemisia herba alba*, **ABS:** *Artemisia absinthuim*, **AC:** *Artemisia campestris*, **TV:** *Thymus vulgaris*.

Les valeurs indiquées sont les moyennes des duplicata de chaque test. L'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, très réputée pour son grand pouvoir antibactérien [115] a été prise comme modèle.

Les résultats obtenus (Tableau 16) ont révélé que :

L'huile essentielle d'*A.compestris* n'a manifesté aucune activité antibactérienne contre toutes les souches de la collection (D<6mm). Ce qui concorde en partie avec les résultats rapportés par **Akrout** [65], cependant leur huile a montré une activité non négligeable vis-à-vis d' *E.coli* (D = 18mm).

Notons bien que les deux huiles sont composées essentiellement d'hydrocarbures mono terpéniques (47.65 %) pour notre huile et (88.6 %) pour celle d'*Akrout et al.*

Cette passivité de l'huile essentielle d'*A.campestris*, même vis-à-vis d'*E.coli* qui est une bactérie très susceptible, est vraisemblablement due à sa composition chimique caractérisée par un très faible taux en produits oxygénés (0.31%).

Ils est également à noter, que du point de vue physico-chimique, cette huile présente un aspect plus visqueux que les autres huiles, ce qui empêche en partie sa diffusion dans le milieu. Le diamètre d'inhibition peut être également affecté par la volatilité des hydrocarbures monoterpéniques. Qui ne présentent que de faibles interactions moléculaires.

L'huile essentielle d'*A. herba alba* s'est montrée active contre toutes les souches testées mis-à-part la souche *Pseudomonas. aeruginosa*. cette dernière a manifesté une résistance contre toutes les huiles testées, même contre celle de *Thymus vulgaris*.

Ce résultat a été confirmé dans plusieurs travaux [132, 139].

La résistance des souches *Pseudomonas.a* aux huiles essentielles n'est pas surprenante ; cette bactérie possède une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de sa membrane. Cette dernière est composée de lipopolysaccharides qui forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes [132].

La sensibilité des microorganismes est variée pour l'huile de l'armoise blanche, les diamètres d'inhibition sont compris entre 13 et 36 mm.



Heamophilus

Enterobacter.sp

Serratia.sp

Figure.31. : Photos montrant l'effet de l'HE d'*A. herba alba* sur : *Heamophilus*, *Enterobacter.sp*, *Serratia.sp* (D = halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose).

Selon le diamètre d'inhibition, la sensibilité des souches aux huiles essentielles est classée comme suit[140].



- $D < 8\text{mm}$: souche résistante.
- $9\text{mm} < D < 14\text{mm}$: souche sensible.
- $15\text{mm} < D < 19\text{mm}$: souche très sensible.
- $D > 20$: souche extrêmement sensible.

Selon cette classification, et par rapport à l'huile d'armoise blanche, les souches *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* et *Haemophilus* sont des souches extrêmement sensibles, la souche *Serratia* est sensible et le reste des souches sont très sensibles.

Les résultats se rapportant à l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* sont également encourageants. Cette huile a inhibé toutes les souches avec des diamètres variés. Son activité antibactérienne est importante puisque les diamètres d'inhibition sont supérieurs à 15mm. Notons que l'inhibition est maximale pour la souche *Haemophilus* avec une valeur moyenne de 24mm, pour *Streptocoque*, elle est de 20mm.

Le reste des souches ont presque des sensibilités identiques ($15 < D < 19\text{mm}$) et sont donc très sensibles.

Les deux huiles ; celle d'*Artemisia herba alba* et celle d'*Artemisia absinthium* présentent une similarité quant à leurs activités antibactériennes. Ceci est prévisible vu la similarité de leurs profils chimiques; dominés essentiellement par le camphre (29,14%) et (44,93%) respectivement.

Le taux en produits oxygénés est également du même ordre, rappelons qu'il est de (47,93%) pour *Artemisia herba alba* et (45,18%) pour *Artemisia absinthium*.

Staphylococcus.a est connue par sa grande susceptibilité aux monoterpènes oxygénés [141,142], tels que le camphre, la thujone et la chrysanthénone. L'armoise blanche, par son taux élevé en cétones (47,41%), a donné pour cette souche, le plus grand diamètre d'inhibition (36mm) et se voit donc plus active que l'huile d'*absinthium* présentant un taux également élevé en cétones (45,18%).

A première vue, ce résultat semble être contradictoire, mais la prise en compte des taux des aldéhydes dans les deux huiles (4,045%) dans l'armoise blanche et (0,42%) dans l'absinthe lève toute contradiction.



En effet, d'après la classification de **Dorman** [71], les aldéhydes sont plus actifs que les cétones.

La codominance du camphre et du 1,8-cinéole est également un facteur important dans l'activité de l'huile essentielle de l'armoise blanche. En effet d'autre huiles d'*Artemisia*, riches ces deux composants ont manifesté un grand pouvoir antibactérien in vitro [143].

D'autre part, **Felice et al.**, [144], ont conclu que le camphre et ses dérivés peuvent être considérés comme étant les constituants antimicrobiens de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinius articulata*.

Les alcools, tels que le 4-terpinéol, l'endobornéol, le linalol qui sont présents dans les deux huiles avec des taux appréciables, sont connus par leur fort pouvoir antibactérien, du fait de leur grande solubilité dans l'eau, ce qui leur confère une haute habilité à pénétrer les parois des cellules bactériennes et fongiques [145].

Par ailleurs, les esters, tels que l'acétate d'isobornyle dans l'armoise blanche (0,877%) et l'acétate de géranyle dans l'absinthe peuvent participer à l'effet antibactérien et antifongique enregistré. En effet l'espèce *Thymus longicaulis* étudiée par **Boukhriss et al.**, [145] dominée par l'acétate d'isogéranyl a manifesté une activité antibactérienne considérable.

Cependant, il est difficile d'attribuer l'activité d'un mélange complexe à un composant particulier. Les composants majoritaires ou des composants présents sous forme de traces, pourraient donner lieu à l'effet antibactérien observé. Les effets synergiques ou antagonistes doivent être pris en considérations.

Il est connu que les huiles essentielles testées pour leur activité antibactérienne, montrent un effet plus prononcé contre les bactéries à Gram- a été attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration des composés hydrophobes dans la membrane des cellules cibles [71]. Mais, la tendance ici pour les deux huiles, semble être indifférente à la nature de la coloration Gram+ ou Gram-, cette indifférence est probablement due à la présence des alcools.

L'analyse des résultats de l'antibiogramme a bien montré que les deux souches *Klebsiella* qui sont des souches BLSE (souches résistantes à toutes les bêta-lactamines sauf à l'imipénème et à la céfoxitine) et la souche



Enterobacter qui est une souche de type CHN (céfalosporine haut niveau) ont témoigné la même vulnérabilité vis-à-vis des deux huiles (herba alba, et absinthe) avec des diamètres de 15 et 22mm respectivement traduisant ainsi une très grande sensibilité selon la classification de **Moreira** [140].

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, pris comme modèle a montré une activité très importante contre toutes les souches testées avec des diamètres allant de (21mm, 26mm), pour *Klebsiella* jusqu'à 40,33mm pour *Staphylococcus.a*. Les souches résistantes sont donc extrêmement sensibles à cette huile. Cette grande activité est attribuée à la forte teneur des composés phénoliques dans les huiles essentielles du genre *Thymus*.

Le carvacrol connu par son activité antibactérienne élevée [146], domine généralement la composition de ces huiles.

Des données plus précises sur les propriétés antibactériennes de nos huiles ont été obtenues par la détermination des valeurs des CMI (concentration minimale inhibitrice) qui sont rassemblées dans le tableau 17.

Tableau.17. Les CMI en mg/ml.

CMI mg/ml	AHA	ABS	TV
Souhes			
<i>E.coli</i>	1.78	3.83	0.1
<i>Serratia</i>	1.78	5.75	0.2
<i>Klaebssiella</i>	7.12	7.67	0.41
<i>Enterobacter</i>	7.12	7.67	0.41

L'huile essentielle d'armoise blanche a exhibé des concentrations plus faibles que celle de l'absinthe, et les plus faibles paramètres ont été obtenus pour les souches *E.coli* et *serratia* avec des valeur de CMI de 1,78 mg/ml. Les plus forte valeurs de 7,12mg/ml sont associés aux souches résistantes type BLSE.

Les très faibles paramètres (0,1 – 0,41) mg/ml de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* traduisant sa très grande activité antibactérienne.

Les performances antibactériennes et antifongiques mises en évidence pour les espèces d'*Artemisia* aurassiennes méritent d'être étudiées avec plus de détails afin d'envisager des perspectives d'application de ces essences.

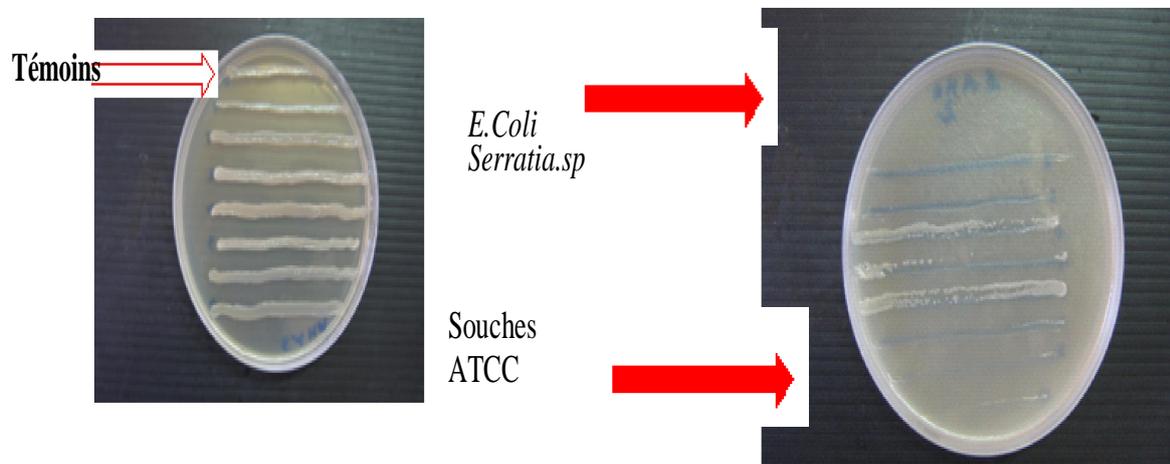


Figure. 32. : Photos montrant les CMI de l'HE d'*A. herba alba* des bactéries : *E.coli*, *Serratia.sp* (CMI= 1,78mg /ml).

III -2.2Activité antifongique



Après 48 heures d’incubation à 30° C, nous observons comparativement au témoin de contrôle de croissance des levures, des diamètres d’inhibition qui varient en fonction de l’huile essentielle testée.

L’analyse des résultats illustrés dans le Tableau-18-, à montré que les deux souches *Candida*, sont sensibles aux huiles essentielles d’armoise blanche et d’absinthe, cependant les deux levures ont montré une résistance à l’huile essentielle d’*Artemisia campestris*. Ce ci peut être attribué au profil chimique de cette huile et sa nature visqueuse.

Tableau.18. : Variation des diamètres d’inhibition des levures en fonction d’huiles essentielles (en mm).

HE (10µl) Levures	AHA	ABS	AC	TV
<i>Candida albicans</i>	29.66 ± 0.577	22.33 ± 0.577	06.00± 00.00	40 ± 1.154
<i>Candida kefyre</i>	30.33 ± 0.577	18.66 ± 1.154	06.00±00.00	42 ±0.050

Les huiles d’*A. absinthium*, et d’*A.herba alba* ont exercé une forte activité fongicide contre les deux levures *Candida albicans*, et *Candida kefyre* avec des diamètres d’inhibition de 29, 66 mm pour *C.albicans*, et 30, 33 mm pour *C.kefyre* pour l’armoise blanche , et 22,23 et 18,66 mm pour l’absinthe .

