

MS/500 - 15/1

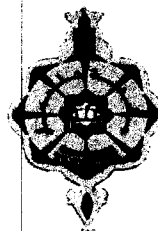
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID - TLEMCEM



Faculté des Sciences - Département de Chimie

Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles & Analyse

(COSNA)



### Mémoire

Inscrit Sous le N° : En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie  
Date le : 06 JAN. 2015  
Code : 548

Option : Chimie Bio-organique & Thérapeutique

Inscrit Sous le N° :  
Date le : 03 JUL. 2012  
Code : 7883

### Thème

## ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES DE *Daucus gracilis* ENDEMIQUE

Présenté par : Melle MOKRI Fatima Zohra

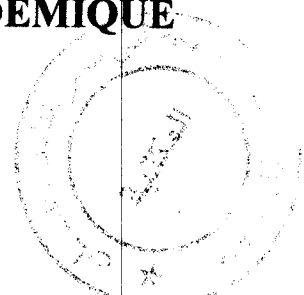
Soutenu le 25/06/2012 devant le jury composé de :

Mr KAJIMA MULENGI Joseph  
Mme DRICI Wassila  
Mr ATMANI Abdelkrim  
Mr DIB Med El Amine  
Mr BENABADJI Ahmed-Bakir  
Mr ARRAR Zoheir  
Mr BENDIABDELLAH Djamel  
Mr ALLALI Hocine

Professeur, UABB  
Maître Conférences (B), UABB  
Maître Conférences (A), UABB  
Maître Conférences (A), UABB  
Professeur, Chef de Service Microbiologie, CHU  
Maître Conférences (A), UABB  
Chargé de Cours, UABB  
Professeur UABB

Président  
Examinatrice  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur  
Encadreur

Année Universitaire 2011/2012



## RESUME

Les huiles essentielles de *Daucus gracilis* endémique, provenant de trois stations dans la région de Tlemcen, obtenues par hydrodistillation, ont été analysées par les méthodes chromatographiques (CPG & CPG/SM).

Les résultats des microanalyses ont permis l'identification de 50 composés représentant 93.90% de la composition chimique. Il est à noter que les composés oxygénés représentent la fraction la plus prépondérante (plus de 65%). Elle est constituée de monoterpènes (65.3%) et sesquiterpènes (2.3%). Les constituants majoritaires sont : 2-méthylbutyl-2-méthyl butyrate (23.2%), linalol (12.6), 2-méthylbutyl isobutyrate (12.4%), 3-méthylbutyl isovalérate (9.7%), 2-méthylbutyl isovalérate (6.7%), citronellylisobutyrate (4.1%), isopentyl-2-méthyl butyrate (3.7%), myrcène (2.7%), isobutylisovalérate (2.4%). Une proportion relativement faible en terpènes (9.5%) et sesquiterpènes hydrocarbonés (2.5%) est aussi présente dans l'huile.

Les tests sont menés sur quatorze souches microbiennes dont neuf bactéries, deux champignons et trois levures impliqués dans des infections nosocomiales et alimentaires. Les résultats démontrent le potentiel très intéressant des huiles essentielles de *Daucus gracilis* sur plusieurs pathogènes. Leurs activités sont comparables à ceux des antibiotiques et antifongiques pris comme références.

D'autre part, des essais d'évaluation du potentiel antioxydant de l'huile essentielle révèlent une activité perceptible à des concentrations élevées.

**Mots clés :** *Daucus gracilis*, Huiles Essentielles, activité antimicrobienne & antioxydante, DPPH, FRAP.



## TABLE DES MATIERES

Dédicace.....	I	2.1. Introduction.....	14
Remerciements.....	II	2.2. Modes d'action des huiles essentielle contre les bactéries.....	14
Résumé.....	III	2.3. Les principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des H.E.....	14
Table des matières.....	IV	3. Activité antioxydante .....	15
Introduction générale.....	1	3.1. Introduction.....	15
PREMIERE PARTIE		3.2. Les radicaux libres.....	16
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE		3.3. Activité antioxydante et les antioxydants .....	16
<b>CHAPITRE I</b>		3.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	18
<b>ETUDE BOTANIQUE DE <i>Daucus gracilis</i></b>		Références Bibliographiques.....	19
<b>ENDEMIQUE</b>		DEUXIEME PARTIE	
1. Introduction.....	4	ESSAIS EXPERIMENTAUX	
2. Description de la famille des <i>Apiacées</i> ...	4	<b>CHAPITRE I</b>	
3. Description de genre <i>Daucus</i> .....	4	<b>EXTRACTION ET CARACTERISATION DES H.E</b>	
4. <i>Daucus</i> présents en l'Algérie .....	4	<b>DE LA PARTIE AERIENNE DE <i>Daucus gracilis</i></b>	
5. Présentation générale de la plante étudiée .....	5	I. Extraction de la partie aérienne de <i>Daucus gracilis</i> .....	
5.1. Historique.....	5	1. Introduction.....	
5.2. Description de l'espèce <i>daucus</i> <i>gracilis steinheil</i> .....	5	2. Cueillette et conservation de la plante	
5.3. Taxonomie .....	6	3. Extraction des H.E de <i>Daucus</i> <i>gracilis</i> endémique.....	
6. Travaux antérieures sur les <i>Daucus</i> présents en Algérie .....	6	4. Caractérisation des huiles essentielles..	
Références Bibliographiques.....	7	Références Bibliographiques.....	
<b>CHAPITRE II</b>		<b>CHAPITRE II</b>	
<b>NOTIONS SUR LES HUILES ESSENTIELLES</b>		<b>ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET</b>	
1. Introduction.....	8	<b>ANTIOXYDANTE DES H.E DE <i>Daucus gracilis</i></b>	
2. Définition .....	8	I. Introduction.....	
3. Répartition et localisation.....	8	II. Activité antimicrobienne.....	
4. Propriétés physiques .....	9	1. Méthode de diffusion sur gel.....	
5. Composition chimiques des huiles essentiels.....	9	2. Méthode de dilution en milieu liquide..	
6. Les chémotype.....	9	3. Etude de l'activité antimicrobienne du <i>Daucus gracilis</i> .....	
7. Utilisation des huiles essentielles et leurs activités .....	10	III. Activité antioxydante.....	
8. Toxicité des huiles essentielles.....	10	Références Bibliographiques.....	
9. Méthodes d'extraction des huiles Essentiels .....	10	Conclusion générale.....	
10. Les méthodes d'identification des huiles essentielle.....	11		
Références Bibliographiques.....	13		
<b>CHAPITRE III</b>			
<b>TESTS BIOLOGIQUES</b>			
1. Introduction .....	14		
2. Activité antimicrobienne .....	14		

## INTRODUCTION GENERALE

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie : elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus [1].

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens [2].

Aujourd'hui, les traitements à base des plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus [1].

Cependant, des études toxicologiques ont jugé certains antioxydants synthétiques comme sources de danger. La recherche de nouveaux antioxydants naturels est l'objectif de nombreux industriels et scientifiques. Dans la littérature, des milliers de publications ayant pour sujet les antioxydants naturels ainsi que leur effet sur l'organisme humain peuvent être consultées [3]. Récemment plusieurs antioxydants ont été isolés à partir de la matière végétale [4-5].

Différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles (H.E) connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et thérapeutique dans la médecine populaire [3].

D'une manière générale, l'aromathérapie s'intègre dans le cadre de la phytothérapie ; elle peut se définir comme une thérapeutique naturelle utilisant les huiles essentielles végétales par voie interne ou externe pour soigner ou prévenir les maladies [6].

Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives [7], qui ont des activités biologiques de propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydants notables [8,9].

Empiriquement reconnue depuis des siècles, la confirmation scientifique de l'activité antimicrobienne des H.E est récente. Elle ne date que du début du siècle dernier avec les travaux du Dr GATTEFOSSE, le père de l'aromathérapie en France [10]. Ces propriétés antimicrobiennes sont dues à la fraction des H.E contenue dans les plantes [3].

L'aromathérapie, l'art de soigner par les huiles essentielles, est devenue une science méthodique depuis qu'elle repose sur une classification de ces huiles selon leur capacité à lutter contre les bactéries [1]. Les huiles essentielles sont été considérées comme les agents antimicrobiens les plus efficaces présents dans ces plantes [3].

Les huiles essentielles sont connues pour posséder une activité antimicrobienne contre un large éventail spectre de bactéries et de champignons [11].

.....

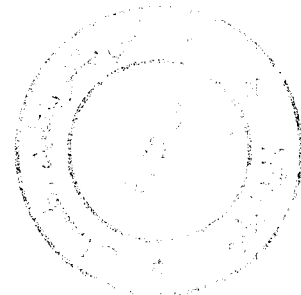
La famille des *Apiacées* a été utilisée comme épice ou drogue particulièrement suite à leurs huiles essentielles. Une douzaine des produits médicinaux d'herbes importants de cette famille botanique sont décrits dans quelques Pharmacopées. Ils possèdent des propriétés antiseptique, expectorant diurétique, carminative, les actions de spasmodique etc. [11].

Le genre *Daucus* qui appartient à cette famille est très connu par son utilisation quotidienne et dans la médecine traditionnelle comme diurétique, antiseptique, etc. Ces dernières années, les huiles essentielles de ce genre là est très étudié à l'échelle mondiale surtout en méditerranée.

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à une plante appartenant au genre *Daucus* appelé *Daucus gracilis*, plante endémique de la région de l'ouest d'Algérie. Cette étude porte sur l'extraction des H.E et leur caractérisation chimique par les méthodes chromatographiques (CPG & CPG/SM). Cette étape est suivie d'essais de valorisation des huiles obtenues par des applications futures.

Pour atteindre ces objectifs les laboratoires, cités ci-dessous, ont apportés leur contribution :

- ✓ Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (**LASNABIO**) - Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd , Tlemcen.
- ✓ Laboratoire de Chimie des Produits Naturels (**CPN**) - Université de Corse, France.
- ✓ Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles & Analyse (**COSNA**) - Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Iserin , P., Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse, **2001**,page 10.
- [2] Bandoniene D., Pukalskas A. ,Venskutonis P.R., Gruzdiene D., "Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Res . Int.*, **2000**,33: 785-791.
- [3] Chaker El Kalamouni , Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse, Les Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits des plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées,**2010**, page:11,12.
- [4] Jovanovic S.V., Simic M.G., Antioxidants in nutrition,*Ann. NY Acad. Sci.*, **2000**,899:326-334.
- [5] Hazra B., Biswas S., Mandal N., Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondiaspinnata* ,*BMC Complement Altern. Med.*,**2008**, 8:63-72.
- [6] LardryJ.-M., HaberkornV., L'aromathérapie et les huiles essentielles, *KinesitherRev.*, **2007**,61:14-7.
- [7] Bouihdid S., Idaomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S., Abrini J., Thymus essential oils: chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. Université Abd el malek Essaâdi , Tétouan (Maroc), **2006**.
- [8] Baratta M.T., Dorman H.J.D, Deans S.G., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Ruberto G., Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils , *Flav . Fragr . J.*, **1998**, 13: 235-244.
- [9] Baratta M.T., Dorman H.J.D., & Deans S.G., Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oil , *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10: 618-627.
- [10] Pibiri M.C., Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorale. Ecole polytechnique fédérale, EPFL. Lausanne(Suisse), **2005**.
- [11] Tavares A.C., Cavaleiro C., L'huile essentielle de *Daucus carota* ssp. *halophilus*: Composition, l'activité antifongique et la cytotoxicité, Portugale, *J.Ethno pharmacol.* , **2008**, 119 :129-134.



PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



## CHAPITRE I : ÉTUDES BOTANIQUE DE *Daucus gracilis* ENDEMIQUE

### I.1. Introduction

La famille des *Apiacées* (*Apiaceae*), appelée anciennement *Ombellifère* (*Umbelliferae*), comprend près de 3000 espèces réparties en 420 genres qui sont surtout présentes dans les régions tempérées du monde. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle [1].