Sur l’ensemble de toutes les huiles testées l’huile essentielle de *Thymus vulgaris* est plus active avec un diamètre d’inhibition de 40, et 42 mm. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux trouvés pour l’activité antibactérienne.

En ce qui concerne les champignons, l’analyse des résultats mentionnés dans les tableaux 18 à 21, relatifs à la croissance des mycéliennes chez les dermatophytes soumis à l’action des huiles essentielles à des concentrations différentes, a permis de constater que l’huile essentielle de *Thymus vulgaris* exerce une forte action fongicide sur les deux champignons *Microsporuim canis*, et *Aspergillus niger* avec des valeurs de CMI de 1% et 4% respectivement. Tandis que l’*A.niger* a révélé une résistance aux huiles essentielles d’*Artemisia*.



M.canis a montré une sensibilité variable aux différentes huiles testées. Les données expérimentales traduites sous forme de courbes sont résumées par la Figure .33.

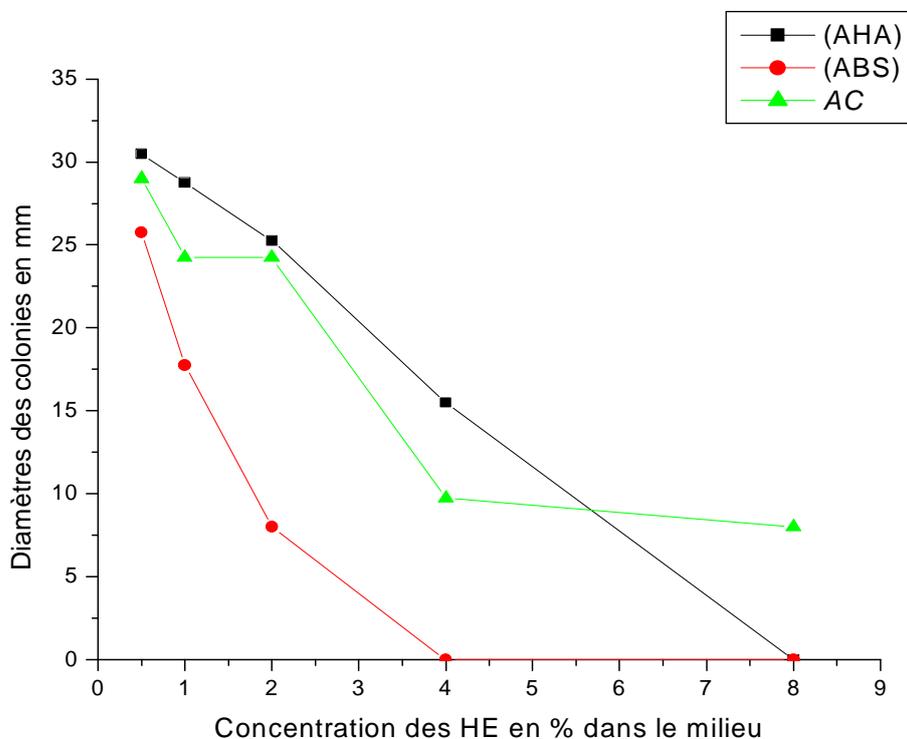
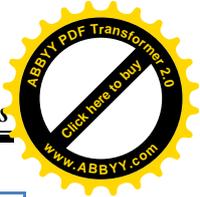
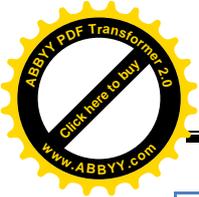


Figure.33. Diminution des diamètres des colonies de *Microsporium canis* en fonction des concentrations des huiles dans le milieu.

L'analyse des résultats montre que la souche *Microsporium canis* testée, est sensible à toutes les huiles essentielles selon une relation dose-réponse. En effet les données expérimentales montrent qu'il y a une diminution progressive des diamètres des colonies au fur et à mesure que les concentrations en huiles essentielles augmentent dans les milieux de cultures.

Tableau.19. Variation des diamètres (en mm) des colonies en fonction de la concentration en huile essentielle d'*Artemisia herba alba* en mm.



HE en %	Témoin	8	4	2	1	0.5
Souches						
<i>Microsporium canis</i>	35.75±0.50	0±0.00	15.5±0.816	25.25±0.50	28.75±0.957	30.50±1.00
<i>Aspergillus niger</i>	50.00±0.00	45.00±0.50	49.00±0.00	50.00±0.00	50.000	50.000

Pour toutes les huiles essentielles testées la courbe de sensibilité présente une allure régulièrement décroissante illustrant la sensibilité dose-réponse de la souche testée. La comparaison des performances des huiles testées sur la base des valeurs des CMI montre que l’huile essentielle d’*A.campestris* (CMI > 8%) est moins active que les huiles essentielles d’*A.absinthium*, et d’*A.herba alba* qui présentent des valeurs de CMI de 4% et 8% respectivement.

Nous notons que sur l’ensemble des huiles testées, l’huile essentielle de *Thymus vulgaris* est plus active avec une valeur de CMI de 1%.

Tableau.20.: Variation des diamètres des colonies (en mm), en fonction de la concentration en huile essentielle d’*Artemisia Absinthium*

HE en %	Témoin	8	4	2	1	0.5
Souches						
<i>Microsporium canis</i>	34.75±0.500	0±0.00	0±0.00	8.00±0/816	17.75±1.258	25.75±1.500
<i>Aspergillus niger</i>	50.00±00	50.00±0.00	50.00±0.00	50.00±0.00	50.00±0.00	50.00.00

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature montre qu’ils sont meilleurs que ceux **Lopes-Lutz** de [60] qui a testé l’huile essentielle d’*A.absinthium* chémotype(acétate de trans sabinyle) sur la souche *M.canis*, cette étude a montré que l’huile essentielle de cette espèce est plus active sur le germe *Staphylococcus* que sur le champignon *M.canis* (D = 28mm). Il est important de noter que notre huile essentielle testée est de chémotype camphre. C’est aussi le cas de **Mighiri et al**, [122] qui ont



testé l’huile essentielle d’*A.herba alba* sur la levure *Candida albicans*, il a mentionné un diamètre d’inhibition de 14.3 mm tandis que notre huile a donné un diamètre de 29.66 mm.

L’huile essentielle d’*A.campestris* n’a manifesté qu’une très faible activité fongicide très faible par rapport aux autres huiles testées. Ce ci peut être attribué au fait que sa teneur en composés oxygénés est relativement faible [65]. Par contre les deux huiles essentielles d’*A.absinthuim*, et d’*A.herba alba* ont présenté une forte activité fongicide, cette activité pourrait être attribuée au camphre qui est le produit majoritaire dans le profil chimique des deux huiles, et par la richesse en composés oxygénés. Nos résultats corroborent ceux d’autres recherches qui ont démontré que l’activité antifongique de certains composés terpéniques, et phénoliques sont parmi les composés des huiles essentielles les plus actifs contre les champignons [79].

Certains auteurs ont suggéré que le mécanisme de la toxicité des phénols envers les champignons est basé sur l’inactivation des enzymes fongiques qui contiennent le groupement SH dans leur site actif. Les terpènes phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amines et hydroxylamine des protéines membranaires microbiennes provoquant l’altération de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires [147, 148].

Tableau.21. Variation des diamètres des colonies en fonction de la concentration en huile essentielle d’*Artemisia campestris* en mm.

HE en %	Témoin	8	4	2	1	0.5
Souches						
<i>Microsporium canis</i>	35.75±0.50	08±0.00	9.75±0.50	24.25±0.50	24.25±0.50	29.00±1.50
<i>Aspergillus niger</i>	50.00±0.00	50.00±0.50	50.00±0.00	50.00±0.00	50.000	50.000

--	--	--

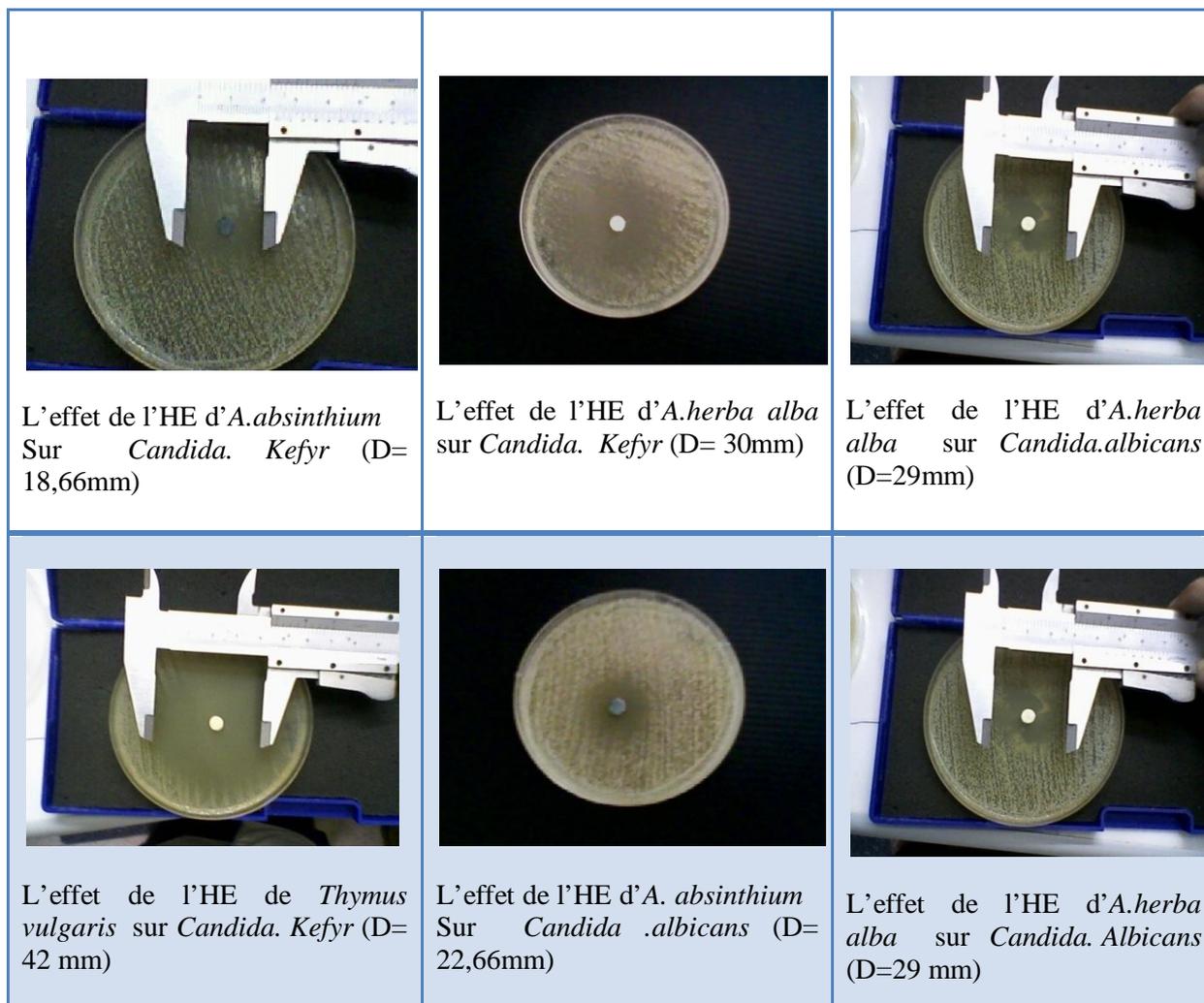


Figure.34. : Photos montrant l'effet des l'HE d'*A. herba alba* , et d'*A. absinthium* sur : *Candida. albicans* et *Candida. kefy* (D = halo d'inhibition obtenu par la méthode de diffusion sur gélose)