L'*Apiacée* est une famille très importante dans la flore Algérienne où elle est représentée par 55 genres. La détermination des espèces appartenant à cette famille est délicate et doit toujours porter sur des échantillons complets, présentant en particulier des fruits mûrs [2].

### I.2. Description de la famille des *Apiacées*

L'*Apiacée* est une vaste famille complexe regroupant des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, et parfois des arbustes, sa description botanique peut se décrire comme suit :

Les feuilles : sont alternes, souvent grandes et pennatifides (découpées en lobes profonds) mais aussi simples. Leur base est souvent engainante et élargie.

La forme des fleurs : a valu à cette famille son ancien nom; ce sont des ombelles composées le plus souvent d'une ombelle primaire, avec ou sans bractées, dont chaque branche ou rayon porte une ombelle secondaire (ombellule) avec ou sans bractées secondaires (bractéoles).

Les fleurs : sont souvent petites, à cinq parties; les pétales toutes de même taille ou nettement irrégulières, les fleurs externes d'une ombelle pouvant avoir des pétales externes nettement plus grands que les autres.

Les fruits : sont souvent déterminants pour identifier genres et espèces se ressemblent. Du fait de leurs groupes de petites fleurs en ombelles qui offrent un abondant nectar et une bonne plateforme d'atterrissage, les ombellifères sont particulièrement appréciées par les insectes pollinisateurs [1].

### I.3. Description de genre *Daucus*

*Daucus* vient de mot grec *daucos* : nom donné par les grecs à diverses familles de la carotte [3].

*Daucus* est un genre de plantes herbacées de la famille des *Apiacées* (*Ombellifères*) dont l'espèce la plus connue est la carotte cultivée. Ce genre est composé de 600 espèces à travers le globe terrestre, Il semble avoir son centre de dispersion dans la région de la Méditerranée, en particulier en Afrique du Nord. Ce genre est très polymorphe et de détermination délicate. L'étude des fruits est toujours indispensable [2, 4,5].

### I.4. *Daucus* présents en Algérie

Dans l'Algérie, on compte l'existence de 11 espèces et 8 sous espèces de genre *Daucus* dont certains sont endémique et d'autre non [2,5] :

- *D. virgatus* (Poiret) Maire et Trab .
- *D. Reboudii* Coss.
- *D. Durieua* Lange.
- *D. setifolius* Desf.



- *D. crinitus* Desf.
- *D. Carota* L. (*sensu lato*) [ssp. *sativus* DC., ssp. *Carota* (L.) Thell., ssp. *mauritanicus* (L. non Lamk), ssp. *maximus* (Desf.) Batt., ssp. *hispanicus* (Gouan) Thell., ssp. *parviflorus* (Desf.) Fiori, ssp. *dentatus* (Bert.) Fiori, ssp. *maritimus* (Lamk) Spreng.]
- *D. gracilis* Steinh.
- *D. sahariensis* Murb.
- *D. biseriatus* Murb.
- *D. aureus* Desf.
- *D. muricatus* L.

## I.5. Présentation générale de la plante étudiée

### I.5.1. Historique

STEINHEIL Adolphe a été attaché à l'armée d'Afrique comme pharmacien militaire, et il a résidé à Bône. Il explora les environs de ville dans les limites que permettait alors la soumission imparfaite du pays, il profita de toutes les connaissances militaires pour y étendre le cercle de ses herborisations. Il a analysé et d'écrit presque toutes les espèces qu'il a recueillies, se proposant d'utiliser plus tard ces documents pour une Flore de Barbarie ; et en 1938, il a fait la description d'une espèce nouvelle de *Daucus* : *Daucus gracilis* [6].

On sait qu'on appelle *endémique* d'un pays donné une espèce animale ou végétale qui est spéciale à ce pays [7], et d'après ce qu'on a comme information cette plante est endémique [4].

### I.5.2. Description de l'espèce *daucus gracilis* Steinh

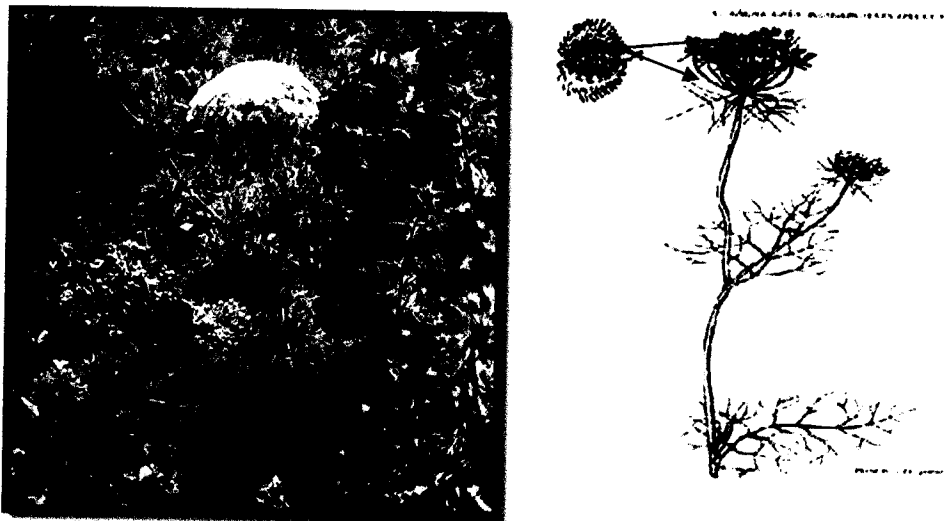


Fig.1 : *Daucus gracilis* Steinh.

*Daucus gracilis* Steinh. est une plante annuelle, grêle, s'élevant à la hauteur d'un pied à dix-huit pouces (40 cm), elle à :

**Racine :** petite, fibreuse, pivotante, simple, d'un blanc-jaunâtre, munie seulement de quelques fibrilles latérales.

**Tige :** droite, grêle, peu rameuse garnie à la base de quelque écailles formées par la gaine pétiole des premières feuilles qui sont tombées ; au dessus de ces écailles elle est glabre, lisse, finement striée de lignes violettes, légèrement flexueuse à peine anguleuse.

**Feuilles :** radicales tripinnées ; les caulinares sont alternes, distantes, plus courtes que les entre-nœuds ; le pétiole est réduit à la partie inférieure engainante, membraneuse sur les bords

qui sont fortement ciliés ;limbe commençant immédiatement au-dessus de la gaine ,bi et tripinné a division allongées, linéaires, très étroites, terminées par une petite pointe , divariquées presque glabres, et portant seulement de distance en distance un petit poil court.

Inflorescence : généralement oppositi-feuille et centrifuge.

Ombelles : longuement pédonculées, à rayons peu nombreux, inégaux, ceux du centre étant plus courts, ascendants, longues pédonculées, contractées à la fructification, petite, les rayons quelques-uns, inégal, glabre.

Bractées : pennatiséquées , linéaire, plus courte que l'ombelle, glabre.

Fruits : jaune; crêtes secondaires avec une rangée d'épines, les1.5-2 fois plus long que la largeur du fruit, légèrement évasée à la base, mais pas confluentes, faisceaux vasculaires très petite, triangulaire dans la section.

Pétales : styles de longueur ; jaunâtres ou blanc rosé, inégale pédicelles glabres.

**Distribution** : En Algérie, *Daucus gracilis* steinh. est assez abondante aux environs de Bone, sur les collines, le long de la mer du côté du fort génois ; elle fleurit en Mai [5, 8 ,2]. Son nom vernaculaire est Bouchnikha et elle est connue pour son utilisation buccodentaire.

### 1.5.3. Taxonomie

La place de *Daucus gracilis* steinh. dans la taxonomie botanique est la suivante :

**Tableau1** :Position taxonomique de *Daucus gracilis* steinh.

Taxonomie	Description
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Apiales</i>
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Daucus</i>
Espèce	<i>Daucus gracilis</i> steinh.

### 1.6. Travaux antérieures sur les *Daucus* présents en Algérie

Les *Daucus* sont présents dans les pays de la région méditerranéenne. Ils ont fait l'objet de plusieurs publications comme *Daucus carota* L. ssp. *carota* (Pologne), *Daucus carota* L. ssp. *Hispanicus* (Italie), *Daucus carota* L. ssp. *Maximus* (Egypte) etc. En Algérie, des travaux récents sont publiés sur quelques espèces telles que *Daucus crinitus* [9,4], *Daucus reboudii* [10] et d'autres sont en cours et portent sur des espèces endémiques ou non comme *Daucus muricatus*, *Daucus aureus*, *Daucus setifolius*, *Daucus virgatus*, *Daucus sahariensis*, *Daucus gracilis* etc.

A l'heure actuelle, aucune étude n'est publiée sur le *Daucus gracilis* , plante qui fait l'objet de cette étude.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] El Kalamouni C., Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse sur les Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits des plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, 2010, p.11,12.
- [2] Quézel P. & Santa S., Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertique méridionale, 1963, Tome 2, p.643 -663.
- [3] Belouad A., Plantes médicinales d'Algérie, Edition 2, p.64.
- [4] Dib M.A., Djabou N., Desjobert J.-M., Allali H., Tabti B., Muselli A., Costa J., Characterization of volatile compounds of *Daucus crinitus* Desf. Head space Solid Phase Microextraction as alternative technique to Hydrodistillation, *Chem. Cent. J.*, 2010, 4:16, 1-15.
- [5] SáenzLain C., Research on *Daucus* L. (Umbelliferae), Actas III Cong r.ÓPTIMA. *Anales Jard. Bot. Madrid*, 1981, 37 (2):481-534.
- [6] Exploration Scientifique de L'Algérie. Sciences Naturelles. Botanique, Vol. 2, p.94.
- [7] Ozenda P., Flore et végétation du Sahara - 3<sup>ème</sup> édition, 1991, p.49.
- [8] Steinheil A.D., Flore de Barbarie, p.103,104.
- [9] Dib M.A., Bendahou M., Bendiabdellah A., Djabou N., Allali H., Tabti B., Paolini J., Costa J., Partial chemical composition and antimicrobial activity of *Daucus crinitus* Desf. Extracts, *Crasas y acietes*, 2010, 61(3), 271-278.
- [10] Djarri L., Medjroubi K., Akkal S., Alomri A., Seguin E., Composition of the essential oil of aerial parts of an endemic species of the Apiaceae of Algeria, *Daucus reboudii* Coss., *Flav.Fragr.J.A*, 2006, 21(4), p.647-649.



## CHAPITRE II : NOTIONS SUR LES HUILES ESSENTIELLES

### II.1. Introduction

Le terme "huile essentielle" a été inventé au 16<sup>ième</sup> siècle par le médecin suisse PARACELSIUS von Hohenheim afin de désigner le composé actif d'un remède naturel. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums [1].

Les huiles essentielles (H.E) extraites des plantes, ne sont pas des corps simples, mais, en général, des assemblages de molécules ayant chacune leurs propriétés particulières [2], tels que ils comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes, et ils ont de multiples propriétés [3].

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieures [4]. Dix pour cent seulement parmi les huit cent mille espèces du monde végétal sont capables de synthétiser une essence [5].

Les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont répartis dans une cinquantaine de familles. Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les Lamiacées (famille du thym, de la lavande, de la menthe, du basilic...), les Astéracées (camomille, absinthe...), les Myrtacées (cannelle, laurier...), les Apiacées (coriandre...) [4].

### II.2. Définition

Les huiles essentielles connu aussi sous le nom de huiles éthérées ou essences aromatiques sont des mélanges complexes de substances organiques ayant des odeurs aromatiques et parfumées, parfois aussi de saveur agréable, liquides généralement qu'on trouve naturellement dans diverses partie des végétaux. Elles sont très concentrées, volatiles, non huileuses et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur [6, 7].

Plus récemment, la norme AFNOR NF T 75-006 (février 1998) a donné la définition suivante d'une huile essentielle : « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physique » [4].

### II.3. Répartition et localisation

Les huiles essentielles sont fabriquées à partir des sucres issus de la *photosynthèse*, par des cellules spécialisées (ou sécrétrices)[8]. La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la plante : cellules à huiles essentielles des Lauracées ou des Zingibéracées, poils sécréteurs des Lamiacées, poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées, canaux sécréteurs des Apiacées ou des Astéracées [3].

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : Fleurs (bergamotier, tubéreuse...) mais aussi feuilles (citronnelle, eucalyptus...), dans des écorces (cannelier), des bois (bois de rose, santal...), des racines (vétiver), rhizomes (curcuma, gingembre...) des fruits (anis, badiane...), des graines (muscade...). Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation [3].

## II.4. Propriétés physiques

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante, très volatiles, ce qui les différencie des huiles « fixes ». Les huiles essentielles ne sont que très rarement colorées. La densité des huiles essentielles est en général inférieure à celle de l'eau sauf les huiles essentielles de sassafras, de girofle ou de cannelle. La plupart des huiles essentielles dévient la lumière polarisée et elles ont un indice de réfraction élevé. Les huiles essentielles sont solubles dans les solvants organiques usuels, liposolubles, très peu solubles dans l'eau et entraînaient à la vapeur d'eau.

## II.5. Composition chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les groupes des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane beaucoup moins fréquents d'autres parts. Le tableau 2 suivant résume les deux groupes majoritaires dans les huiles essentielles.

**Tableau 2 :** Les deux majeures classes trouvées dans les huiles essentielles [9].

Hydrocarbures	Composés oxygénés
Aussi appeler hydrocarbures aliphatiques	Les dérivés de terpènes : Terpénoïdes
➤ Terpènes : unité de base l'isoprène (C <sub>5</sub> ),	➤ Alcools,
➤ Monoterpène : (C <sub>10</sub> ),	➤ Phénols,
➤ Sesquiterpènes : (C <sub>15</sub> ),	➤ Aldéhydes,
➤ Diterpènes : (C <sub>20</sub> )	➤ Cétones,
	➤ Esters,
	➤ Lactones

## II.6. Les chémotypes

L'importance de connaissance des familles, genres et espèces botaniques est évidente, mais aussi de celle de leur provenance. Des plantes botaniquement identiques peuvent, en effet, donner des essences dont les différences peuvent être plus ou moins importantes.

Une même espèce botanique, en fonction de différentes conditions (sol, ensoleillement, saison de cueillette, partie de la plante), peut fournir des huiles essentielles de compositions différentes. Ces variations génèrent la notion de chémotype, ce terme est dit pour différencier cette variation chimique dans une même espèce [2, 10].

La méconnaissance de ces variations peut être à l'origine d'échecs thérapeutiques et même d'accidents plus ou moins graves [5]. C'est pourquoi des contrôles systématiques des huiles essentielles ou essences sont toujours nécessaires avant emploi [2].

## II.7. Utilisation des huiles essentielles et leurs activités

Une huile essentielle n'est pas seulement un parfum, c'est la somme de nombreuses composantes qui agissent en synergie les unes avec les autres à l'intérieur de notre organisme. Une fois leur travail terminé, elles quittent discrètement notre corps par voies d'évacuation des déchets et des toxines, sans laisser de traces néfastes [11]. C'est tout simplement que ces huiles essentielles opèrent, au plan physiologique comme au plan psychique, une réduction de ce qui est en trop et une augmentation de ce qui fait défaut [9]. Les huiles essentielles soutiennent l'organisme dans son fonctionnement quotidien, l'aident en cas de dérèglement, de fatigue, de blocage physique ou psychologique, combattent le stress ... tout cela explique l'attention qu'il convient d'apporter à leur qualité [11].

Les huiles essentielles ont des propriétés : dépurative, drainante, carminative, purgative, diurétique, énergisante, tonifiante, antianémique, antiputride, apéritive, hépatique, revitalisante, cicatrisante, antiride, redonne de l'élasticité à la peau etc. Outre l'emploi strictement médical des huiles essentielles, celles-ci sont utilisées dans de nombreux domaines tels que la parfumerie, la cosmétologie, la cuisine (pour aromatiser certains plats), l'agro-alimentaire et l'industrie chimique. Deux industries se partagent ce marché mondial florissant ; il s'agit de l'industrie agroalimentaire et la parfumerie [10].

## II.8. Toxicité des huiles essentielles

La toxicité chronique des huiles essentielles est assez mal connue ; on manque aussi de données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes ou cancérogènes. On connaît par contre beaucoup mieux le risque de toxicité aiguë lié à une ingestion massive, en particulier neurotoxicité des huiles essentielles à thuyone (thuya, absinthe, tanaïs, sauge officinale) ou à pinocamphone (hysopé) : ces cétones induisent des crises épileptiformes et tétaniformes, des troubles psychiques et sensoriels nécessitant l'hospitalisation. D'autres monoterpènes sont également toxiques à doses fortes : camphre, menthol (risques de spasmes de la glotte chez le jeune enfant), cinéol, E-anéthol. Cette toxicité non négligeable conduit à adopter une attitude prudente face aux pratiques telles que l'aromathérapie lorsqu'elles utilisent des huiles essentielles pures, et à doses fortes, par voie orale et, a fortiori, en mélange.

## II.9. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction [12], parmi les principales techniques d'extraction nous citons :

### II.9.1. Entraînement à la vapeur

- *Hydrodistillation*

Le principe de l'hydrodistillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux.

- *Distillation à vapeur saturée*

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées, cette méthode est la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C, température d'ébullition d'eau.

### **II.9.2. Expression à froid**

L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau.

### **II.9.3. Extraction par solvants**

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

### **II.9.4. Enfleurage**

L'enfleurage est une ancienne méthode d'extraction manuelle des essences, complexe et très coûteuse, qui n'est plus tellement pratiquée de nos jours. Elle est utilisée essentiellement pour les végétaux dont l'arôme est trop fragile (jasmin, narcisse, muguet...). Les plantes sont disposées à température ambiante sur des plaques de graisse qui ont pour but d'absorber le parfum. Une fois la plaque bien imprégnée, la matière grasse est séparée de l'huile essentielle à l'aide d'un solvant. Grâce à cette méthode; on obtient des huiles essentielles de grande qualité.

### **II.9.5. Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique**

Il s'agit d'une technique moderne, très coûteuse : du dioxyde de carbone haute pression est employé pour faire explorer les poches végétales contenant l'essence, qu'il est alors possible de récupérer [11].

## **II.10. Les méthodes d'identification des huiles essentielles**

À noter que certaines huiles essentielles sont presque exclusivement constituées d'une seule molécule (comme *Mentha pulegium*, par exemple) ou de deux ou trois (telles que *Salvia sclarea*, *Arosaedora*, *Citrus reticulata*, *Eugenia caryophyllus*), mais la plupart sont polymoléculaires (molécules de même famille chimique ou non) [4].



Ils existent plusieurs méthodes analytiques qui permettent d'identifier et quantifier ces constituants parmi lesquelles on trouve :

➤ Analyse par CPG

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue. Cette technique a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants d'un mélange très complexe contenant jusqu'à 200 composés analogues soit par partage, soit par adsorption, pour des échantillons très réduits. Elle présente toutefois des limites : elle nécessite que l'échantillon soit susceptible d'être, rapidement, volatilisé sans décomposition [13]. Elle est donc applicable à des matériaux volatils. L'instabilité à hautes températures rend, habituellement, un composé peu convenable pour l'analyse par CPG [14].

La condition de volatilité des échantillons signifie que les substances non polaires sont généralement, plus faciles à séparer que des substances polaires et que les composés ioniques ne peuvent pas traverser la colonne de CPG. La technique ne concerne donc qu'environ 20 % de produits chimiques connus [15].

Le principe de chromatographie repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact, l'une stationnaire et l'autre mobile. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure etc.) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité). A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange [16].

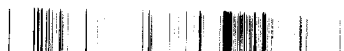
➤ Analyse par CPG/SM :

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse est le meilleur exemple pour démontrer le pouvoir de la combinaison d'une méthode de séparation fortement efficace et une méthode de détection sensible et sélective [17]. La CPG/SM est l'une des techniques de l'analyse des mélanges à l'état de traces [18]. C'est une méthode utilisée pour l'identification qualitative des composés inconnus et aussi la détermination quantitative précise de ces composés. Presque 10% de tous les composés organiques sont appropriés pour l'analyse de CPG/SM. Ainsi, seuls les composés volatils et thermiquement stables qui peuvent être analysés par cette technique. L'effluent gazeux du chromatographe est dirigé, par la ligne de transfert, vers la source d'ion du spectromètre. Les analytes favorisés sont ionisés, produisant des ions de fragmentation, qui sont ensuite détectés [19].



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] El Kalamouni C., Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse sur les Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits des plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, 2010, p.11,12,48.
- [2] Lamendin H., Toscano G., Requirand P., Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires EMC-Dentisterie 1, 2004, 1 : 179-192.
- [3] Iserin P., Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse, 2001, p.14.
- [4] Bruneton J., Pharmacognosie-phytochimie-Plante médicinale, 2<sup>ème</sup> édition tec et Doc Lavoisier, Paris, 1993, p.406-413.
- [5] 60 Petits maux soignés par les huiles essentielles, l'aromathérapie au quotidien pour la famille, Jean-Pierre Willem, UNI Edition, Paris, 2009, pages 7,11.
- [6] Hamoudi R., Contribution à la mise en évidence de principes actifs de plantes *Teurium poliumgeriyrii* provenant de la région Tamanrass et Magister université Kasdi Merbah, Ouargla, 2008, p.15-43.
- [7] Bonnefond M.C., Comment se soigner avec l'aromathérapie Edition De Vecchi S.A, Paris, 1999, p.7.
- [8] Roulier G., Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes, Éditions Dangles, 1990.
- [9] Essential Chemistry for Aromatherapy, chapter 3 : families of compounds that occur in essential oils, Elsevier Limited, 2008, p.43.
- [10] Lardry J.-M., Haberkorn V., L'aromathérapie et les huiles essentielles (2), *Kinesither.Rev.*, 2007, 61: 14-17.
- [11] Buronzo A.M., Le grand guide des huiles essentielles : santé, beauté, bien-être, Hachette pratique, 2008, p.5.
- [12] Samate Abdoul D., Composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : Valorisation, Thèse de doctorat, Univ.de Ouagadougou, Burkina Faso, 2001.
- [13] Rouessac F., Rouessac A., Brook S., Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Ed. John Willey and Sons, 2007, p.31.
- [14] Cserhàti T., Forgács E., Chromatography in food science and technology, CRC Press, 1999, p.1.
- [15] Mendham J., Vogel A.I., Denney R.C., Toullec J., Barnes J.D., Mottet M., Thomas M.J.K., Analyse chimique quantitative de Vogel, Ed. de Boek Université, 2005, p.231-314.
- [16] Heftmann E., Chromatography: fundamentals and techniques, Ed. Elsevier, 2004, p.413.
- [17] Martin A.J.P., Synger R.L.M., *Biochem. J.*, 1941, 35, 1358-1368.
- [18] Giddings J.C., Keller R.A., Advance in chromatography, Ed. CRC Press, 1974, p.128.
- [19] Grob R.L., Barry E.F., Modern practice of gas Chromatography, Ed. Wiley-EEE, 2004, p.341-343.



## CHAPITRE III : TESTS BIOLOGIQUES

### III.1. Introduction

Les plantes aromatiques se différencient des autres plantes médicinales par ses principes odoriférants et parfumés appelés huiles essentielles. Ses dernières sont utilisées dans différents domaines et deviennent des sources de molécules bioactives, tels que la composition chimique, les groupes fonctionnels présents des composés majoritaires de ses extraits et leurs effets synergiques conduits à de nombreuses activités biologiques : antiseptique analgésique, cicatrisante antimicrobienne, antioxydante, antifongique, anti-inflammatoire etc. [1].

### III.2. Activité antimicrobienne

#### III.2.1. Introduction

Certaines espèces microbiennes pathogènes, sont de moins en moins sensibles aux antibiotiques et développent des résistances multiples à ces derniers. La nécessité de trouver des solutions est à l'ordre du jour. L'usage des huiles essentielles, grâce à leur forte action antimicrobienne développé depuis plus d'une vingtaine d'années, constitue un sérieux substitue au traitement par les antibiotiques dans les pathologies infectieuses [2].