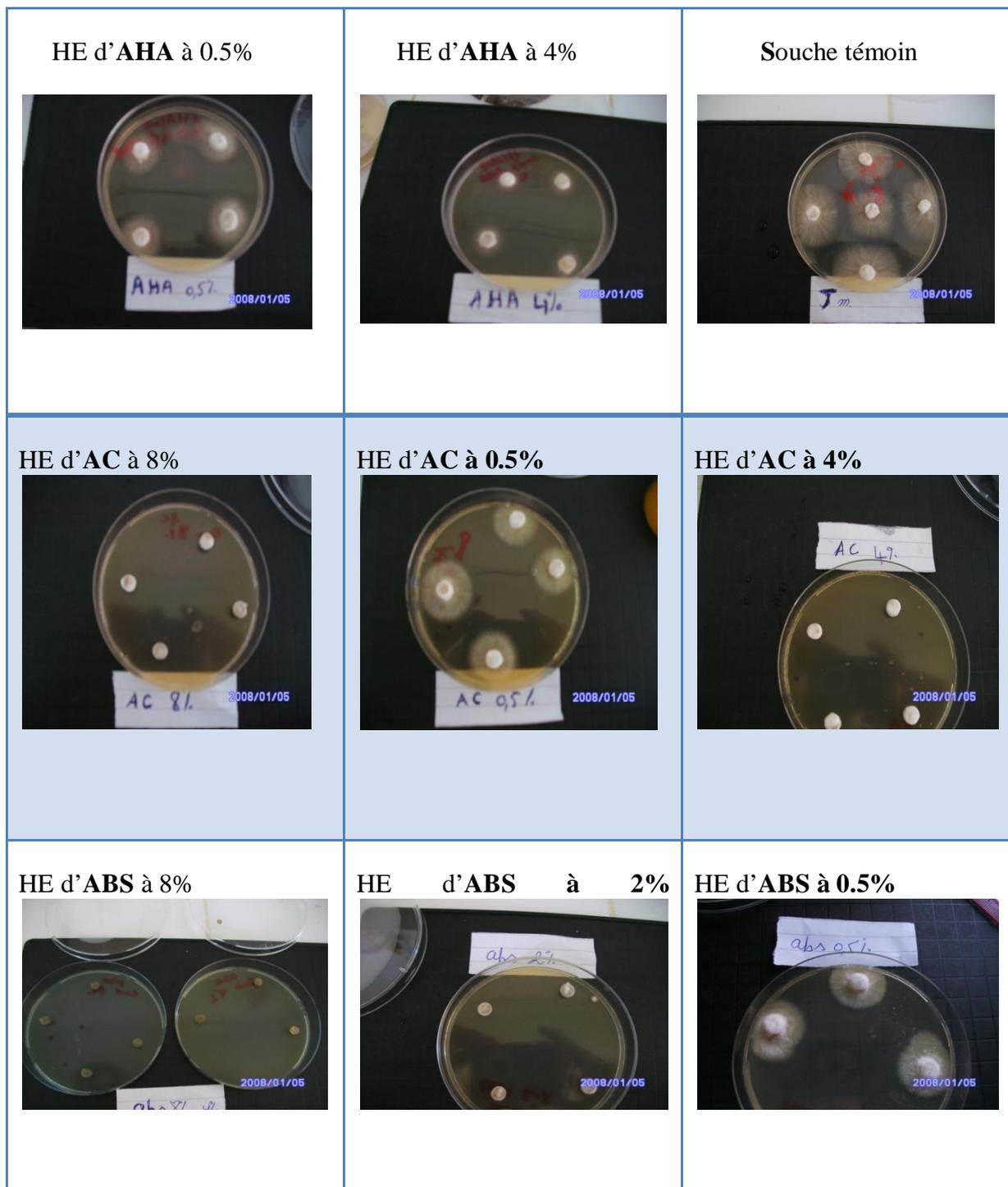


Figure.35. : Photos montrant l'effet des HE d'*A. herba alba*, d'*Artemisia. Absinthium*, et d'*Artemisia campestris* sur : *Microsporium.cannis*(méthode de diffusion en milieu solide)

III -3.ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Dans cette partie de notre travail nous avons procédé à l'évaluation du pouvoir antioxydant des trois huiles essentielles d'*Artemisia* avec deux techniques différentes :

Le test de blanchissement du β -carotène.

Le test de piégeage du radical libre DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrasyl)

III -3.1.Test de blanchissement du β -carotène

L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres, ces radicaux vont oxyder le β -carotène, entraînant la disparition de sa couleur (blanchissement). Le pouvoir antioxydant des huiles essentielles est déterminé en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du β -carotène (disparition de sa couleur) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique, la présence des antioxydants (huiles essentielles, BHT) pourrait neutraliser les radicaux libres produits par l'oxydation de l'acide linoléique et donc inhibe l'oxydation du β -carotène.

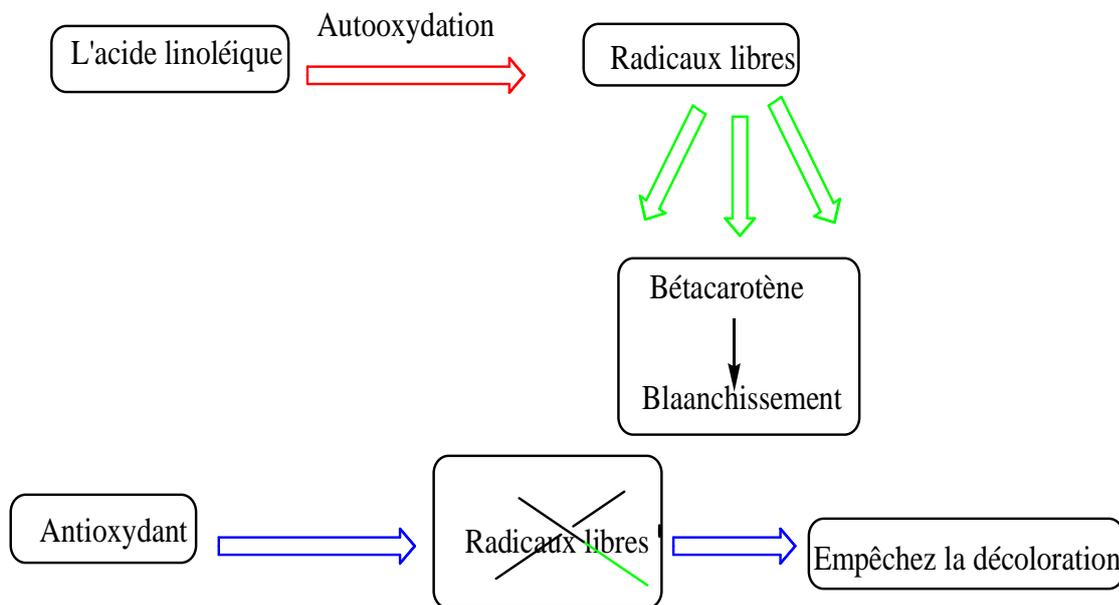
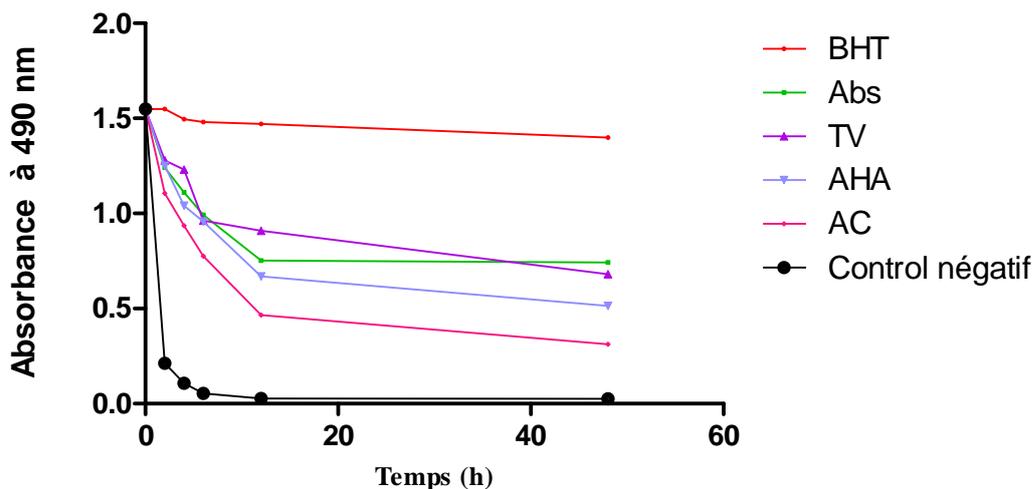


Figure.36. Test de blanchissement du béta-carotène.

La cinétique de blanchissement du β -carotène en présence et en absence des huiles essentielles, d'antioxydant standard (BHT) et les activités antioxydants relatives(AAR) sont représentées dans la figure .30.



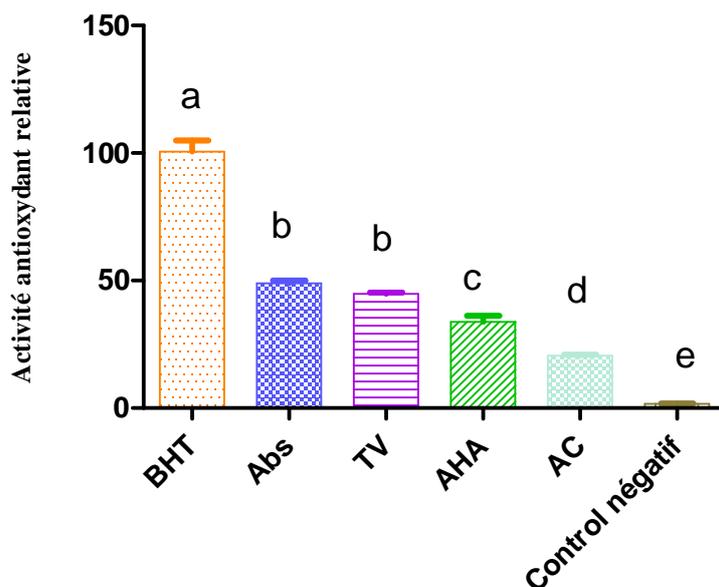
BHT:hydroxytoluène butylé, **ABS**: *Artemisia absinthium*, **TV**: *Thymus vulgaris*
AHA : *Artemisia herba alba*, **AC** : *Artemisia campestris*.

Figure.37. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490nm en présence des huiles essentielles, les antioxydants standard et le contrôle négatif (chaque valeur présente la moyenne de trois essais).

Les résultats montrent que l'antioxydant standard, et les huiles essentielles testées inhibent d'une manière significative ($p < 0.001$) l'oxydation couplée de l'acide linoléique et le β -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation.

Les huiles essentielles : d'*Artemisia absinthium* et *Thymus vulgaris* montrent les plus grandes activités inhibitrices avec des AAR de : 46.87% et 44.83% respectivement, ces deux huiles ne présentent pas une différence significative dans leur activité ($p < 0.05$), mais cette activité reste significativement inférieure à celle du BHT (100%) utilisé comme contrôle positif.

Une activité antioxydante intermédiaire a été obtenue avec l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* (33.84%) mais significativement supérieure à celle de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* (18%).



BHT:hydroxytoluène butylé, **ABS**: *Artemisia absinthium*, **TV**: *Thymus vulgaris*
AHA : *Artemisia herba alba*, **AC** : *Artemisia campestris*.

Figure.38. Activité antioxydante relative des huiles essentielles et du BHT et le contrôle négatif

Les barres avec les lettres différentes indiquent des activités significativement différentes ($p < 0.05$).