Les antimicrobiens les plus importants dans les huiles essentielles sont les terpénoïdes et en particulier les mono et les sesqui-terpénoïdes. Ces composés sont biosynthèses à partir l'unité de base qui été l'isoprène [3,4].

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs [5].

#### III.2.2. Modes d'action des huiles essentielle contre les bactéries

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des huiles essentielle contre les bactéries à cause de leur composition chimique complexe. Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action. D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [6].

#### III.2.3. Les principales techniques de détermination de l'activité antimicrobienne des H.E

A l'heure actuelle, l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par un grand nombre de techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. La technique de détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants des huiles essentielles dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à faibles concentrations [7,8].

Parmi ces méthodes, on trouve :

### ***III.2.3.1. Technique en milieu solide (méthode de la diffusion en disque)***

La diffusion de l'agent antimicrobien dans le milieu de culture ensemencé résulte d'un gradient de l'antimicrobien. Quand la concentration de l'antimicrobien devient si diluée qu'il ne peut plus inhiber la croissance de la bactérie testée, la zone d'inhibition est démarquée.

Le diamètre de cette zone d'inhibition autour du disque de l'antimicrobien est corrélée avec la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la combinaison particulière bactérie/antimicrobien, la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai.

Généralement, plus la zone d'inhibition est importante, plus la concentration d'antimicrobien nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne des organismes est faible. La mesure des zones d'inhibition peut être manuelle peut prendre du temps.

### ***III.2.3.2. Technique en milieu liquide (méthode de dilution)***

Le but des méthodes de dilution en bouillon et en gélose est de déterminer la concentration la plus faible de l'antimicrobien testé qui inhibe la croissance de la bactérie testée (la CMI habituellement exprimée en mg/mL ou mg/L).

#### La dilution en bouillon :

La dilution en bouillon est une technique dans laquelle une suspension bactérienne (à une concentration optimale ou appropriée prédéterminée) est testée contre des concentrations variables d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide. La méthode de dilution en bouillon peut être effectuée dans des tubes contenant un volume minimum de 2 mL (macrodilution) ou dans de plus petits volumes à l'aide de plaques de microtitration (microdilution). L'utilisation de ces plaques avec un protocole documenté, y compris les précisions sur les micro-organismes de référence approprié, peut faciliter la comparaison des résultats entre analyses.

#### La dilution en gélose :

La dilution en gélose implique l'incorporation d'un agent antimicrobien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, en général une dilution en série de 2 en 2, suivie de l'ensemencement d'un inoculum bactérien défini à la surface de la gélose de la boîte [6].

## **III.3. Activité antioxydante**

### **III.3.1. Introduction**

Les termes antioxydants et radicaux libres sont des termes populaires utilisés par les nutritionnistes et autres professionnels de la santé. Ces dernières années ont vu apparaître un débordement d'informations sur le rôle du stress oxydatif, qui est défini comme un déséquilibre entre la production excessive de molécules oxydantes et/ou une diminution du taux d'antioxydants dans l'organisme, et par conséquent on aura des dommages importants et irréversibles sur les molécules biologiques comme : les lipides, les protéines, l'ADN, les sucres etc. Les attaques oxydantes de la part des radicaux sur ces dernières, provoquant des altérations et des dysfonctionnements cellulaires à l'origine de nombreuses pathologies tels que maladies cardiovasculaires, maladies neurodégénératives, cancers, diabète, sclérose etc.[9,13].

L'utilisation des antioxydants synthétiques est un sujet très étudié du fait de leur impact négatif sur la santé humaine, plusieurs limites et restrictions ont été mises en place concernant



leur utilisation, et leur substitution par des antioxydants naturels est devenue un enjeu scientifique. Plusieurs espèces de plantes ont été impliquées dans la recherche des nouveaux antioxydants [6].

### III.3.2. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes, ou un groupe d'atomes, avec un nombre impair d'électrons sur la couche externe, et ils peuvent se former quand l'oxygène interagit avec certaines molécules [10]. Cette structure électronique déséquilibrée leur confère une grande réactivité sur les constituants organiques et sur les structures cellulaires [6]. Tels que ces derniers sont responsables de processus de dégradation au sein de cellules biologique et aussi au cours de processus de vieillissement [11].

La plupart des radicaux libres réagissent quasiment instantanément avec d'autres molécules voisines. Néanmoins, la toxicité d'une espèce n'est pas nécessairement corrélée à sa réactivité [10].

Les sources métaboliques des radicaux libres de l'oxygène (*ROS*) et des radicaux libres de l'azote (*RNS*) sont les mitochondries (respiration mitochondriale), les cellules neuronales, endothéliales et phagocytaires (macrophages), ces dernières participant à la défense immunitaire de l'organisme. Des radicaux libres sont également produits au cours de la synthèse de molécules suite à des réactions biochimiques [10].

*Remarque* : Certaines molécules non-radicalaires présentent également une activité oxydante accrue parmi lesquelles le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ) et l'acide hypochloreux ( $HClO$ ).

### III.3.3. Aactivité antioxydante et les antioxydants

#### III.3.3.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $OH^\bullet$ ) et superoxydes ( $O_2^\bullet$ ) [10].

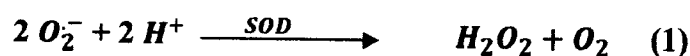
#### III.3.3.2. Antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Ces derniers sont des molécules très réactives qui seraient impliquées dans le développement des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement.

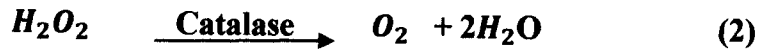
Chaque molécule antioxydante ne peut réagir qu'avec un seul radical libre, et par conséquent, il faut constamment refaire le plein de ressources anti-oxydantes qui sont soit :

Antioxydants enzymatiques : Ce type d'antioxydant est composé d'enzymes, à action directe sur les *ROS* par exemple :

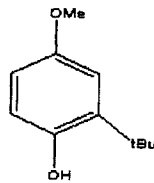
- Les superoxydesdismutases (SOD), métalloprotéines dont le site actif contient du cuivre, du zinc, du manganèse, du fer ou du nickel, favorisent par exemple la dismutation spontanée du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène.



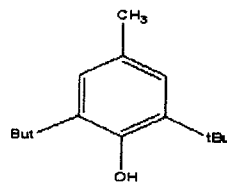
- La catalase et la glutathion peroxydase tels que le premier peut éliminer le peroxyde d'hydrogène présent à haute concentration et le deuxième peut l'éliminer même en petite quantité selon les réactions suivantes :



Antioxydants synthétiques : Les antioxydants synthétique sont généralement lipophiles comme les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle), le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT). Ces deux derniers sont principalement employés comme conservateurs, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires [9,11,12]. De plus, dans le domaine de l'alimentaire, des réactions d'hypersensibilité ont été recensées pour les gallates, le BHA et le BHT.



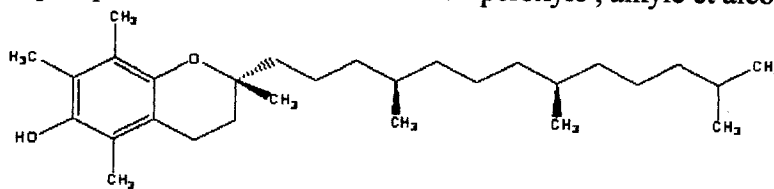
**BHA**



**BHT**

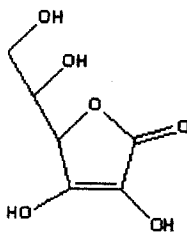
Antioxydants naturels (molécules de faible poids moléculaires) : Les antioxydants naturels sont capables de prévenir des dommages oxydatifs ou ils interviennent sur les molécules prooxydantes de façon directe, en donnant leurs électrons aux radicaux libres. Parmi les molécules les plus connu on trouve :

- La vitamine E : est un antioxydant lipophile . Elle protège les membranes et les lipides de la peroxydation lipidique en neutralisant les radicaux peroxyde , alkyle et alcoyle ( $ROO^\bullet$ ).

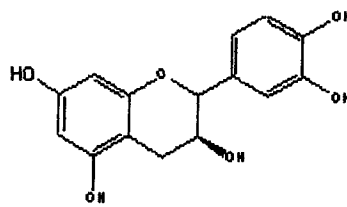


**Vitamine E**

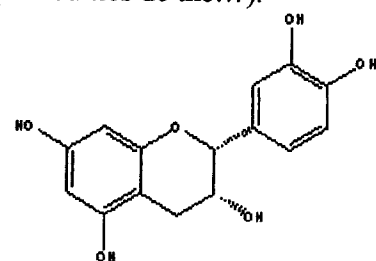
- La vitamine C (Acide ascorbique) : elle est capable de réagir directement sur les ROS et en particulier  $O_2^\bullet$ . Elle limite la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxyde comme la vitamine E.
- Les Catéchines : Les catéchines (Epicatechine, Epigallocatechine, etc.) sont des molécules polyphénoliques largement présentes dans le règne végétal (les feuilles de thé...).



**Vitamine C**



**Catéchine**



**Epicatechine**

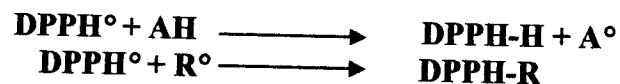


### III.3.4.Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la capacité antioxydante. Elles sont basées sur la mesure de la consommation de radicaux libres préalablement formés comme les peroxydes ROO• etc. Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature parmi lesquelles on cite : ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) ; TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) ; TOSC (*Total oxidant scavenging capacity*) ; FRAP (*Ferric reducing ability power*) [10, 13,14] etc. La détection s'effectue pour l'ensemble de ces méthodes par des mesures spectrométriques. Quelques méthodes sont décrites ci-dessous :

#### Méthode de DPPH [10] :

La méthode de DPPH, consiste à utiliser un radical stable, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) dans du méthanol (la plupart des cas). La réduction du DPPH° est contrôlée en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde caractéristique (517 nm). A cette longueur d'onde le radical absorbe, mais après sa réduction par l'antioxydant (AH) ou un autre radical, l'absorption diminue selon le processus suivant :



#### Méthode de décoloration du $\beta$ -carotène[15]

S'appelle aussi la méthode de blanchissement  $\beta$ -carotène. Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du  $\beta$ -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  $\beta$ -carotène.

#### Méthode de FRAP[16-18]

Le pouvoir réducteur des huiles essentielles est déterminé selon la méthode d'OYAI SU. Cette méthode est basée sur une réaction chimique de réduction du fer (III), présent dans le complexe  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , en Fe (II). L'absorbance est déterminé à 700 nm.



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

- [1] Lahlou M., Methods of study photochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytother. Res.* **2004**, 18, 435-448.
- [2] Pibiri M.C., Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorale, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL), Suisse, **2006**.
- [3] Valnet J., L'aromathérapie, Ed. Maloine S. A., **2005**.
- [4] Papetti A., Isolation and characterization of antimicrobial food components, *Current Opinion in Biotechnology*, **2011**, 23:1-6.
- [5] Dvaranauskaitė A., Venskutonis P.R., Raynaud C., Talou T., Viskelis P. et Dambrauskienė E., Characterization of Steam Volatiles in the Essential Oil of Black Currant Buds and the Antioxidant Properties of Different Bud Extracts, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56: 3279-3286.
- [6] El Kalamouni C., Les Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits des plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse, **2010**, p.70, 71.
- [7] Bousbia N., Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique Alger, **2004**.
- [8] Rhayour K., Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Dhar Mehraz -Fès-, Thèse de doctorat, **2002**, p.4.
- [9] Beylier-Maurel M.F., Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie, *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.*, **1976**, 58: 283-286.
- [10] Barus C., Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieu homogène et biphasique - Application aux produits dermocosmétiques v, Thèse de doctorat université de Toulouse, **2008**, p.8.
- [11] Ito N., Fukushima S., Hagiwara A., Shibata M., Ogiso T.; *Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats*; *J. Natl. Cancer Inst.*, **1983**, 70 : 343-352.
- [12] Chen C., Pearson A.M., Gray J.I., *Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds*; *Food Chem.*, **1992**, 43 :177-183.
- [13] Prior R.L., Cao G., *In vivo total antioxidant capacity: comparaison of different analytical methods*; *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 27:1173-1181.
- [14] Mantle D., Anderton J.G., Falkous G., Barnes M., Jones P., Perry E.K., *Comparaison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils*, *Comp. Biochem. Phys. B*, **1999**, 121: 385-391.
- [15] Marco G.L., A rapid method for evaluation of antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1968**, 45: 594 - 8.
- [16] Oyaizu M., Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine, *Jpn J. Nutr.*, **1986**, 44, 307 - 314.
- [17] Miller H.E., (1971), Simplified method for the evaluation of antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1971**, 48 (2):91 - 97.
- [18] Benwie F.F., Strain J.J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, **1996**, 239:70-76.

## DEXIEME PARTIE : ESSAIS EXPERIMENTAUX





# CHAPITRE I : EXTRACTION ET CARACTÉRISATION DES H.E DE LA PARTIE AÉRIENNE DE *Daucus gracilis*

## I. Extraction de la partie aérienne de *Daucus gracilis*

### I.1. Introduction

L'étude bibliographique approfondie menée sur l'espèce *Daucus gracilis* montre et confirme que cette plante endémique n'a pas été étudiée jusqu'à l'heure actuelle. C'est d'ailleurs l'une des raisons qui nous ont poussés à réaliser ce travail de recherche. Ce dernier consiste à extraire l'huile essentielle de *Daucus gracilis* et la caractériser chimiquement par l'emploi des méthodes chromatographiques (CPG & CPG/SM) afin de déterminer ses composés majoritaires, connaître leurs structures etc. Ces étapes sont suivies d'une valorisation de l'huile. Pour ce faire, l'H.E est soumise à des tests biologiques. Ces tests concernent, spécialement, la mesure des activités antimicrobienne et antioxydante.

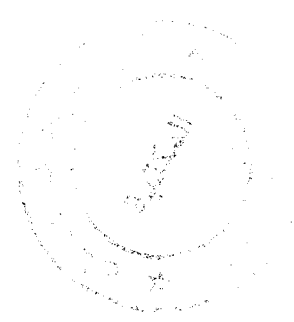
### I.2. Cueillette et conservation de la plante

*Daucus gracilis* a été récolté dans quatre stations de la région de Tlemcen dont trois au mois de mai 2010 (Ben Sakrane, Ain El Hout et Amier) et une au mois de mai 2012 (Sidi Abdelli). Son identification botanique a été confirmée par les Professeurs N. BENABADJI et M. BENSALAH du Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaïd –Tlemcen.

Après la récolte, le matériel végétal est débarrassé des débris. Pour s'assurer de la bonne conservation de notre plante, un séchage à l'air libre et à l'obscurité est réalisé. Après séparation des différentes parties de la plante (feuilles, tiges, fleurs et racines), elles sont conservées dans des flacons à l'abri de la lumière jusqu'à leurs utilisations. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes activités enzymatiques responsables de leur dénaturation.

Tableau 3 : Situation géographique des stations de récolte.

Zone	Altitude	Latitude	Longitude
Ain-El-Hout	450 m	35° 55'59 "N	1° 19 ' 32"W
Amier	362 m	35 ° 1 ' 36" N	1° 14' 3 "W
Bensakrane	309 m	35 ° 55 ' 59"N	1° 13' 0" W



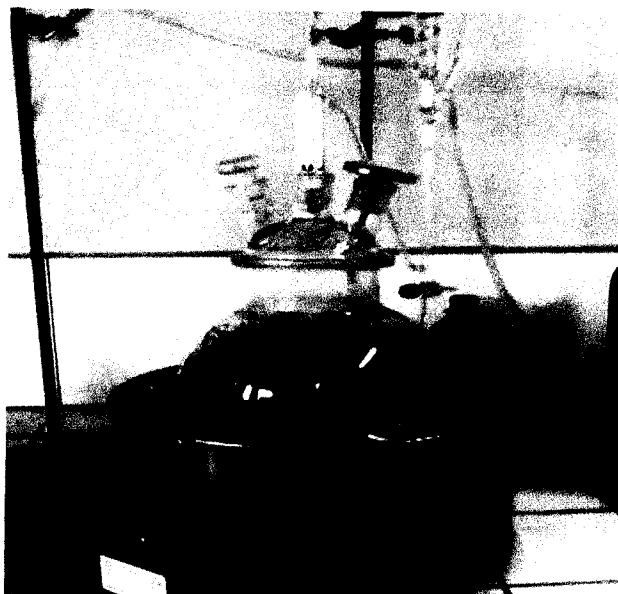
### I.3. Extraction des H.E de *Daucus gracilis* endémique

L'extraction des huiles essentielles est effectuée par une méthode classique et répandue : hydrodistillation. Cette méthode est très utilisée car elle facile à mettre en œuvre [1] :

- La matière végétale sèche (partie aérienne, fleurs, tiges, fruits, feuilles ; 300g) est immergée dans l'eau et l'ensemble est porté à l'ébullition,
- La vapeur contenant la partie volatile monte, se refroidie au niveau du réfrigérant puis se condense,



- Obtention de deux phases séparables. L'huile essentielle est récupérée par décantation ou par l'utilisation de micropipette. Elle est conservée, ensuite, dans des piluliers scellés à une température de 4°C.



**Fig.2 : Montage de l'hydrodistillation.**

Après une durée d'extraction de 4 heures, les huiles essentielles obtenues sont de couleurs jaune claire, très volatiles, et insolubles dans l'eau.

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal traité [2].

$$R = (m/m_0).100$$

$m$  : masse en gramme de l'huile essentielle.

$m_0$  : masse en gramme de la matériel végétal sec.

Exemple :  $m = 0.3195$  g ;  $m_0 = 308.87$  g

$$R = (0.3195/308.87) \cdot 100 \quad R = 0.10 \%$$

Les rendements calculés pour différentes stations sont regroupés dans le tableau 4 ci-dessous :

**Tableau 4 : Rendements en H.E**

Rendement/Région	Amier	Ben Sakrane	Ain El Hout
Plante entière	0.14	0.10	0.18
Fleurs	0.26	0.20	0.12
Feuilles	0.04	0.13	0.11

**Remarque :** L'extraction des racines de *Daucus gracilis* donnent des quantités très faibles en huile essentielle.

#### **I.4. Caractérisation des huiles essentielles[3]**

L'identification des constituants de l'huile essentielle de *Daucus gracilis* est réalisée par des techniques d'analyses conventionnelles. Celles-ci est basée sur l'utilisation conjointe de la CPG et la CPG/SM.

L'analyse par CPG/SM permet d'obtenir les spectres de masse des divers constituants qui, à l'aide d'un logiciel, sont ensuite comparés à ceux répertoriés dans des bibliothèques, dont une élaborée au laboratoire Chimie des Produits Naturels – Corse, et les autres, commerciales, en éditions traditionnelles ou informatisées (Jennings et Shibamoto ; Joulain ; Wiley ; Adams ; National Institute of Standards and Technology (Nist)). Pour ce qui nous concerne, nous avons utilisé les bibliothèques suivantes : Adams, 2001; König et Coll., 2001; Nist, 1999).

##### ***Techniques d'analyse***

Les conditions d'analyse utilisées pour l'identification de nos huiles essentielles sont présentées ci-dessous :

##### ***Analyse par CPG***

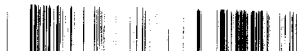
L'analyse quantitative a été réalisé à l'aide d'un chromatogramme en phase gazeuse de marque Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) autosystème XL équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et muni de deux colonnes capillaires en silice fondue de type RTX-1 (polydiméthylsiloxane) apolaire et RTX-wax (polyéthylène glycol) polaire qui possèdent les caractéristiques suivantes (longueur : 60m, diamètre interne : 0.22mm, épaisseur de film : 0.25 $\mu$ m. La température du four est programmé de 60°C à 230°C à raison d'une montée de 2°C/min et ensuite maintenue à 230°C pendant 35min. Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenues à 280°C. Les échantillons ont été injectés dans le mode split (1/50), en utilisant de l'hélium comme gaz porteur (1mL/min), le volume d'injection de l'échantillon de 0.2  $\mu$ L.

##### ***Analyse par CPG/SM***

Les échantillons ont été analysés avec un détecteur de masse à quadripôle de type Perkin-Elmer Turbo couplé à un chromatographe en phase gazeuse Perkin-Elmer (autosystème XL). La température de la source d'ions est fixée à 150°C. La fragmentation est effectuée en impact électronique sous un champ de 70 eV. L'assurance-emploi spectres de masse ont été acquis sur la masse gamme 35-350Da (temps de balayage: 1s). La colonne utilisée est RTX-1, capillaire en silice fondue. Les autres conditions étaient les mêmes que décrites que dans la CPG sauf pour le gaz vecteur l'Hélium de mode d'injection split est de rapport de fuite de 1/80.

##### ***Identification des constituants de l'huile essentielle[4,5]***

L'identification des composants individuels a été fondée sur la comparaison des indices de rétention IR calculé, sur les colonnes polaires et apolaires, avec ceux de composés authentiques ou des données de la littérature (König et Coll., 2001; National Institute of Standards and Technology, 2008), et des bibliothèques commerciales (Adams, 2001; König et Coll., 2001; National Institute of Standards and Technology, 1999) et la comparaison des spectres de masse avec ceux des composés authentiques de la bibliothèque du laboratoire ou des données de la littérature [6] et [7].



L'étude minutieuse des CPG fournit les résultats regroupés dans le tableau 5 :