L'aptitude des huiles essentielles à inhiber la peroxydation des lipides, évaluée par la technique de décoloration du β -carotène, à montré que l'oxydation de l'acide linoléique a été inhibée par les quatre huiles. L'huile d'*Artemisia absinthium* montre la plus grande activité mais elle reste significativement inférieure ($p < 0.001$) à celle du BHT. Cette activité peut être attribuée à sa richesse en composés oxygénés (Camphre).

Lopes-Lutz [60] a évalué l'activité antioxydante d'*Artemisia absinthium* chémotype (acétate de trans sabinyle), par les deux techniques DPPH et β -carotène et il n'a reporté des activités antioxydante relative de 15%. De son côté, **Mgihri** a rapporté des activités très faibles pour ses échantillons d'*Artemisia herba alba* (différents chémotypes). Ils a attribué ses résultats à la faible teneur en composés non phénoliques [122]. Toutefois **Lopes-Lutz** a attribue l'activité antioxydante faible de l'huile d'*Artemisia absinthium* à la présence de quelques composés non phénoliques tels que le 1,8-cinéole, l' α -pinène, β -pinène, le terpinèn-4-ol et le P-cimène[60].

III -3.2. Test DPPH

L'activité anti radicalaire des huiles essentielles d'*Artemisia* vis-à-vis du radical DPPH à été suivie spectrophotométriquement à 517 nm, en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par le changement de couleur : du violet au jaune (figure.39.)

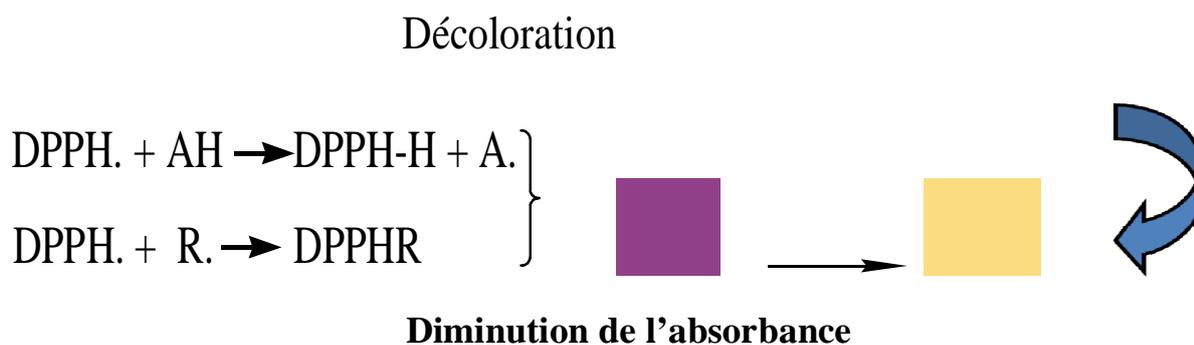
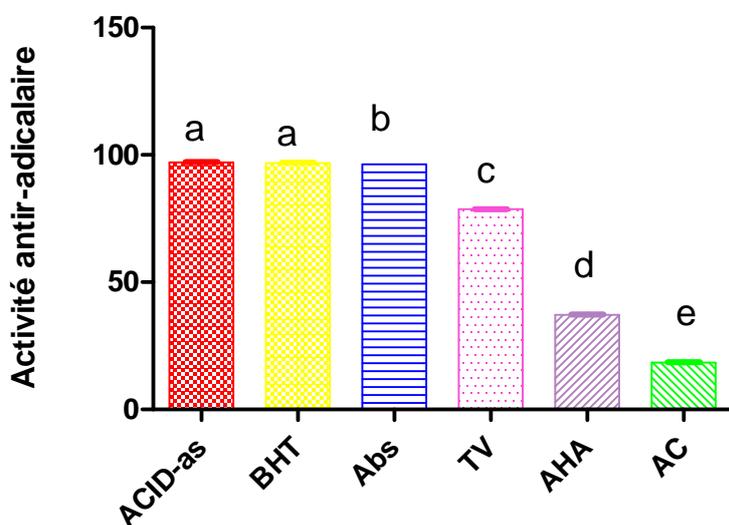


Figure.39. Décoloration du DPPH

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité anti radicalaire (Figure.39.).



ACID-as : acide ascorbique, **BHT**: hydroxytoluène butylé, **ABS**: *Artemisia absinthium*, **TV**: *Thymus vulgaris* **AHA** : *Artemisia herba alba*, **AC** : *Artemisia campestris*.

Figure.40. Activité antioxydante des huiles essentielles.



L'huile essentielle d'*A. absinthium* a témoigné l'activité antiradicalaire la plus élevée (80%) suivie par l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (78%), et *A. herba alba* (37%). L'huile essentielle d'*A. compestris* est dotée de l'activité anti-radicalaire la plus faible (18%).

Les résultats de l'activité anti-radicalaire de l'huile essentielle d'*A. campestris* sont en accord avec ceux obtenus par **Akrout**, qui a montré que l'échantillon tunisien est doté d'une faible activité anti-radicalaire moins importante que l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*.

La faible activité anti-radicalaire enregistrée pour notre huile essentielle d'*Artemisia compestris* est analogue à celle rapportée pour l'échantillon Tunisien [65]

En ce qui concerne l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, cette huile a montré un puissant pouvoir anti-radicalaire (78%), cette activité est due aux composés phénoliques. En effet l'étude comparative sur la capacité de réduction du radical DPPH par les différents chémotypes a montré que les chémotypes phénoliques ont témoigné d'une activité antioxydante plus forte que les chémotypes non phénoliques [146].

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire doit être interprétée avec précaution du fait que l'absorbance du DPPH• à 515-520 nm diminue sous l'action de la lumière, de l'oxygène, en fonction du pH et le type du solvant additionne à l'antioxydant. La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres. Des effets synergiques mais aussi antagonistes ont été observés dans des solutions modèles qui contiennent plusieurs composés fonctionnels (mélange complexe ou poly moléculaires) à activité anti-radicalaire [149].

Les composés phénoliques présentent un fort potentiel anti-radicalaire, d'une part en raison de leur capacité à céder un atome d'hydrogène (proton et électron) à un radical libre et d'autre part grâce à la bonne stabilité du radical aryloxy ainsi formé [149, 150].

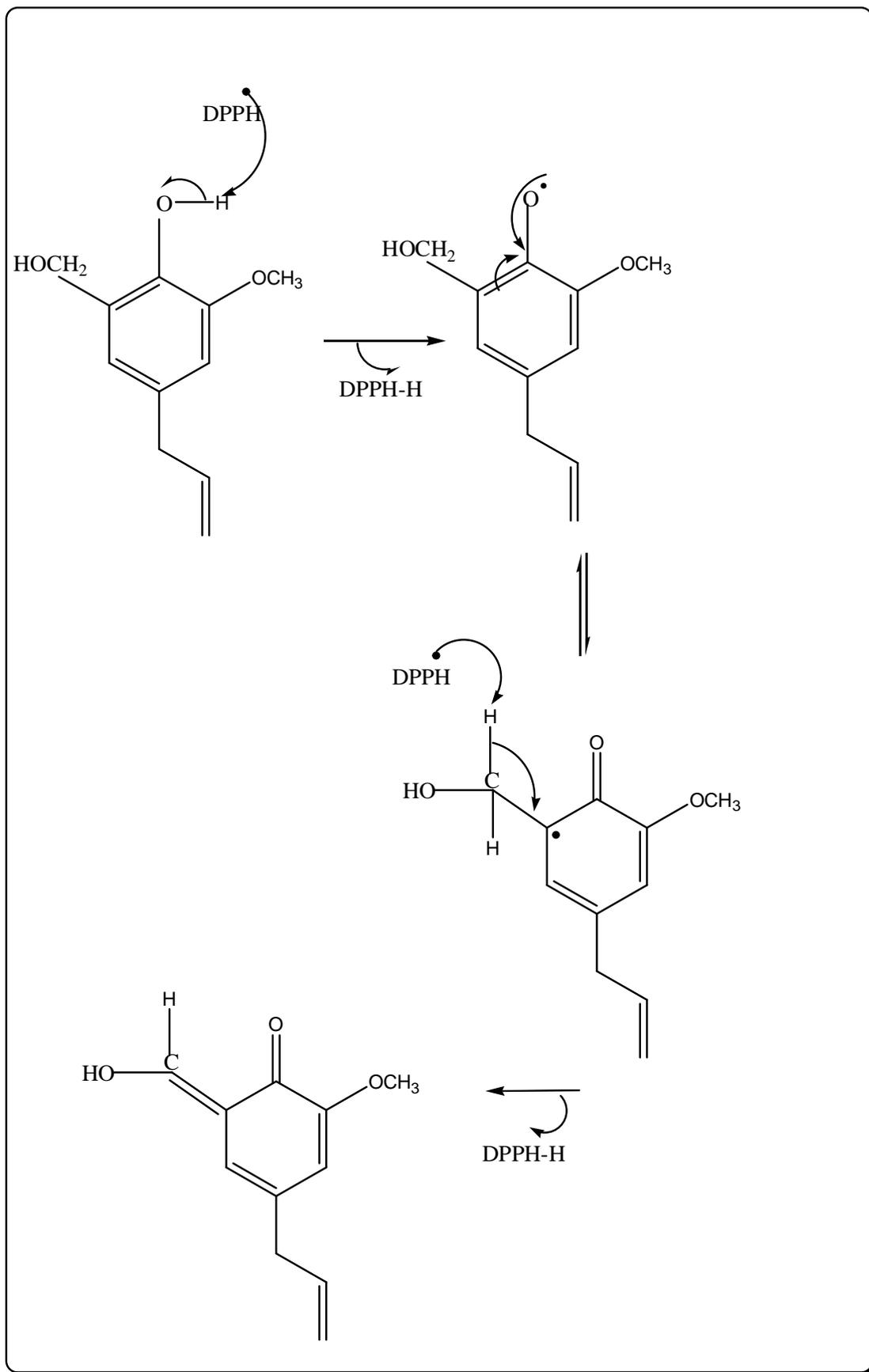


Figure.41. Réactions proposées par Brand-Williams et al, de l'eugénol avec le DPPH

La comparaison des résultats fournis par les deux méthodes a permis de tracer l'histogramme suivant :

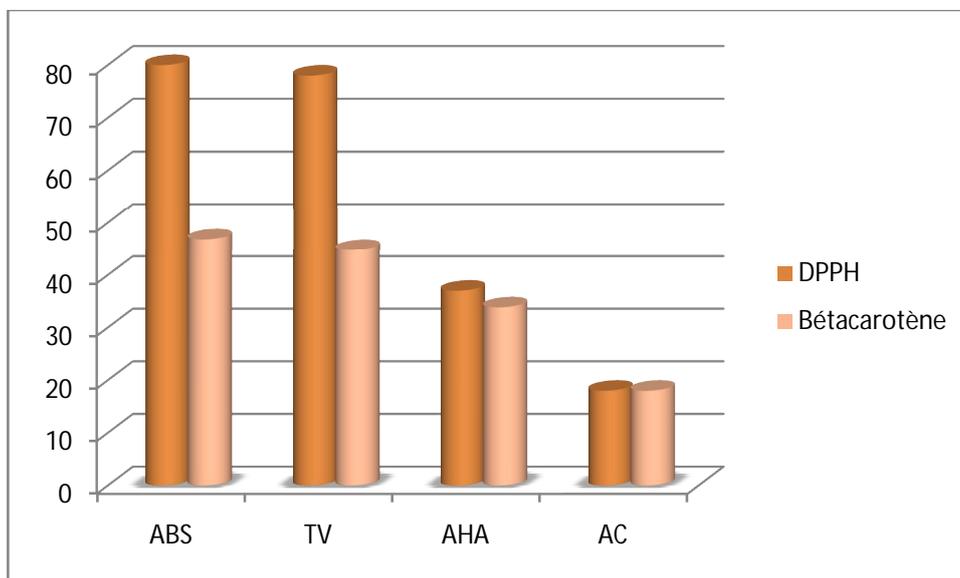


Figure.42. Comparaison de l'activité anti-oxydante évaluée par les deux techniques : DPPH, et le teste de blanchissement de β -carotène.

L'examen de cet histogramme permet de constater que les ordres d'activité sont les mêmes pour les deux méthodes.

BHT>ABS>TV>AHA>AC

Si pour l'antioxydant standard (BHT), l'huile essentielle d'*Artemisia compestris*, et l'huile d'*Artemisia herba alba*, l'activité est du même ordre, on not pour l'huile d'*Artemisia absinthuim* et *Thymus vulgaris* des valeurs plus élevées par la méthode du DPPH.

L'acide ascorbique est une molécule polaire possédant un pouvoir antioxydant puissant évalué avec la technique de DPPH, mais cette molécule est dotée d'une faible activité antioxydante en système β -carotène/acide linoléique, ce ci a été expliqué comme suit :

Le système de blanchissement de β -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, et les antioxydants apolaires marquent des propriétés



antioxydantes puissantes, grâce à leurs localisations (centrés au sein de l'interface lipide-eau), assurant ainsi la prévention de l'oxydation du β -carotène [151].

L'attribution de l'activité antioxydante à un composé dans un extrait de plante est inutile, puisque le pouvoir antioxydant pourrait être le résultat d'une action synergétique.



Conclusion et Perspectives



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le présent travail a pour but, l'étude chimique des trois huiles essentielles du genre *Artemisia* (*Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris*, et *Artemisia absinthium*), ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques.

D'une manière générale, nous avons constaté que les huiles étudiées, sont composées d'un grand nombre de constituants chimiques connus et inconnus possèdent des concentrations rarement rencontrées dans la littérature.

Nous avons pu constater que l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* est de chémotype Camphre, tandis que l'espèce Tunisienne est à chémotype β -thujone, et α -thujone.

Cette étude nous a permis également d'établir la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium*, son profil chimique est dominé par la présence du camphre avec un pourcentage de 44,93%.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles, a été évaluée sur des germes très pathogènes et résistants aux antibiotiques tel que : les souches type BLSE, CHN. L'activité antifongique de ces huiles a été évaluée contre des levures et champignons par la méthode de diffusion en milieu solide, et dilution en milieu gélosé pour la détermination des CMI.

Les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba*, *Artemisia absinthium*, ont témoigné une activité antimicrobienne intéressante sur la plupart des souches testées, à l'exception des souches : *Pseudomonas aeruginosa*, et *Aspergillus niger*.

L'huile essentielle d'*Artemisia campestris* n'a manifesté aucune activité antibactérienne contre toutes les souches de la collection.

L'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant le test du DPPH, et la technique de blanchissement du β -carotène, a révélé une réponse antioxydante variable d'un échantillon à un autre.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus in-vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et source naturelle biologiquement active.



Des essais complémentaires de toxicités seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidences.

La présence de nouveaux sesquiterpènes avec un taux élevé dans l'essence *d'Artemisia campestris* (12,15%) incite à l'exploration approfondie de cette espèce.



Références bibliographiques

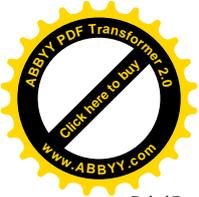


BIBLIOGRAPHIE

- [1] Bruneton, J., Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales, **1999**, 3.Ed. Tec & Doc, Paris.
- [2] Lardy, J.; Haberkorne, V., *Kinesither Rev*, **2007**, *61*, 14-7.
- [3] Brada, M.; Bezzina, M.; Marlier, M.; Carlier, A.; Lognay, G., *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **2007**, *11*(1), 3-7.
- [4] Fellah, S.; Romdhane, M.; Abderraba, M., *J.Soc.Alger.Chim*, **2006**, *16* (2), 193-202.
- [5] Falmini, G.; Tebano, M.; Ciano, P. L.; Ceccarini, L.; Ricci, S. A., Longo, I., *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1143*, 36-40.
- [6] Bendahou, M.; Muselli, A., Grignon. Grignon- Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J. M.; Bernardini, A.F.; Costa, J., *Food chemistry*, **2008**, *106*, 132-139.
- [7] Bocevaska, M.; Sovova, H., *The journal of supercritical fluids*, **2007**, *40*, 360-367.
- [8] Gaspar, F.; Santos, S.; King, M.B., *Ind. Eng. Chem. Res*, **2000**, *39*(12), 4603-4608.
- [9] Rouessac, F. ; Rouessac, A., *Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes*, **1995**, 2.Ed. Masson, Paris.
- [10] Cavalli, J.-F., thèse de doctorat "Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar", **2002**, Université de Corse Pascal Paoli.
- [11] Koffi, M.K. ; Kanko, K. ; Ramiarantsoa, H. ; Figueredo, G. ; Chalchat, J.-C. ; Bessière, J.-M.; Koukoua, G.; N'Guessan, Y. T., *C. R. Chimie*, **2004**, *7*, 997-1002.
- [12] El Kalamouni, C., thèse de doctorat " Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées ", **2010**, Université de Toulouse .
- [13] Montes-Belmont, R; Carvajal, M., *Journal of food Prot*, **1998**, *61*, 616-619.
- [14] Rhayour, K., thèse de doctorat " Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* ", **2002**, Université de Mohamed Ben Abdallah Fès.
- [15] Lamendin, H.; Toscano, G.; Requirand, P., *EMC-Dentisterie*, **2004**, *1*, 179-192.
- [16] Garnier, M ; Delamarre, V., *Dictionnaire des termes de médecine*, **2002**, 27 Ed. Maloine, Paris.
- [17] Perraud, R.; Krach, E., *Guide pratique de toxicologie*, **2004**, 1.Ed. De Boeck, Bruxelles.
- [18] Luauté, J.-P.; Saladini, O. ; Benyaya, J., *Annales Médico Psychologiques*, **2005**, *163*, 497-501.
- [19] Mathelier-Fusade, P., *Revue française d'allergologie*, **2009**, *49*, 366-370.
- [20] Martini, M.-C., *Cosmétologie et Dermatologie esthétiques*, **2006**, *50*, 120-E-10.



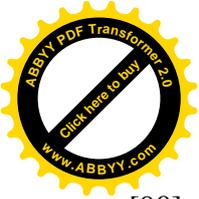
- [21] Quezel, P. ; Santa, S., Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, **1963**, Vol. 2. CNRS, Paris.
- [22] Ravid, U.; Putievsky, E.; Ikan, R., *Flavor and Fragrance Journal*, **1992**, 7(1), 49-52.
- [23] Cedarleaf, J.D.; Welch, B.L; Brotherson, J.D., *J. Range Manag*, **1983**, 36, 492-494.
- [24] Jaime, A.; Teixeira, D. S., *African Journal of Biotechnology*, **2004**, 3(12), 706-720.
- [25] Liu, Q.; Yang, Z.Y., Deng, Z.B.; Sa, G.H.; Wang, X.J., *Acta Botanica*, **1988**, 30,223-225.
- [26] Satar, S., *Pharmazie*, **1986**, 41,819-820.
- [27] Herz, W., Asteraceae-chemical review, **1977**, In V.H. Heywood, J.B. Harborne and B.L. Turner, (Eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*, Academic Press, London, vol. 11, chapter 11, pp. 567-576.
- [28] Abou El-Hamd, H.M.; El sayed, M. A.; Hegazy, M.E.; Helaly, S. E.; Esmail, A.M.; Mohamed, S. N., *Records of natural products*, **2010**, 4(1), 1-25.
- [29] Herout, V.; Sorm, F., *Coll.Czech.Chem.Commun.*, **1954**, 19, 792-797.
- [30] Belenovskaja, L., Artemisia: the flavonoids and their systematic value, **1996**, In D.J.N. Hind and H.J. Beentje (Ed.), *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference*, Royal Botanic Gardens, Kew, vol. I, chapter 18, pp. 253-259.
- [31] Herz, W.; Bhat, S.V.; Santhanam, P.S.; *Phytochemistry*, **1970**, 9, 891-894.
- [32] Chen, Y.L.; Huang, H.C.; Weng, Y.I.; Yu, Y.J.; Lee, Y.T., *Cardiovascular Research*, **1994**, 28(11), 1679-1685.
- [33] Maffei, M., *Biochem. Syst. Ecol.*, **1996**, 24, 53-64.
- [34] Maffei, M., *Biochem. Syst. Ecol*, **1994**, 22, 711-728.
- [35] Wagner, H., Pharmaceutical and economic uses of the Compositae, , In V.H. Heywood, J.B. Harborne and B.L. Turner, (Eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*, Academic Press, London, vol. 11, chapter 14, pp. 412-428.
- [36] Facknath, S.; Kawol, D., *Insect Science & its Application*, **1993**, 14, 571-574.
- [37] Yun, K.W.; Kil, B.S.; Han, D.M., *J. Chem. Ecol.*, **1996**, 19, 2757-2766.
- [38] Deans, S.G.; Svoboda, K.P, *J. Hort. Sci*, **1988**, 63, 135-140.
- [39] Tantaoui-Elaraki, A.; Ferhout, F.; Errifi, A., *J. Essent. Oil Res.*, **1993**, 5, 535-545.
- [40] Deans, S.G.; Svoboda, K.P., *J. Hort. Sci.*, **1989**, 64, 205-210.
- [41] Gilani, A. H.; Janbaz, K.H.; Lateef, A.; Zman, M., *Phytotherapy Research*, **1994**, 83(3), 161-165.
- [42] Bergebendorff, O.; Sterner, O., *Planta Med.*, **1995**, 61, 370-371.
- [43] Alkhazraji, S.M.; Alshamaony, L.A.; Twaij, H.A.A., *Journal of Ethnopharmacology.*, **1993**, 40(3), 163-166.