**Tableau 5:** Composition chimique des huiles essentielles de *Daucus gracilis* endémique.

No. <sup>a</sup>	Composés	IR lit <sup>b</sup>	IRa <sup>c</sup>	IRp <sup>d</sup>	DGFE	DGFL	DGPE	DGPE	DGFE	DGFL	DGFL	DGPE	DGFE
					BS	BS	BS	AH	AH	AH	AM	AM	AM
1	2-méthyl butanol	717	717	1159	0,1	-	tr	tr	tr	-	-	-	-
2	Hexanal	770	773	1043	tr	-	tr	0,1	tr	-	-	-	-
3	Isobutylisobutyrate	902	900	1085	0,6	0,9	1,5	1,8	3,1	2,3	1,2	1,8	1,9
4	$\alpha$ -Thujène	922	922	1022	1,6	0,6	0,9	0,8	0,6	0,5	0,9	0,7	0,4
5	$\alpha$ -Pinène	931	930	1022	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	tr	0,3	0,3	0,1
6	Sabinène	964	964	1117	0,5	1,3	0,9	0,9	0,3	1,8	0,9	0,1	0,1
7	$\beta$ -Pinène	970	970	1107	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,9	0,1
8	Myrcène	979	980	1155	2,1	1,1	1,3	0,9	1,1	1,2	1,6	5,1	2,7
9	Isobutylisovalérate	989	988	1186	2,9	2,2	3,6	5,8	6,2	4,1	3,2	5,1	2,4
10	Isobutyl-2-méthyl butyrate	991	990	1171	1,9	1,3	1,6	1,1	2,1	0,4	0,3	1,7	0,7
11	3-méthylbutyl Isobutyrate	1002	998	1194	2,6	1,3	1,9	1,6	2,1	1,5	1,7	1,6	1,8
12	2-méthylbutyl Isobutyrate	1004	1003	1194	7,6	6,5	10,5	12,2	15,7	10,4	10,9	10,2	12,4
13	<i>p</i> -Cymène	1011	1012	1262	0,3	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,4	0,6
14	Limonène	1020	1021	1196	1,4	0,8	0,9	0,6	0,7	0,5	0,7	0,4	0,5
15	$\beta$ -Phellandrène	1021	1021	1206	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,5
16	<i>Z</i> - $(\beta)$ -Ocimène	1024	1025	1226	0,7	1,2	0,9	0,7	0,8	3,7	1,2	1,5	0,6
17	<i>E</i> - $(\beta)$ -Ocimène	1034	1036	1244	2,7	8,4	5,2	1,4	2	7,5	10,2	0,2	2,5
18	linalol oxyde THF-Z	1073	1073	1460	0,1	tr	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2
19	Isopentyl-2-méthyl butyrate	1086	1086	1296	8,1	5,2	4,9	3,7	4,8	3,1	3,9	3,8	3,7
20	Linalol	1081	1090	1538	5,9	22,7	17,4	20,3	10,4	21,2	20,6	22,2	12,6
21	3-méthylbutyl Isovalérate	1090	1090	1026	6,4	10,3	9,6	8,2	10,2	4,2	6,7	7,2	9,7
22	2-méthylbutyl-2-méthyl butyrate	1096	1094	1280	18,9	6,2	12,1	18,4	15,8	16,5	15,5	20,2	23,2
23	2-méthylbutylisovalérate	1098	1097	1280	13,6	5,9	8,3	7,5	7,1	5,6	6,4	6,6	6,7
24	NI		1126	1391	1,1	1,1	1,2	1,6	1,4	1,5	1,2	0,5	1
25	NI		1130	1408	0,8	0,1	0,6	0,5	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3
26	Terpinén-4-ol	1161	1161	1589	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1
27	$\alpha$ -Terpinol	1179	1179	1682	0,2	0,6	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5
28	<i>Cis</i> -3-hexenyl-3-méthyl butyrate	1220	1217	1455	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	tr	0,1	tr	tr
29	<i>Cis</i> -3-hexenyle Isovalérate	1222	1220	1465	0,1	Tr	0,1	0,1	tr	tr	tr	0,1	0,1
30	hexyl-2-méthyl butyrate	1226	1228	1420	0,1	Tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr
31	hexylisovalérate	1228	1231	1431	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1	tr	tr
32	benzylisobutyrate	1269	1269	1765	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3
33	Lavandulyle acétate	1270	1271	1589	0,2	0,4	0,3	tr	tr	tr	tr	tr	tr
34	Benzyl-2-méthyl butyrate	1357	1359	1874	0,7	0,3	0,6	0,4	0,5	0,3	0,2	0,2	0,2
35	Lavandulylepropionate	1361	1359	1749	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3
36	<i>E</i> - $(\beta)$ -Damascenone	1362	1359	1803	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3
37	Benzylisovalérate	1363	1365	1851	0,1	0,4	0,4	0,6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3
38	2-phénylethylisobutyrate	1371	1370	1863	0,2	0,1	0,1	0,2	tr	0,1	tr	0,1	0,2
39	$\alpha$ -Copaène	1379	1380	1476	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
40	$\beta$ -Bourbonène	1385	1383	1509	0,2	0,1	0,1	0,1	tr	tr	tr	tr	tr
41	Lavandulyleisobutyrate	1407	1405	1667	0,2	0,6	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,5
42	<i>E</i> - $(\beta)$ -Farnesène	1447	1445	1656	0,2	0,4	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
43	Phénylethyl-2-méthyl butyrate	1460	1460	1953	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
44	2-Phénylethyl Isovalérate	1465	1462	1971	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,1	0,1
45	Citronellylisobutyrate	1469	1467	1716	1,8	0,4	1,1	0,9	1,3	0,7	1,2	1	4,1
46	Germacrène D	1480	1473	1694	0,3	1,5	0,7	0,3	0,2	0,8	0,6	0,2	0,1
47	Géranylisobutyrate	1494	1492	1801	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3
48	Lavandulylisovalérate	1495	1492	1760	0,7	0,6	0,6	0,6	0,7	0,3	0,5	0,8	2
49	$\beta$ -Sesquiphellandrène	1516	1512	1756	0,2	0,4	0,2	0,1	0,1	0,4	0,3	0,1	0,1
50	Citronellylisovalérate	1560	1558	1799	1,1	0,1	0,4	0,4	0,5	0,1	0,1	0,4	0,3
51	Géranyl-2-méthyl butyrate	1591	1586	1886	0,2	tr	0,1	0,1	0,2	tr	0,1	tr	tr
52	Géranylisovalérate	1587	1589	1897	0,1	tr	0,1	tr	0,1	-	-	-	-
53	NI		2037	2632	1,1	1,8	0,9	0,4	0,7	0,7	0,4	0,3	0,6



54	NI	2112	2514	5,3	10,4	5,9	2,6	3,3	5,8	5	2,6	2,8
	% Monoterpènes hydrocarbonés			6,6	4,3	4,7	4,1	2,4	4,5	4,9	7,8	9,5
	% Monoterpènes oxygénés			62,3	63,9	63,4	65,1	56,4	65,9	69,3	62,3	65,3
	% Sesquiterpènes hydrocarbonés			1,1	2,5	1,4	0,8	0,5	1,4	1,1	0,6	0,5
	% Sesquiterpènes oxygénés			2,1	0,7	1,2	1,1	1,5	0,4	0,7	1,2	2,3
	% Composés d'origine diverse			15,1	12,3	18,9	22,3	29,2	17,7	15,9	20,6	16,3
	% Non identifiés			8,3	13,4	8,6	5,1	5,9	8,5	7	5,0	4,7
	% Composés identifiés			87,20	83,70	89,80	93,40	90%	89,90	91,9	92,50	93,90
	%			95,50	97,10	98,40	98,50	95,90	98,40	98,90	97,50	98,60

<sup>a</sup> Ordre d'éluion est donné sur colonne apolaire (Rtx-1).

<sup>b</sup> RI lit : indices de rétention de la littérature sur colonne apolaire reportés à partir de König et Coll., 2001 et NIST, 2005.

<sup>c</sup> RI<sub>a</sub> : indices de rétention sur colonne apolaire Rtx-1.

<sup>d</sup> RI<sub>p</sub> : indices de rétention sur colonne polaire Rtx-Wax.

RI : indices de rétention ; MS : spectre de masse en mode impact électronique ; tr : trace (<0.05%) ; % : pourcentages des composés.

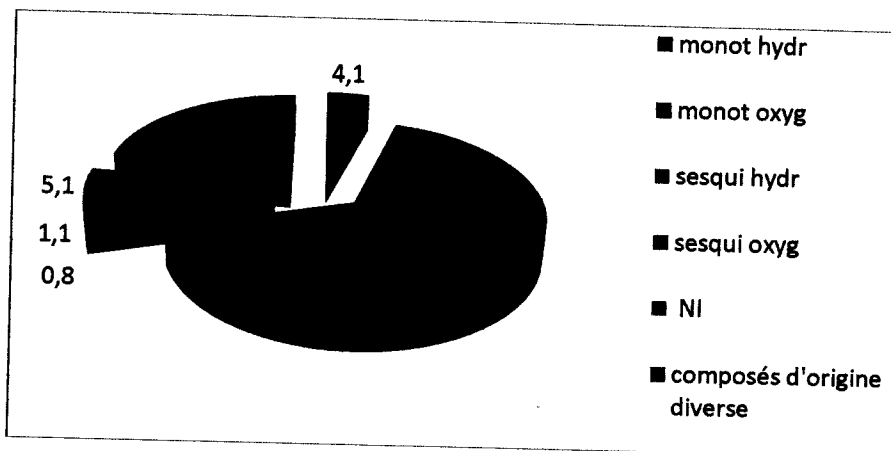
NI : non identifié

DG : *Daucus gracilis*, FE : feuilles, FL : fleurs, PE : Partie entière

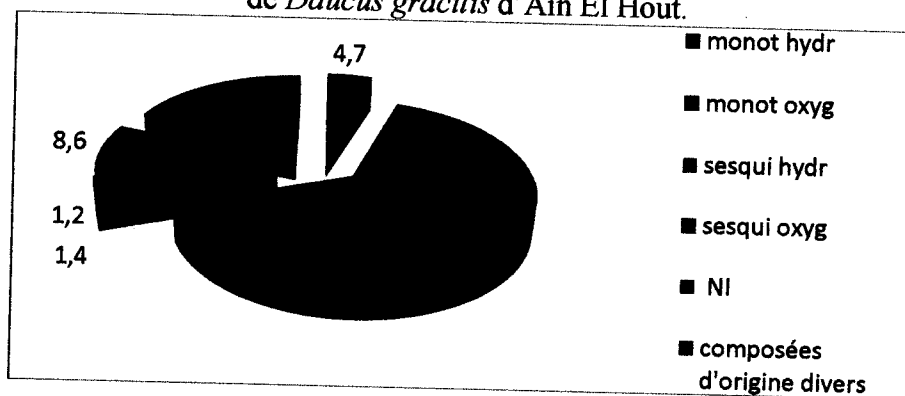
Stations: Ben Sakrane (BS), Ain-El Hout (AH) & Amier (AM).

Monot hydr: monoterpènes hydrocarbonés ; Monot oxyg : monoterpènes oxygénés ; Sesqui hydr : sesquiterpènes hydrocarbonés ; Sesqui oxyg : sesquiterpènes oxygénés ; NI: non identifier .

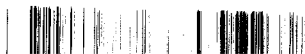
Les histogrammes suivants illustrent les classes de composés chimiques présents dans les huiles essentielles des différentes stations étudiées :

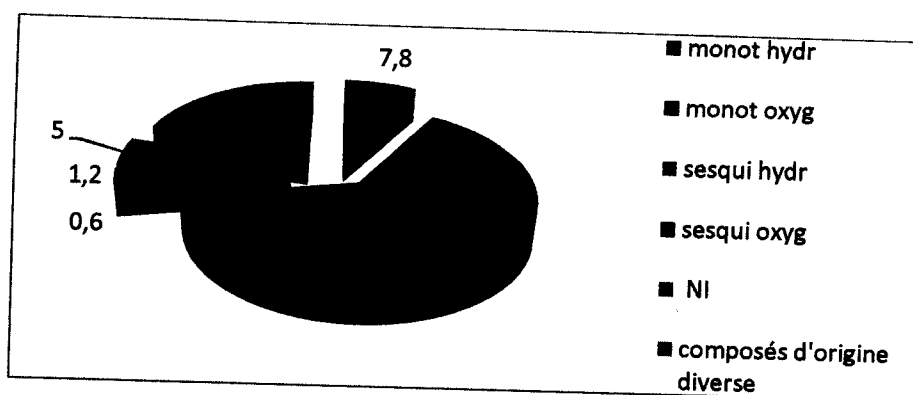


**Histogramme 1 :** Composition chimique de l'H.E de la partie entière de *Daucus gracilis* d'Ain El Hout.



**Histogramme 2 :** Composition chimique des H.E de la partie entière de *Daucus gracilis* provenant de Ben Sakrane.

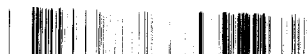




**Histogramme 3 :** Composition chimique des H.E de la partie entière de *Daucus gracilis* d'Amier.

L'analyse de l'huile essentielle *Daucus gracilis* endémique d'Algérie a permis l'identification de 50 composés représentant 93.90% de la composition chimique. Cette dernière est dominée par une forte proportion de composés oxygénés (plus de 65%), parmi lesquels 65.3% de monoterpènes et 2.3% de sesquiterpènes. Les constituants majoritaires sont : 2-méthylbutyl-2-méthyl butyrate (23.2%), linalol (12.6), 2-méthylbutyl isobutyrate (12.4%), 3-méthylbutyl isovalérate (9.7%), 2-méthylbutyl isovalérate (6.7%), citronellylisobutyrate (4.1%), isopentyl-2-méthyl butyrate (3.7%), myrcène (2.7%), isobutylisovalérate (2.4%). De plus, nous notons la présence des terpènes et sesquiterpènes hydrocarbonés, avec des proportions relativement plus faibles que celles des produits oxygénés, de 9.5% et 2.5% respectivement.