- [44] Hayakawa, Y.; Hayashi, T.; Niiya, K.; Sakuragawa, N., *Blood Coagulation & Fibrinolysis.*, **1995**, 6(7), 643-649.
- [45] Guardia, T. ; Guzman, J.A.; Pestchanker, M.J.; Guerriero E.; Giordano, O.S., *Journal of Nut. Prod.*, **1994**, 57, 507-509.
- [46] Lucienne, D., *Les Plantes Médicinales de l'Algérie*, **2007**, Berti.
- [47] Marrif, H. I.; Ali, B.H.; Hassan, K.M., *Journal of Ethnopharmacology*, **1995 (a)**, 49, 51-55.
- [48] Marrif, H.I.; Ali, B.H.; Hassan, KM., *J of Ethnopharmacol.* **1995 (b)**, 49, 51-55.
- [49] Bellakhdar, H., *Pharmacopée marocaine traditionnelle*, **1997**, Ed. IBIS Press, Paris.
- [50] Salido, S.; Valenzuela. L.R.; Altarejos. J.; Nogueras. M.; Sanchez, A.; Cano. E., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2004**, 32, 265-277.
- [51] Feuerstein, I.; Müller, D.; Hobert, K.; Danin, A.; Segal, R., *Phytochemistry*, **1986**, 25, 2343-2347.
- [52] Hudaib, M.; Aburjai, T., *J. Essent. Oil. Res.*, **2006**, 18, 301-304.
- [53] Nezhadali, A.; Akbarpour, M.; Zarrabi Shirvan, B., *E-Journal of Chemistry*, **2008**, 5 (3), 557-561.
- [54] Haouari, M.; Ferchichi, A., *Molecules*, **2009**, 14, 1585-1594.
- [55] Dob, T.; Benabdelkader, T., *J. Essent. Oil. Res.*, **2006**, 18, 685-690.
- [56] Ait Youssef, M., *Plantes Médicinales de Kabylie*, **2006**, IBIS, Paris.
- [57] Vican, P., *Encyclopédie des plantes médicinales*, **2001**, 2.Ed. Larousse, Paris.
- [58] Basta, O.; Tzakou, O.; Couladis. M.; Pavlovic, M., *J. Essent. Oil Res.*, **2007**, 19, 316-318.
- [59] Lamarti, A.; Sadki, I.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Carde, J.-P., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **1996**, 135, 25-43.
- [60] Lopes-Lutz, D.; Aviano, S. D.; Aviano, S. C.; Kolodziejczyk, P., *Phytochemistry*, **2008**, 69, 1732-1738.
- [61] Chiasson, H.; Bélanger, A.; Bostanian, N.; Vincent, C.; Poliquin, A., *Journal of Economic Entomology.*, **2001**, 94 (1), 167-171.
- [62] Mucciarelli, M.; Caramiello, R.; Maffei, M., *Flavour and Fragrance Journal.*, **1995**, 10, 25-32.
- [63] Juteau, F.; Jerkovfc, I.; Masotti, V.; Mitas, M.; Mastelle, J.; Besslerer, J.M.; Viano, J., *Planta Med.*, **2003**, 69, 158-161.
- [64] Aniya, Y.; Shimabukuro, M.; Shimoji, M.; Kohatsu.; Gyamfi, A.M.; Miyagi, C.; Kuni, D.; Takayama, F.; Egashira, T., *Biol. Pharm. Bull.*, **2000**, 23(3), 309-312.
- [65] Akrouf, A.; El Jani, H.; Amouri, S.; Neffati, M., *Recent Research in Science and Technology*, **2010**, 2 (1), 29-39.
- [66] Khalilov, M.L.; Paramonov, E.A.; Khalilova, A.Z.; Odinkov, N.V.; Muldashev, A.A.; Baltaev, U.A.; Dzhemilev, U.M., *Chemistry of Natural Compounds*, **2001**, 37(4), 399-342.



- [67] Juteau, F.; Masoti, V.; Bessière, J.-M.; Viano, J., *Biochemical Systematic and Ecology*, **2002**, *30*, 1065-1070.
- [68] Akrou, A.; Chemli, R.; Simmonds, M.; Kite, G.; Hammami, M.; Chreif, I., *J. Essent. Oil. Res.*, **2003**, *15*, 333-336.
- [69] Chalchat, J.-C.; Cabassu, P.; Patrick, P.; Petrovic, S.D.; Maksimovic, Z.A.; Gorunovic, M.S., *J. Essent. Oil Res.*, **2003**, *15*, 251-253.
- [70] Akrou, A.; Gonzalez, L. A.; El Jani, H.; Madrid, P.C., *Food and Chemical Toxicology*, **2011**, *49*, 342-347.
- [71] Dorman, H.J.; Deans, S.G., *J. Appl. Microbiol*, **2000**, *88*(2), 308-316.
- [72] Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R., Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents, *In Microbiology*, **1988**, 469-509.
- [73] Kurita, N.; Koike, S., *Agric. Bil. Chem*, **1982**, *46*, 159-165.
- [74] Naigre, R.; Kalick, P.; Roques, C.; Roux, I.; Michel, G., *Planta Medica*, **1996**, *62*, 275-277.
- [75] Franchomme, P., *Phytomedecine*, **1981**, *1*, 25-47.
- [76] Lec, K.H.; Huang, E.S.; Paguna, J.S.; Geissman, T.A., *Cancer. Research*, **1971**, *31*, 1649-1654.
- [77] Chaumont, J.P.; Léger, D., *Plantes médicinales et Phytothérapie*, **1989**, *2*, 124-128.
- [78] Duraffourd, C.; Lapraz, J.-C., *Traité de phytothérapie clinique*, **2002**, 3. Ed. Masson, Paris.
- [79] Pauli, A., *Medicinal Research Reviews*, **2006**, *26*(2), 223-268.
- [80] Edris, A. E., *Phytotherapy Research*, **2007**, *21*, 308-323.
- [81] Boochird, C.; Flegel, M.W., *Can.J. Microbiol*, **1982**, *28*, 1235-1241.
- [82] Franchomme, P., *Phytomedecine.*, **1981**, *1.*, 25-47.
- [83] Schaechter.; Medoff.; Eisenstein., *Microbiologie et pathologie infectieuse*, **1999**, 2.Ed.de Boeck, Paris.
- [84] Gangoue Pieboji, J., thèse de doctorat " Caractérisation des Béta-lactamines et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales", **2007**, Université de Liège.
- [85] Nauciel, C., *Bactériologie médicale*, **2000**, Masson .Ed.Paris.
- [86] Avril, J.L.; Dabernat, H.; Denis, F.; Monteil, H., *Bactériologie clinique*, **2000**, 3.Ed. Ellipses, Paris.
- [87] Mainil, J., *Ann .Méd. Vét*, **2003**, *147*, 105-126.
- [88] Méric de Bellefon, L.; Legrand, J.-C.; Codden, T.; Carlier, E.; Vanhaeverbeek, M., *Rev. Méd Brux*, **2007**, *28*, 460-463.
- [89] Cavallo, J.-D.; Mérens, A., *Pathologie Biologie*, **2008**, *56*, 300-304.



- [90] Chaabane, A.; Aouam, K.; Boughattas, N.A.; Chakrou, M., *Médecine et maladies infectieuses* **2009**, *39*, 278–287.
- [91] Patrick., *Chimie Pharmaceutique*, **2002**, 2.Ed.de bock.
- [92] Chabasse, D.; Guiguen, C.I.; Contet-Audonneau, N., *Mycologie médicale*, **1999**, 3.Ed. Masson, collection abrégés.
- [93] Chami, F., thèse de doctorat " Evaluation *in vitro* de l'Action Antifongique des Huiles Essentielles d'Origan et de Girofle et de leurs Composés Majoritaires *in vivo* Application dans la Prophylaxie et le Traitement de la *Candidose* Vaginale sur des Modèles de Rat et de Souris Immunodéprimés", **2005**, Université de Mohamed Ben Abdallah Fès.
- [94] Moulinier, C., *Parasitologie et mycologie médicales : élément de morphologie et de biologie*, **2003**, Ed.Emi.
- [95] John, W.S., *Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie*, **2002**, Ed. Flammarion Médecine-Sciences, collection Monographies.
- [96] Raoult, D., *Dictionnaire de maladies infectieuses*, **1998**, Ed. Elsevier, Paris.
- [97] Pibiri, M.-C., thèse de doctorat " Assainissement Microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles", **2006**, Université de Lausanne, EPFL.
- [98] Haddouchi, F.; Benmansour, A., *Les technologies de laboratoire*, **2008**, *8*, 20-27.
- [99] Atta-Ur, R.; Choudhary, M.I., *Bioassay Techniques for Drug Development*, **2001**, Ed. Taylor & Francis, London.
- [100] Amana, E. K., thèse de doctorat " Les anacardiaceae du Togo : Etudes botaniques, écologiques et propriétés antifongiques", **2007**, Université de Lome.
- [101] Eyouen, A.; Alouf, J.; Montagnier, L., *Traité de microbiologie clinique*, **1998**, Ed. Piccin, Padou, Italie.
- [102] Duraffourd, C.; Lapraz, J.-C., *Traité de phytothérapie clinique*, **2002**, 3. Ed. Masson, Paris.
- [103] Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpito, M.G.; Venuti, M.C.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano., *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **2005**, *49*(6), 2474-2478.
- [104] Raoult, D., *Dictionnaire de maladies infectieuses*, **1998**, Ed. Elsevier, Paris.
- [105] Lahlou, M., *Phytotherapy Research*, **2004**, *18*,435-448.
- [106] Mann, C.M.; Markham, J.L., *Journal of applied Microbiology*, **1998**, *84*, 538-544.
- [107] Lens-Lisbonne, C.; Cremieux, A.; Maillard, C.; Balansard ,D., *Journal Pharm Belg*, **1987**, *42*, 297-302.
- [108] Favier, A., *L'actualité chimique*, **2003**, 108-115.



- [109] Soares, A.F., Thèse de doctorat " Effet du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines", **2005**, Université de Lyon.
- [110] Massella, R.; Dib, R.; Vari, R.; File, S.; Giovaninic, C., *Nutr Biochem*, **2005**, *16*, 577-586.
- [111] Koechlin-Ramonatxo, C., *Nutrition clinique et métabolisme*, **2006**, *20*, 165-177.
- [112] Alais, C.; Linden, G., Abrégé de biochimie alimentaire, **2001**, 4.Ed. Masson, Paris.
- [113] Chan, A.C.; Chow, C.K.; Chiu, D., *Proc Soc Exp BiolMed*, **1999**, *82*, 222-274.
- [114] Gate, L.; Paul, J.; Ba, G.N.; Tew, K.D.; Tapiero, H., *Biomed Pharmacother*, **1999**, *53*, 169-80.
- [115] Ré, D.B.; Nafia, I.; Nieoullon, A.; Kerkerain Le Goff, L.; Had-Aissouni, L., *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, **2005**, *24*, 502-509.
- [116] Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B., *Revue de génie industriel*, **2009**, *4*, 25-39.
- [117] Donald, S. M.; Prengler, P. D.; Autolovich, M.; Robards, K., *Food Chem*, **2001**, *73*, 73.
- [118] Burits, M.; Bucar, F., *Phytother. Res*, **2000**, *14*, 323, 328.
- [119] Dapkevicius, A.; Venskutonis, R.; Van Beek, T. A.; Linssen, JPH., *J. Sci Food Agric*, **1998**, *77*, 140-146;
- [120] Obame, L.-C.; Koudou, J.; Chalchat, J.-C.; Bassolé, I.; Edou, P.; Ouattara, S. A.; Traore, S.A., *Scientific Research*, **2007**, *2*(11), 491-495.
- [121] Miller, H.E.; Am, J., *Oil Chem. Soc*, **1971**, *41*, 91.
- [122] Mighri, H.; Hajlaoui, H.; Akrou, A.; Najjaa, H.; Neffati, M.; *Compts Rendus Chimie*, **2010**, *13*, 380-386.
- [123] Koba, K.; Sanda, K.; Raynaud, C.; Nenonene, A.; Millet, J.; Chaumont, J.P., *Ann. Méd. Vét*, **2004**, *148*, 202-206.
- [124] Rasooli, I.; Fakoor, M.H.; Yadegarinia, D.; Gachkar, L.; Allameh, A.; Rezaei, M.B., *International Journal of Food Microbiology*, **2008**, *122*, 135-139.
- [125] Leite de Souza, E.; Edeltrudes de Oliveira, L.; De Luna, K. R., *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **2005**, *48*(2), 245-250.
- [126] Tepe, B.; Sokmen, M.; Akpulat, H.A.; Sokmen, A., *Food Chem*, **2006**, *95*, 200-204.
- [127] Deba, F.; Dang -Xuan, T.; Yasuda, M.; Tawata, S. *Food Control*, **2008**, *19*, 346-352.
- [128] Obame, L.-C.; Koudou, J.; Chalchat, J.-C.; Bassolé, I.; Edou, P.; Ouattara, S. A.; Traore, S.A., *Scientific Research*, **2007**, *2*(11), 491-495.
- [129] Maataoui, B. S.; Hmyene, A.; Hilali, S., *Lebanese Science Journal*, **2006**, *7*, 3-8.
- [130] Akrou, A.; Chelmi, R.; Chreif, I.; Hammami, M., *Flavors and Fragrance Journal*, **2001**, *16*, 337-339.



- [131] Mohammadi, Z.; Bachik, S.; Belkaroube, N., *Les technologies de laboratoire*, **2010**, 5(9), 10-15.
- [132] Zouari, S.; Zouari, N.; Fakhfakh, N.; Bougatef, A.; Ayadi, M.A.; Neffati, M., *Journal of Medicinal Plants Research*, **2010**, 4 (10), 871-880.
- [133] Boukrich, F.; Zouari, S.; Neffati, M.; Abdelly, C.; Liu, K.; Casanova, J.; Tomi, F., *Journal of Essential Oil Research*, **2010**, 22(4), 331-335.
- [134] Bezzal, L.; Mannarinol, A.; Fattarsil, C.; Mikaaail, C.; Aboul, L.; Hadji-Minaglou, F.; Kaloustian, J., *Phytothérapie*, **2010**, 8, 277-281.
- [135] Hendry, E.R.; Worthington, T.; Conway, B.R.; Lambert, P.A., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2009**, 64, 1219-1225.
- [136] Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux.; Carde, J.P., *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **1994**, 133, 100-118.
- [137] Belhattab, R.; Boudjouref, M.; Barroso, J. G.; Pedro, L.P.; Figueirido, A.C., *Advances in Environmental Biology*, **2011**, 5(2), 429-432.
- [138] Orav, A.; Raal, A.; Arak, E.; Müürisepp, M.; Kailas, T., *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem*, **2006**, 55(3), 155-165.
- [139] Billerbeck, V. G., *Phytothérapie*, **2007**, 5, 249-253.
- [140] Moreira, M.R.; Ponce, A.G.; Del Valle, C.E.; Roura, S.I., *LWT*, **2005**, 38, 565-570.
- [141] Boukhriss, M.; Hanachi, M.; Boukhriss, B.; Ouhssine, M.; Satrani, B., *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **2010**, 79, 4-11.
- [142] Neerja, G.; Goldy, S., *International journal of Pharmacy and Bio Sciences*, **2010**, 1, 715-720.
- [143] Botelho, M.A.; Nogueira, N.A.P.; Bastos, G.M.; Fonseca, S. G.C.; Lemos, T.L.G.; Matos, F.J.A.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V.S.; Brito, G.A.C., *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **2007**, 40, 349-356.
- [144] Felice, S.; Francesco, N.; Nelly, A. A.; Maurezio, B.; Werner, H., *Flav. and Fragr. Journal*, 2004, 20 (3), 291-294
- [145] Boukhriss, M.; Hnach, M.; Boukhriss, B.; Ouhssine. M.; Chaouch, A., *Afrique Science*, **2007**, 3(2), 232-242.
- [146] Bouhdid, S.; Skali, S.N.; Idaomar, M.; Zhiri, A.; Baudoux, D.; Amensour, M.; Abrini, J., *African journal of biotechnology*, **2008**, 7(10), 1563-1570 .
- [147] Karbin, S.; Rad, B.A.; Arouiee, H.; Jafarnia, S., *Advences in Enveronmental Biology*, **2009**, 3(33), 219-225.
- [148] El Ajjouri, M.; Satrani, B.; Ghanmi, M.; Aafi, A.; Farah, A.; Rahouti, M.; Amarti, F.; Aberchane, M., *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, **2008**, 12(4), 345-351.



- [149] Popovici, C.; Saykova, I.; Tylkowski, B., *Revue de génie industriel*, **2009**,4, 25-39.
- [150] Josip, M.; Igor , J.; Ivica, B.; Marija, P.-B.; Suzana, B.; Ivana , I.-B.; Vilko, S.; Neven ,Ž.; Krunoslav , B.-K.; Dražen , V.-T.; Norbert ,M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , **2008**, 56(11), 3989-3996.
- [151] Meziti, A., thèse de magister " Activité antioxydante des extrais des grains de *Nigella salivia L* *Etude in Vitro et in vivo*" , **2009**, Université EL-HAJ LAKHDAR Batna.



Annexes



Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Milieu Muller Hinton gélosé : pour un litre

Infusion de viande bovine	0.2 g
Hydrolysate acide de caséine	17.5g
Amidon soluble	1.5g
Agar agar	15.0g

Autoclaver 20 minutes à 115 °C

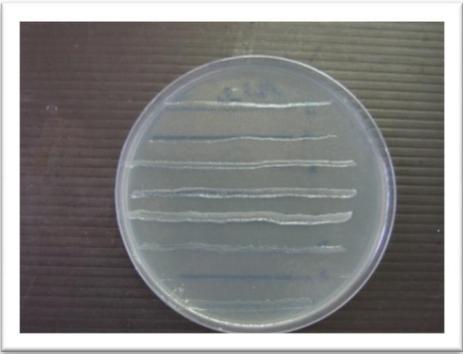
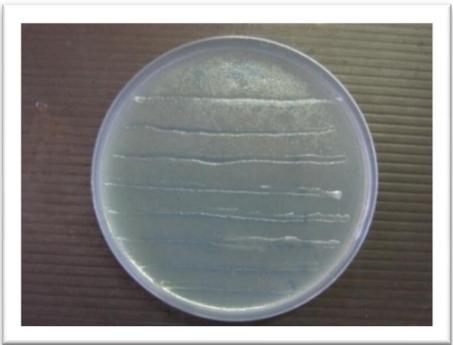
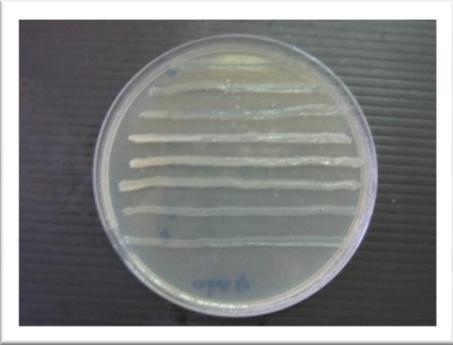
Gélose nutritive : pour un litre

Tryptone	10g
Extrait de viande	05g
NaCl	05g
Agar agar	15g

Autoclaver 20 minutes à 121°C

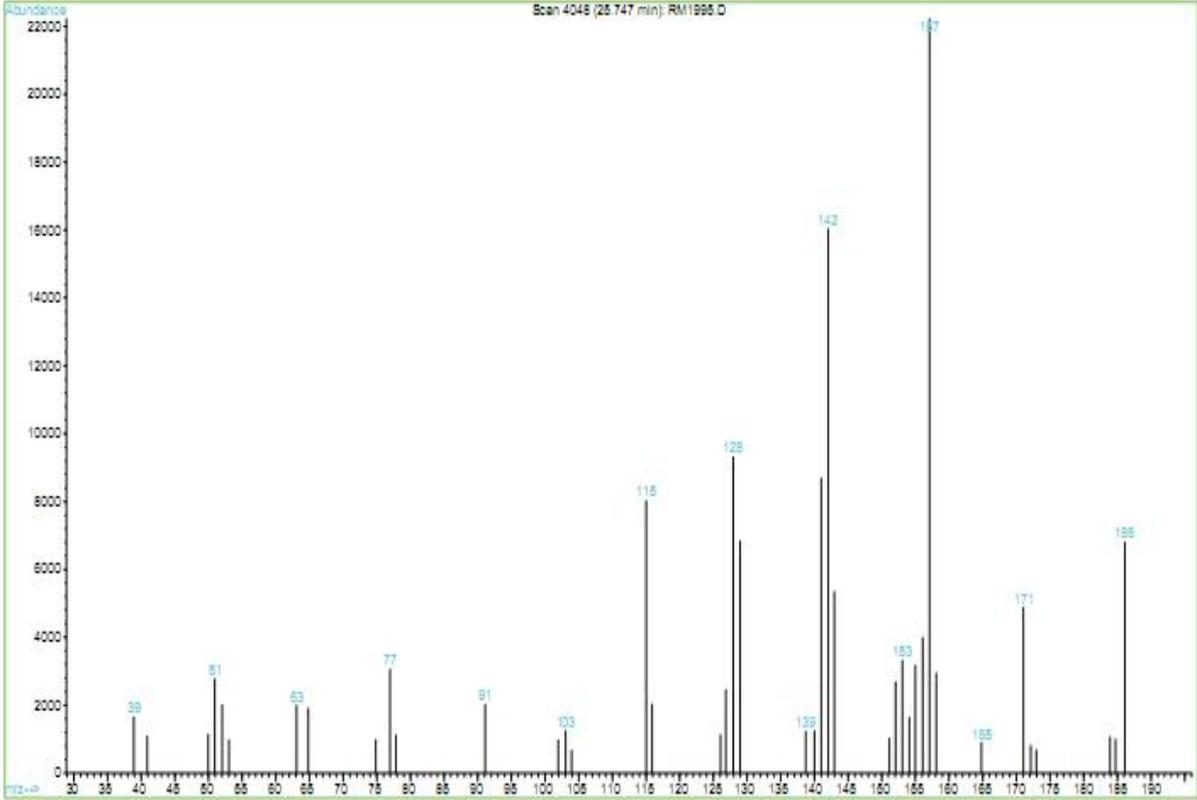


Annexe 2 : Photos montrant la CMI a *Ecoli*, *Serratia* (1, 78mg/ml).



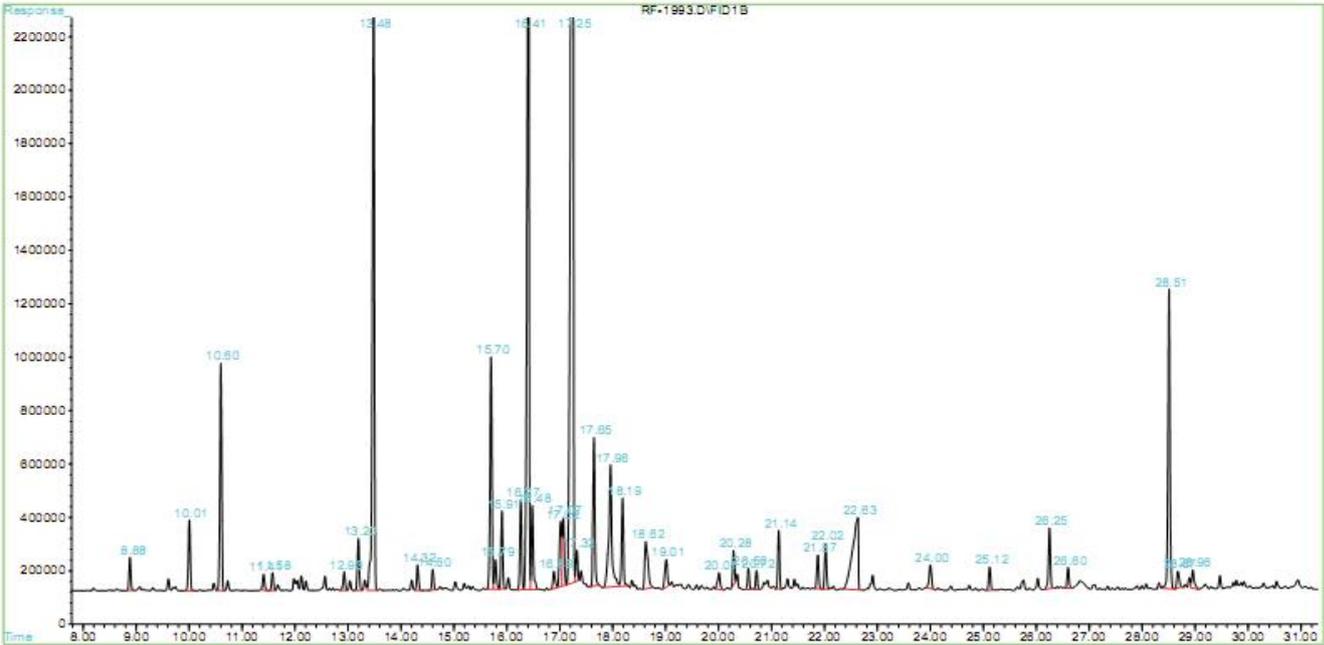


Annexe 3 : Spectre de masse de nor calacorène en CPG/MS.