Nous remarquons aussi, d'après ces résultats, que la composition chimique de l'huile essentielle du *Daucus gracilis* collectée dans les différentes stations est très similaire. Cela peut s'expliquer par les ressemblances des conditions climatiques et de la nature du sol dans les trois régions étudiées. Une étude de variabilité chimique de l'huile sera réalisée, dans le futur, en faisant une prospection de la région de Tlemcen, qui nous permettra d'augmenter le nombre de stations, avec des climats, des sols différents...



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Small field B., Introduction to growing herbs for essential oil, medicinal and culinary purposes , *Crop and Food Research*, Number 45, p.4.
- [2] Carré P., Précis de technologie et de chimie industrielle, Edition Baillièrre, Vol. 3, 1953.
- [3] Bendimered N., Etude des huiles essentielle de *Pseudocysusintegrifolius* (Sabisb) Rehder et *Sinapsarvensis* L., plante crucifères de la région ouest d'Algérie, Mise en évidence de composés et séquence nutritives, Thèse de Doctorat d'Etat, chimie organique Appliquée, Tlemcen, 2006, p 54.
- [4] Wu T.S., Shi L.S., Wang J.J., Iou S.C., Chang H.C., Chen Y.P., Kuo Y.H., Chang Y.L. and Teng, C.M., *Journal of Chinese Chemical society*, 2003, 50 :171.
- [5] Tzakou O. and Couladis M., Essent J., *Oil Res.*, 2000, 13:258.
- [6] National Institute of Standards and Technology, *NIST Chemistry Web Book*, NIST Standard Reference Database. Gaithersburg, MD (<<http://webbook.nist.gov/chemistry>>), 2005.
- [7] König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., *Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils*, Library of Mass Finder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany, 2001.



## CHAPITRE II : ACTIVITES ANTIMICROBIENNE ET ANTIOXYDANTE DES H.E DE *Daucus gracilis*

### I. Introduction

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec nos collègues microbiologistes de l'université de Tlemcen. Il est évident que ce travail est générateur de retombées importants sur le plan de la santé publique en général et sur le plan de la sécurité alimentaire, en particulier.

L'étude des activités biologiques des huiles essentielles est l'un des principaux moyens de valoriser commercialement ces dernières ou d'expliquer son utilisation en médecine traditionnelle. Les activités biologiques les plus couramment observées sont les activités antimicrobiennes. Les deux méthodes les plus usitées pour les évaluer sont la diffusion sur gel et la dilution en milieu liquide [1]. Une autre manière récente de valoriser les huiles essentielles consiste à mesurer leurs activités antioxydantes. La recherche bibliographique révèle beaucoup de travaux récents décrivant les méthodes utilisées parmi lesquelles : piégeage du radical libre DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), potentiel réducteur du Fer (*FRAP*)... [2,3].

### II. Activité antimicrobienne

#### II.1. Méthode de diffusion sur gel

Des disques de papier buvard imprégnés des matrices à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, la matrice diffuse de manière uniforme si bien que sa concentration est inversement proportionnelle à la distance du disque. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture.

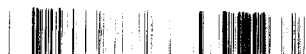
Pour les tests standards, nous considérons qu'une huile essentielle, fraction ou molécule est active pour une souche donnée si le diamètre d'inhibition (D.I.) est supérieur ou égal à 15 mm [4].

Cette technique est la plus couramment utilisée dans le domaine de recherche des huiles essentielles, elle présente l'avantage d'être rapide, d'une grande simplicité à mettre en œuvre et de nécessiter qu'une faible quantité de matrice. S'agissant des inconvénients, une huile très visqueuse, voire une huile qui cristallise, aura un diamètre d'inhibition faible ou nul même si elle est fortement bactéricide. Cela est dû, dans ces cas à un problème de diffusion sur le gel.

#### II.2. Méthode de dilution en milieu liquide

Cette méthode consiste à mettre un inoculum bactérien standardisé au contact de concentrations croissantes de matrice à tester, selon une progression géométrique de raison 2. L'inoculum bactérien est distribué de façon égale dans une série de tubes (méthode de macrodilution) contenant la matrice testée. Après incubation, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration de matrice où aucune croissance n'est visible.

Pour les tests standards, nous considérons qu'une huile essentielle, fraction ou molécule est active pour une souche donnée pour une CMI inférieure à 1000 µg/mL [4].





Cette technique, complémentaire de la méthode de diffusion, donne directement la CMI mais, par rapport à la méthode précédente, présente l'inconvénient d'être grande consommatrice en temps d'expérience et en quantité de matrice nécessaire.

### II.3. Etude de l'activité antimicrobienne du *Daucus gracilis*

Nous avons évalué le potentiel antimicrobien de l'huile essentielle du *Daucus gracilis*. L'objectif complémentaire est de mettre en évidence une corrélation entre sa composition chimique et l'effet d'inhibiteur observé sur les souches étudiées. Pour cela quatorze souches microbiennes dont neuf bactéries, deux champignons et trois levures ont été sélectionnées : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 26790, *Candida albicans* IP 444, *Alternaria alternata* MNHN 843390 et *Aspergillus flavus* MNHN 994294.

#### II.3.1. Méthodes utilisées

##### Méthode de diffusion sur disque

La méthode utilisée est la méthode de VINCENT (JACOBETAL, 1979), ainsi des disques, de papier filtre de 6mm de diamètre, sont imprégnés d'une faible quantité de nos échantillons, puis déposés à la surface d'un milieu de MUELLER-HINTON, coulé en boîte de Pétri préalablement ensemencée en surface en nappe à l'aide d'une suspension de la bactérie étudiée.

Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre, en mm, de la zone d'inhibition.

Pour la préparation des inoculums, on a utilisé la méthode dite d'antibiogramme (méthode de la SFM Société Française de Microbiologie).

La technique d'antibiogramme utilisée est celle de la diffusion de disques en gélose conçus par CHABBET en 1973.

##### Préparation des inoculums

La méthode de préparation des inoculums est celle préconisée par la SFM (communiqué de 2005) qui consiste à préparer, à partir d'une culture de 18-24h de la bactérie étudiée sur le milieu gélosé, une suspension en solution saline (0.9% NaCl) équivalente au standard Mc FARLAND 0.5 ( $\sim 10^8$  UFC/ml). Cette suspension peut être obtenue par la mesure de la densité optique (D.O) allant de 0.08 à 0.1 lue à 625nm (standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999).

Par la suite, on prend 1mL de la suspension de l'inoculum, on l'étale par inondation à la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose de MUELLER-HINTON, on déverse l'excès, ce qui correspond à une densité de  $10^6$  à  $10^8$  UFC/mL et on laisse sécher la boîte de Pétri dans la zone septique du bec Bunsen.

##### Distribution des disques

Des disques de papier filtre (diamètre de 6 mm) sont individuellement imprégnés avec 10  $\mu$ l d'huile essentielle et placés sur les plaques inoculées et, après un séjour à 4°C pendant 2 h,



ils sont incubées à 37°C pendant 18-24 h pour les bactéries, à 35°C pendant 48 h pour les levures et à 25°C pendant 72h pour les champignons. Les disques standards (diamètre 6 mm) de la gentamycine antibiotique (Gen) (10 µg) ont servis de contrôle antibactérien positif. L'activité antimicrobienne est évaluée en mesurant la zone d'inhibition contre les organismes d'essai. Chaque expérience est réalisée en triple exemplaire et le diamètre moyen de la zone d'inhibition est enregistré.

### Méthode de dilution

Méthode est déjà décrite II.2. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées pour les souches bactériennes sensibles à l'huile essentielle dans les tests de diffusion sur disque. L'amphotéricine B (Am B) est utilisée comme médicament antifongique de référence. Les plaques inoculées sont incubées à 25°C pendant 72 h. A la fin de la période d'incubation, les plaques sont évaluées par la présence ou l'absence de croissance. Les valeurs des CMI sont déterminées. Chaque test a été répété au moins deux fois.

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne de *Daucus gracilis* sont regroupés dans les tableaux 6&7ci-dessous :

**Tableau 6:** Les activités antimicrobiennes d'H.E contre les souches bactériennes testées.

Microorganismes	Huiles essentielles		Antibiotiques Gen	
	DGPEAM		DI (mm)	CMI
	DI (mm)	CMI		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	24	0.078	30	0.078
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	9	1.25	14	0.625
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	22	0.156	23	0.156
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	22	0.156	24	0.156
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	7	-	14	0.625
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12	0.625	22	0.156
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	16	0.312	20	0.312
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	20	0.156	22	0.156

**Table 7:** activités des huiles essentielles contre les levures et les fongiques.

Levures et fongiques	Huiles essentielles		Antibiotiques Am B	
	DGPEAM		DI (mm)	CMI
	DI (mm)	CMI		
<b>Levures :</b>				
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	17	0.312	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	16	0.625	-	-
<i>Candida albicans</i> IP 444	16	0.625	-	0.312
<b>Fongiques :</b>				
<i>Alternaria alternata</i> MNHN 843390	32	1.25	-	0.156
<i>Aspergillus flavus</i> MNHN 994294	35	0.312	-	0.156

- : pas de zone d'inhibition et/ou mesure de MIC.

Am B: Amphotéricine B (mg/mL) est utilisé comme antibiotique de référence dans MIC agar dilution.

DI = Diamètre de diffusion sur disque (mm).

CMI = concentrations inhibitrice minimale (mg/mL).

Inactif : diamètre  $d \leq 6$ mm ; activité moyenne :  $6\text{mm} < d \leq 12\text{mm}$  ; Activité modérée  $12\text{mm} < d \leq 20\text{mm}$ , bonne activité :  $d > 20$  mm.



L'activité d'une huile essentielle est directement liée à sa composition chimique. On considère que les huiles essentielles riches en composés oxygénés sont celles qui donnent les meilleures activités et à l'inverse celles riches en hydrocarbonés ont une activité modérée [5]. Les résultats mentionnés sur les tableaux 6 et 7 confirment la relation de l'activité antimicrobienne de l'huile avec sa composition. En effet, nous avons déjà trouvé, dans un chapitre précédent, que l'huile de la partie entière de *Daucus gracilis*, provenant de la station Amier, été dominée par une forte proportion de composés oxygénés (63.5%), parmi lesquels 62.3% de monoterpènes et 1.2% de sesquiterpènes. Cette composition riche en produits oxygénés est à l'origine de cette bonne activité.

L'huile est très active contre les bactéries suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659. Les diamètres de diffusion sur disque sont comparables à ceux obtenus pour la gentamycine. De plus, nos résultats révèlent une activité modérée vis-à-vis de l'*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. En revanche, une activité faible est obtenue contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

D'autre part, le tableau 7 montre une bonne activité de l'huile de *Daucus gracilis* vis-à-vis des levures *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 26790 et *Candida albicans* IP 444 et une excellente activité antifongique contre *Alternaria alternata* MNHN 843390, *Aspergillus flavus* MNHN 994294. La comparaison des valeurs de DI de l'huile avec ceux du médicament antifongique (amphotéricine) est révélateur d'une très bonne activité antifongique de l'huile étudiée ce qui peut lui valoir des applications intéressantes dans le domaine de la santé.

Notons que les résultats de la CMI sont en accord avec ceux obtenus dans la méthode de diffusion sur disque.

L'enjeu majeur de la recherche des principes actifs présents dans les huiles essentielles, a pour objectif la compréhension des mécanismes d'action des ces principes actifs afin de lutter contre les multi-résistances que développent les micro-organismes. Un des phénomènes mis en jeu par les micro-organismes pour développer cette résistance aux antibiotiques est le mécanisme d'efflux à travers de la membrane cellulaire afin de rejeter l'antibiotique à l'extérieur et se protéger de ce dernier [6].

### III. Activité antioxydante

L'oxygène, molécule indispensable pour la vie, peut entraîner des dommages cellulaires importants par formation de dérivés oxygénés activés tel que les radicaux libres. En effet, de très nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont suggéré le rôle de ces Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) dans le développement de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose et la cancérogenèse [7].