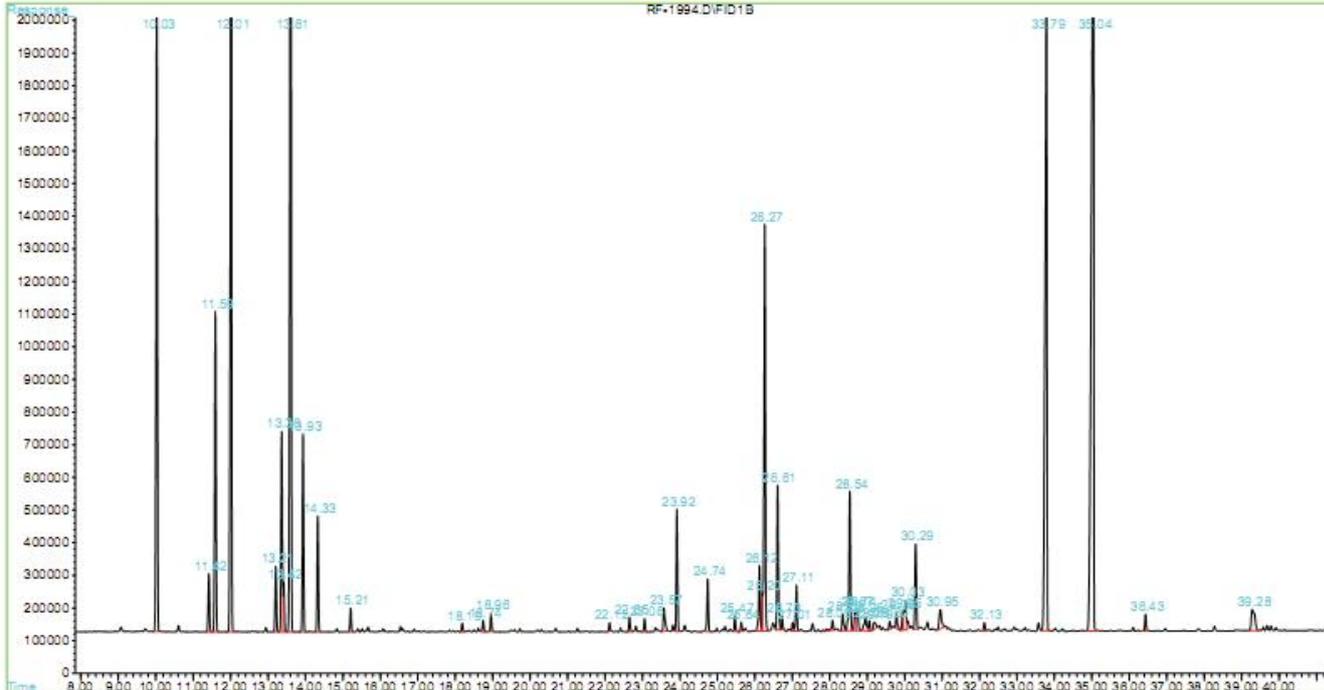




Annexe 4 : Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

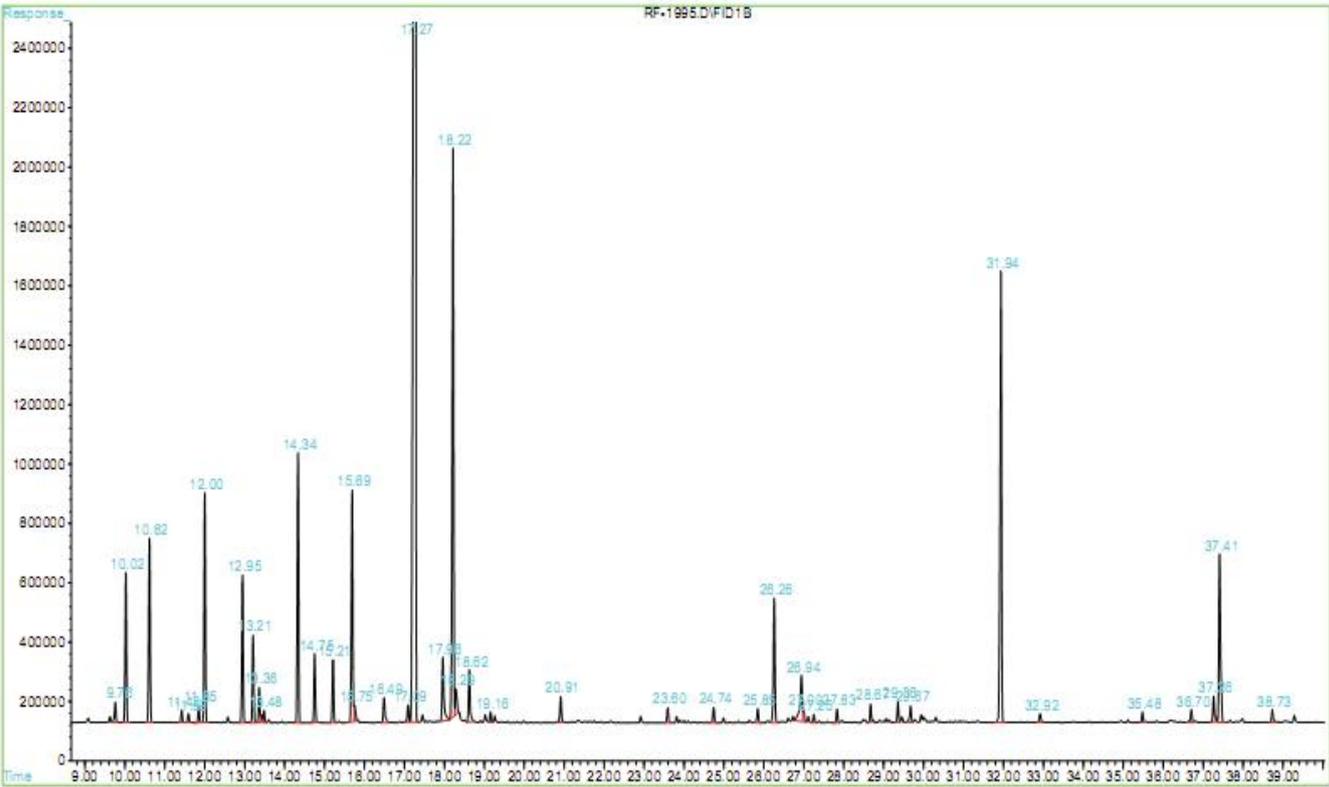


Annexe 5 : Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*





Annexe 6 : Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium*.





RESUME

Les huiles essentielles et leurs constituants ont une longue histoire comme agents antimicrobiens. Le travail que nous avons réalisé a été consacré à l'étude chimique et biologique des trois huiles essentielles du genre *Artemisia*.

Les compositions chimiques des huiles essentielles isolées par hydrodistillation des parties aériennes d'*Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris*, et *Artemisia absinthium*, ont été analysées par CG et CG-SM. Les constituants majeurs de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* sont : le camphre (29,14%), le chrysanthène (13,56%), et le 1,8 cinéole (11,65%). Le (Z)-bêta-ocimène (13,69%) est le composé prédominant de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*. Le profil chimique de l'huile d'*Artemisia absinthium* est dominé par le camphre (44,93%), terpinène-4-ol (9,4%), chamazulène (7,72%), γ -terpinène (4,16%), et le linalole (3,70%).

Cette étude a été conçue aussi pour examiner les activités antimicrobiennes et anti oxydantes des trois huiles essentielles. L'activité antimicrobienne des différentes huiles essentielles a été testée par la méthode de diffusion et détermination des zones d'inhibitions, et en dilution en milieu solide pour la détermination des CMI. Les résultats ont montré que les deux huiles essentielles d'*Artemisia herba alba*, et *Artemisia absinthium* ont une importante activité antimicrobienne vis-à-vis des souches testées. Le pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* est de loin moins important que les deux autres huiles.

En addition, la capacité antioxydante a été évaluée in vitro par deux techniques : la méthode de blanchissement de β -carotène, et la technique du radical DPPH, a montré une forte activité pour ces trois huiles essentielles.

Mots clés : huiles essentielles, *Artemisia herba alba*, *Artemisia absinthium*, *Artemisia campestris*, activité antimicrobienne, activité antioxydante, CMI.



ABSTRACT

Essential oils and their constituents have a long history of application as antimicrobial agents. The present work is dedicated to the study of the chemical and biological of three essential oils of the *Artemisia* genus.

The chemical composition of essential oils extracted by hydrodistillation from the aerial parts of *Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris*, *Artemisia absinthium* was analyzed by GC and GC-MS. The major components of *Artemisia herba alba* oil were camphor (29, 14%), chrysanthenon (13.56%), 1, 8 cinéol (11.65%). (Z)-béta-ocimene (13.69%) was the predominant constituent in the essence of *Artemisia campestris*. Chemical oil of *Artemisia absinthium profiles* is dominated by camphor (44.93%), terpinene-4-ol (9.4%), chamazulene (7.72%), γ -terpinene (4.16%), and linalol (3.70%).

This study was conceived also to examine the antimicrobial and antioxidant activities of three essential oils of *Artemisia*. The antimicrobial activity of different oils was tested using the diffusion method and by determining the inhibition zone, and dilution in solid medium for the determination of the MIC. The results showed that the tow oils: *Artemisia herba alba*, *Artemisa absinthium* oils had great potential of antimicrobial activity against strains testes. The antimicrobial capacity of the essential oil of *Artemisia campestris* is less significant by far than the two other oils. In addition, antioxidant capacity was assessed by two techniques: β -carotene bleaching test, and DPPH method, showed a strong activity for these three essential oils.

Key words: essential oils, *Artemisia herba alba*, *Artemisia absinthium*, *Artemisia campestris*, antimicrobial activity, antioxidant activity, MIC.



ملخص:

تعتبر الزيوت الأساسية و مكوناتها مواد مضادة للجراثيم. و قد كرس هذا العمل للدراسة الكيميائية و البيولوجية للزيوت الأساسية لثلاث نباتات من جنس *Artemisia*.

و قد تم تحليل المكونات الكيميائية للزيوت المستخلصة بطريقة التقطير للأجزاء الهوائية للنباتات الثلاث:

Artemisia absinthium , *Artemisia campestris* , *Artemisia herba alba*

بتقنية

GC/SM فأظهرت النتائج أن المركبات الأساسية في زيت نبات *Artemisia herba alba* هي:

Camphre (29.14 %), Chrysanthénone (13.56 %), 1,8-Céniolé (11.65 %).

المركب (Z)-Beta- ocimène (13.69 %) يمثل العنصر الأكثر وفرة في الزيت الأساسي لنبات *Artemisia campestris* بينما التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لنبات *Artemisia absinthium* غني بالمواد التالية :

Camphre (44.93 %), Terpinène -4-ol (9.4 %), Chamazilène (7.72 %),

γ -terpinène (4.16%), Linalole (3.70 %).

خصصت هذه الدراسة أيضا لاختبار الفعالية المضادة للميكروبات بطريقة انتشار الزيوت في الوسط و تحديد مناطق التنبيت.

فبينت هذه التجارب أن للزيوت الأساسية لنباتتي *Artemisia herba alba*, *Artemisia absinthium*

فعالية جيدة كمواد مضادة للميكروبات بينما زيت *Artemisia campestris* فلم يعط أي فعالية إضافة إلى ذلك تم اختبار الفعالية المضادة للأكسدة بتقنيتي: زوال لون β -carotène و تقنية الجذر الحر . بينت النتائج أن لهذه الزيوت فعالية مضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية :

الزيوت الأساسية *Artemisia absinthium* , *Artemisia campestris* , *Artemisia herba alba*

الفعالية المضادة للميكروبات الفعالية المضادة للأكسدة

β -carotène, DPPH