Pour pallier au stress oxydatif, un intérêt croissant est porté, ces deux dernières décennies, aux antioxydants principalement d'origine naturelle à cause de leur manque de toxicité. Ceci a stimulé le développement de méthodes efficaces et fiables afin de déterminer la capacité antioxydante de ces produits [8]. Actuellement une grande diversité des méthodes analytiques pour la détermination de la capacité antioxydante est disponible parmi lesquelles on cite le Test de  $\beta$ -carotène [9], le test Rancimat [10], le test FRAP (*Ferric reducing ability power*) [11], test de réduction du radical stable, le DPPH° [12,13] etc.



Pour notre part, nous avons choisi les dernières méthodes pour valoriser l'huile essentielle de la partie aérienne du *Daucus gracilis* :

**-Test de réduction du radical stable, le DPPH°**

Utilisé en tant que réactif, DPPH (2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl hydrate) offre évidemment une méthode pratique et précise pour titrer les groupes oxydables d'origine naturelle ou synthétique antioxydants. Environ 1mL de 0,006% solution de DPPH dans l'éthanol est mélangé avec un volume égal d'extraits d'essai à différentes concentrations (0.04 à 0.2 mg/mL) et maintenu dans l'obscurité pendant 30 min. Absorbance a été lue à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V-VIS Spectrophotometer, Optizen POP). Pour chaque dilution, on prépare un blanc constitué de 1mL de la solution à tester et 1mL d'éthanol.

- ✓ Le contrôle négatif est composé de 1mL de la solution éthanolique au DDPH et de 1mL d'éthanol.
- ✓ Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

- Calcul des pourcentages d'inhibition : Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante:

$$I\% = [(A_C - A_T) / A_C] \times 100 [36]$$

$A_C$ : Absorbance du contrôle ;  $A_T$ : Absorbance du test effectué.

- Calcul des  $IC_{50}$  : [14]  $IC_{50}$  ou concentration inhibitrice de 50% (aussi appelée  $EC_{50}$  pour *Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH°. Les  $IC_{50}$  sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

- Calcul de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity) : L'activité antiradicalaire est déterminée en calculant l'inverse des valeurs des  $IC_{50}$  :

$$A_{AR} = 1 / IC$$

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures. Ils sont représentés comme suit :

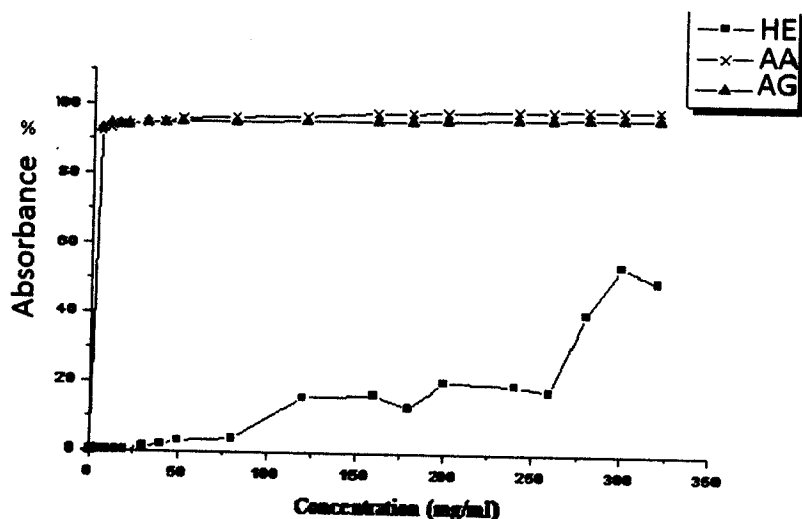
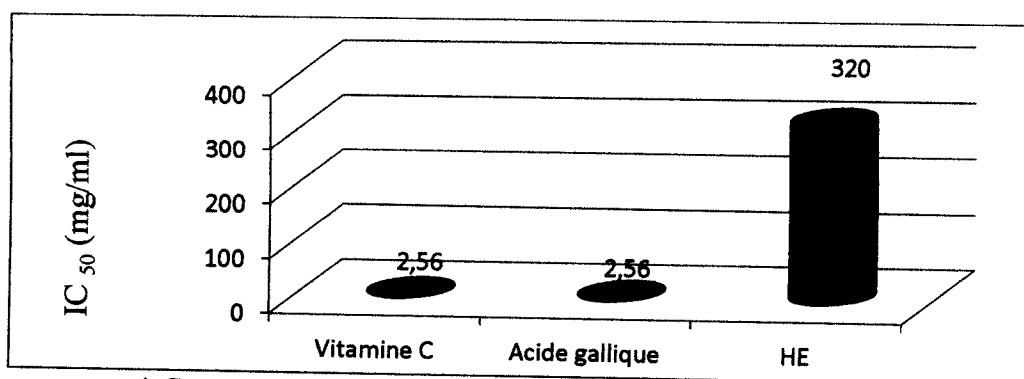


Fig.3 : Activités des huiles essentielles, de l'acide ascorbique et l'acide gallique.



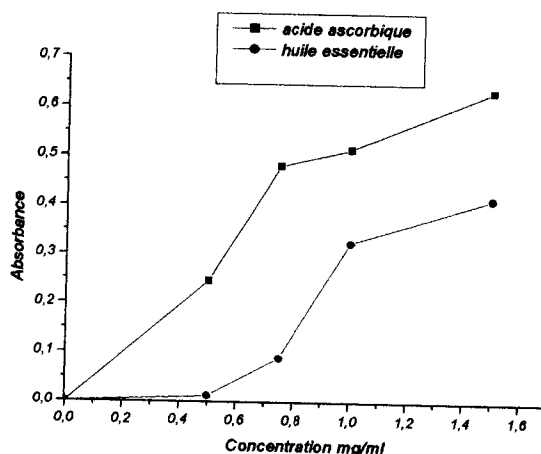
**Histogramme 4:** Comparaison entre l'activité des huiles essentielles, de l'acide ascorbique et l'acide gallique.

### Résultats et Discussion

Le test de DPPH comparé avec celui de l'acide ascorbique (AA) et l'acide gallique (AG), deux antioxydants forts, montre une activité antioxydante faible. Plusieurs essais à différentes concentrations d'huile, ont révélé que la solution de coloration jaune, révélatrice d'un test positif, est obtenue à une concentration de 320mg/mL. Cette activité mesurée est sans doute due à la présence des deux composés phénoliques : phényléthy-2-méthyl butyrate et le 2-phényléthyl isovalérate et/ou à l'effet de synergie des tous les composés présents dans l'huile.

### **-Méthode de réduction du Fer :FRAP(Ferric reducing antioxidant power)**

Le protocole expérimental suivi est celui de KARAGOZLER et Coll., 2008. 1 mL de l'échantillon à différentes concentrations (concentrations initiales : 0.50mg/mL, 0.75mg/mL, 1mg/mL et 1.5mg/mL), est mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate 0.2 M (pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20min, puis refroidi à la température ambiante. 2.5 mL d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés pendant 10 min. 2.5 mL du surnageant sont ajoutés à 2.5mL d'eau distillée et 500 $\mu$ L d'une solution de chlorure du fer ( $FeCl_3, 6H_2O$ ) à 0.1% sont ajoutés au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (U.V/VIS Spectrophotometer, Optizen POP). L'acide ascorbique (AA) est utilisé comme contrôle positif dans cette expérience, aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales [15].



**Fig.4 :** Evolution de l'absorbance en fonction des concentrations en H.E et en acide ascorbique.



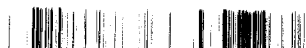
Résultats et Discussion

Cette deuxième méthode est basée sur la comparaison du potentiel réducteur du fer de l'huile essentielle de *Daucus gracilis* avec celui de l'acide ascorbique dans les mêmes conditions. L'analyse des résultats de cette méthode montre qu'elle est en parfaite accord avec celle de la réduction du radical DPPH°. En effet, elle confirme l'activité antioxydante relativement faible de l'huile à faible concentrations. En revanche, cette activité est perceptible à des concentrations élevées.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Belaiche P., Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, l'Aromatogramme. Ed. Maloine, Paris, 1979.
- [2] R. L. Prior, G. Cao; *In vivo* total antioxidant capacity: comparaison of different analytical methods, *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 27: 1173-1181.
- [3] Mantle D., Anderton J. G., Falkous G., Barnes M., Jones P., Perry E. K., Comparaison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils; *Comp. Biochem. Phys.*, **1998**, 121:385-391.
- [4] Benjilali B., Tantaoui-Elaraki E.A., Ismail Alaoui N., Ayadi A., Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé, *Plan. Med.Phytoth.*, **1986**, 20, 155-167.
- [5] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review, *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 94, 223-253.
- [6] Marquez B., Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors, *Biochimie*, 2005, **87**, 1137-1147.
- [7] Diallo A., Thèse de Doctorat en Pharmacie, Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd (Myrtacées), **2005**, p.11, 13.
- [8] Roginski V., Lissi E., Review of methods to determine chain-breaking antioxydant activity in food. *Food Chim*, **2005**, Vol.92, p.235-254.
- [9] Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphénols to the DPPH radical. *J. Agric. Food Chem.*, Vol.51, **2003**, 615- 622.
- [10] Mendez E., Sanhueza J., Speisky H., Valenwuela A., Validation of the Rancimat test for the assessment of the relative stability of fish oil. *J. Am.Oil Chim. Soc.*, **1996**, 73, 1033- 1037.
- [11] Benwie F.F., Strain J.J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, **1996**, 239, 70-76.
- [12] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel – Wissenschaft and technology*, **1995**, 28, p.25-30.
- [13] Sanchez-Moreno C., Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. *Food Sci. Techn. Int.*, **2002**, 8: 3, 121-137.
- [14] Mensor L., Screening of Brazilian plant extract for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.*, 15, 127-130.
- [15] Karagözler A.A., Erdag B., Emek Y.G., Uygum D.A., Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*, *Food Chem.*, **2008**, 111, 400-407.



## CONCLUSION GENERALE

La richesse de la flore algérienne n'est plus à démontrer. Le bassin méditerranéen est l'un des « points chauds » ou hotspot dans lequel se trouve concentrée la biodiversité. A l'instar des autres zones rouges régionales, cette région est caractérisée par une richesse spécifique, un taux d'endémisme élevé mais aussi par des menaces anthropiques fortes et en augmentation rapide.

Ce travail de master repose sur l'étude des huiles essentielles d'une espèce endémique du genre *Daucus* : *Daucus gracilis* steinheil appartenant à la famille botanique des *Apiacées* (*Ombellifères*). Notre objectif est de contribuer à l'amélioration des connaissances des ressources naturelles issues de la biomasse végétale en fournissant des informations scientifiques objectives.

L'analyse de l'huile essentielle *Daucus gracilis* a permis l'identification de 50 composés représentant 93.90% de la composition chimique. Cette dernière est dominée par une forte proportion en composés oxygénés (plus de 65%), parmi lesquels 65.3% de monoterpènes et 2.3% de sesquiterpènes. Nos résultats montrent que l'huile essentielle du *Daucus gracilis* collectée dans les trois stations étudiées est très similaire. Cela peut s'expliquer par la ressemblance des facteurs environnementaux et par la génétique identique du végétal.

Nous avons, ensuite, recherché une valorisation des huiles essentielles étudiées en développant une approche pluridisciplinaire chimie/activité biologique au travers de la mise en évidence des activités biologiques des huiles essentielles du *Daucus gracilis*.

Les tests sont menés sur des microorganismes impliqués dans des infections nosocomiales et alimentaires. Les résultats démontrent le potentiel très intéressant des huiles essentielles de *Daucus gracilis* sur plusieurs pathogènes. Leurs activités sont comparables à ceux des antibiotiques et antifongiques pris comme références. Ceci est du, principalement, à leur richesse en composés oxygénés.

D'autre part, nous avons procédé à la mesure de l'activité antioxydante de l'huile essentielle par l'emploi de deux méthodes qui ont l'avantage d'être facilement mises en œuvre, le test de DPPH et le potentiel réducteur du fer (*FRAP*). Ces deux méthodes révèlent une activité antioxydante de l'huile à des concentrations élevées.

